

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Ecole doctorale ED3C : Cerveau Cognition Comportement

Présentée par

Audrey Giocanti-Aurégan

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

Sujet de la thèse :

**Altération de la morphologie astrocytaire et du
développement vasculaire chez les souris Ko-Dp71 :
implications dans la barrière hémato rétinienne interne**

Présentée et soutenue publiquement le 25 Septembre 2015

Devant un jury composé de :

Rapporteurs : Pr. David Gaucher
Dr. Cyrille Vaillend
Présidente de jury : Pr. Hélène Hardin-Pouzet
Directeurs de thèse : Dr. Alvaro Rendon
Pr. Ramin Tadayoni

Remerciements

Au Professeur José Alain-Sahel, qui m'a accueillie à l'Institut de la Vision. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Au Professeur Hélène Hardin-Pouzet, qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider mon jury de thèse. Au Professeur David Gaucher, qui a accepté de venir de Strasbourg pour participer à mon jury thèse et d'en être rapporteur. Au Docteur Cyrille Vaillend, qui a accepté de faire partie de mon jury thèse et d'en être rapporteur.

Qu'ils trouvent ici l'expression de ma gratitude.

A mes directeurs de thèse, le Dr Alvaro Rendon, et le Pr Ramin Tadayoni, pour leur soutien tout au long du Master 2, puis de ces 3 années de thèse. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

A mes chefs et collègues de laboratoires : Xavier Guillonnet, Florian Sennlaub, Michel Pâques, Romain Bénard, Ophélie Vacca, Lourdes Siqueiros, Hugo Charles-Messance, Marie Darce, Sijia Cao pour leur aide et leur disponibilité.

A mon patron, le Pr Gilles Chaine, pour son soutien indéfectible.

A mes collègues et amis de Bobigny, pour leur soutien durant ce travail « en alternance », pour leur compréhension, aide et amitié.

A Alvaro, plus qu'un chef, une personne extraordinaire. Merci pour ces heures de relecture-hamac, de brainstorming, et pour vos encouragements durant la dernière ligne droite.

A Ramin, plus qu'un chef, un ami. Merci pour tes éclairages en ophtalmologie, en sciences et aussi philosophiques. J'espère te ressembler « un peu » quand je serai grande.

A ma famille.

A JC, pour me supporter chaque jour... et ce n'est pas facile !

Liste des abréviations

AQP : aquaporine

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

BHE : barrière hémato-encéphalique

BHR : barrière hémato-rétinienne

CCG : couche des cellules ganglionnaire

CGM : cellule gliale de Müller

CNE : couche nucléaire externe

CNI : couche nucléaire interne

CPE : couche plexiforme externe

CPI : couche plexiforme interne

CT : corticostéroïdes

DAPs : dystrophin associated proteins (protéines associées à la dystrophine)

DEX : Dexaméthasone

DMD : dystrophie musculaire de Duchenne

Dp : dystrophine

EPR : épithélium pigmentaire rétinien

GABA : γ aminobutyric acid

GFAP : glial fibrillary acidic protein

GLAST : glutamate aspartate transporteur

GS : glutamine synthase

HSF1 : heat shock protein 1

ICAM-1 : intercellular adhesion molecule-1

IL-1 α : interleukine 1 α

LPS : lipo poly saccharide

MEC : matrice extra-cellulaire

MLE : membrane limitante externe

MLI : membrane limitante interne

SNC : système nerveux central

TJ : tight junctions (jonctions serrées)

TNF α □ □ tumor necrosis factor α (facteur de nécrose tumorale)

VEGF: vascular endothelium growth factor

ZO-1: zonula occludens 1

Sommaire

I/ Préface	p 09
II/ Introduction	p 12
1. L'œil	p 13
1-1 Anatomie	p 13
1-2 La rétine	p 15
1-2.1 La neurorétine	p 16
1-2.2 Les cellules gliales	p 20
1-2.2.1 Les cellules microgliales	p 20
1-2.2.2 Les astrocytes	p 20
1-2.2.3 Les cellules gliales de Müller	p 21
2. Les Dystrophines	p 23
2-1 Historique	p 23
2-2 Le gène	p 23
2-3 Protéines codées par le gène DMD	p 23
2-4 Structure de la protéine dystrophine	p 25
2-5 Dystrophines et pathologies	p 26
3. La dystrophine Dp71	p 27
3-1 La Dp71 et les protéines associées	p 27
3-2 La Dp71 dans le cerveau	p 29
3-2.1 Dp71 et barrière hémato encéphalique	p 29
3-2.2 Dp71 et troubles cognitifs	p 32
3-3 La Dp71 dans la rétine	p 33
4. Les astrocytes	p 34
4-1 Fonctions et pathologies astrocytaires dans le cerveau	p 34
4-1.1 Astrocytes et développement vasculaire cérébral	p 34
4-1.2 Astrocytes et barrière hémato-encéphalique	p 35
4-1.3 Astrocytes et neurotransmission	p 35
4-1.4 Astrocytes et pathologies cérébrales	p 37
4-2 Fonctions et pathologies astrocytaires dans la rétine	p 38
4-2.1 Astrocytes et développement vasculaire rétinien	p 38
4-2.2 Astrocytes et barrière hémato rétinienne	p 45
4-1.3 Astrocytes et pathologies rétiniennes	p 47
5. Les cellules gliales de Müller	p 49
5-1 Fonctions et pathologies des CGM dans la rétine	p 49
5-1.1 Configuration spatiale des CGM	p 49
5-1.2 Homéostasie rétinienne potassique	p 50
5-1.3 Homéostasie aqueuse	p 51

5-1.4 CGM et neurotransmission	p 52
5-1.5 Homéostasie rétinienne et Dp71	p 53
6- Pathologies et rupture de barrière hémato-rétinienne	p 55
7- Corticostéroïdes	p 58
6-1 Corticostéroïdes et barrières hémato neuronales	p 58
6-2 Corticostéroïdes et équilibre homéostatique de la rétine	p 59
6-3 Corticostéroïdes et Dp71	p 60
8- Problématique	p 61
III/ Résultats	p 63
1. Partie 1	p 64
1-1 Situation du sujet	p 65
1-2 Résumé résultats	p 66
1-3 Conclusion	p 67
1-4 Article 1 : Altered astrocyte morphology and vascular development in Dystrophin-Dp71-null mice	p 68
2. Partie 2	p 98
2-1 Situation du sujet	p 99
2-2 Résumé résultats	p 99
2-3 Conclusion	p 101
2-4 Article 2 : Protection of Glial Muller cells by Dexamethasone in a mouse model of post surgical blood retinal barrier breakdown	p 102
3. Partie 3	p 131
3-1 Situation du projet	p 132
3-2 Méthodes et résultats complémentaires	p 132
3-2.1 Rôle de l'inflammation rétinienne	p 132
3-2.2 Rôle des astrocytes	p 135
3-2.3 Rôle de l'homéostasie rétinienne	p 138
IV/ Discussion générale/ Perspectives	p 142
V/ Conclusion	p 158
V/ Bibliographie	p 160
Résumé	p 179

I/ Préface

Les pathologies rétiniennes se situent actuellement parmi les principales causes de malvoyance et de cécité dans le monde.

La gravité de ces maladies provient des complications qu'elles peuvent engendrer, qui sont de 2 types, néo-vasculaires et oedémateuses (œdème maculaire) à l'origine de baisse de vision.

Même si nous n'avons pas encore complètement élucidé les mécanismes physiopathologiques à l'origine de ces complications, l'avancée actuelle des traitements ophtalmologiques en rétine, nous permet de traiter ces complications, c'est à dire faire régresser un néo-vaisseau pré-rétinien ou choroïdien, et assécher un œdème. Cependant pour l'instant nous ne savons pas encore comment protéger la rétine en situation de stress afin de pouvoir, après régression d'un néo-vaisseau ou élimination du fluide en cas d'œdème, restaurer une intégrité des cellules rétiniennes qui souffrent pendant ces situations de stress, et une vision correcte dans tous les cas.

Il apparaît donc logique afin de comprendre les mécanismes impliqués dans cette toxicité sur les cellules rétiniennes en situation de stress, d'étudier à la fois les étapes ou altérations de l'angiogenèse ainsi que de la rupture de barrière hémato rétinienne.

Ainsi nous nous proposons au cours de ce travail d'explorer les étapes du développement vasculaire de la rétine chez la souris normale comparativement à une souris mutée pour une protéine assurant le lien entre le cytosquelette d'actine et la matrice extra-cellulaire, la protéine dystrophine Dp71. Dans le cerveau, la dystrophine Dp71 est exprimée dans les astrocytes au sein desquels elle participe au maintien de la barrière hémato-cérébrale par promotion des jonctions serrées entre les cellules endothéliales. Par analogie avec le cerveau nous avons émis l'hypothèse de l'expression de la Dp71 également par les astrocytes rétiniens. Cette protéine qui était connue jusque-là uniquement exprimée dans les cellules gliales de Müller au sein de la rétine, est au regard de ce travail également exprimée dans les astrocytes rétiniens. En l'absence de cette protéine, les astrocytes rétiniens apparaissent

vraiment anormaux avec une densité et une morphologie astrocytaire altérée comparativement à l'animal contrôle. Le réseau astrocytaire rétinien sert de patron à la migration et au développement du réseau vasculaire rétinien. Dans ce même modèle nous montrons qu'un réseau astrocytaire anormal conduit à un retard de développement vasculaire de la rétine et une raréfaction des ramifications des vaisseaux.

Par ailleurs, afin d'étudier les mécanismes en cause au cours de l'œdème maculaire, nous avons choisi d'utiliser un modèle *in vitro*, d'explants rétiniens permettant d'explorer les conséquences directes de l'environnement extra-cellulaire sur les cellules rétiniennes, ainsi qu'un modèle de rupture de la barrière *in vivo*, le plus pur possible c'est à dire sans injection de VEGF, dans l'objectif d'explorer la participation du VEGF aux phénomènes observés, et sans ischémie afin de ne pas influencer l'expression des différentes molécules que nous souhaitons étudier.

Enfin, notre but étant le traitement des patients, nous avons évalué la protection par la Dexaméthasone des cellules macro-gliales de la rétine au cours des situations de stress afin de rechercher un effet protecteur de ce traitement.

Ces 3 années de recherche m'ont permis d'approfondir par la quête mécanistique et physiopathologique de ces différents modèles ma connaissance de l'ophtalmologie clinique et en particulier de la rétine, et les découvertes que nous avons faites participent chaque jour à mes réflexions de clinicien.

III/ Introduction

1. L'œil

1-1 Anatomie

L'œil est un organe sensoriel qui permet de capter les rayons lumineux et de les diriger grâce à un système optique d'une puissance d'environ 60 Dioptries sur la rétine composée d'un circuit neuronal complexe permettant la transduction du signal lumineux (transformation d'un signal lumineux en un influx nerveux). L'influx nerveux ainsi produit cheminera le long des différents neurones jusqu'au cortex occipital permettant ainsi la formation de l'image.

Il est classique de décrire un œil en citant les différentes structures lumineuses traversées par les rayons lumineux et qui nécessitent une parfaite transparence afin d'autoriser une bonne vision.

Les rayons lumineux vont donc d'avant en arrière traverser (Figure 1) :

- La **cornée**, principal dioptré de l'œil (environ 40 dioptries), qui est la limite de l'œil en avant, constituée de 5 couches cellulaires de l'extérieur de l'œil vers l'intérieur : épithélium, membrane de Bowman, stroma, membrane de Descemet et endothélium. La cornée est un tissu avasculaire. Elle est prolongée en arrière par un tissu opaque constitué de collagène dense appelé la sclère, et qui constitue l'enveloppe fibreuse de l'œil.

- La **chambre antérieure** est l'espace compris entre la cornée en avant et l'iris en arrière. Elle est remplie d'un liquide appelé humeur aqueuse. L'iris est un sphincter pigmenté qui réagit en se contractant en fonction de l'éclairage et qui ménage un espace central appelé pupille qui laisse passer les rayons lumineux.

- Le **crystallin**, est le second dioptré principal de l'œil et constitue un tiers du pouvoir optique total de l'œil. Par modification de sa courbure sous l'influence des muscles ciliaires il permet le phénomène d'accommodation, indispensable pour permettre la vision de près. Lorsqu'il s'opacifie avec l'âge, la pathologie engendrée est une cataracte.

- Le **vitré**, est une substance gélatineuse transparente composée principalement d'eau, qui occupe les deux tiers du volume postérieur de l'œil. Le vitré est adhérent à la rétine et s'en décolle progressivement avec le temps. En cas de décollement du vitré pathologique (ce qui ne concerne qu'une très faible proportion des cas) il est possible d'observer des pathologies telles que le décollement de rétine ou des tractions vitréo-maculaires.

Enfin après avoir traversé ces différentes structures transparentes, les rayons lumineux convergent sur la rétine et particulièrement en son centre, la macula.

Les voies visuelles comprennent la rétine, le nerf optique, le chiasma optique, les tractus optiques, les corps géniculés latéraux, les radiations optiques et l'aire visuelle primaire au niveau du cortex occipital.

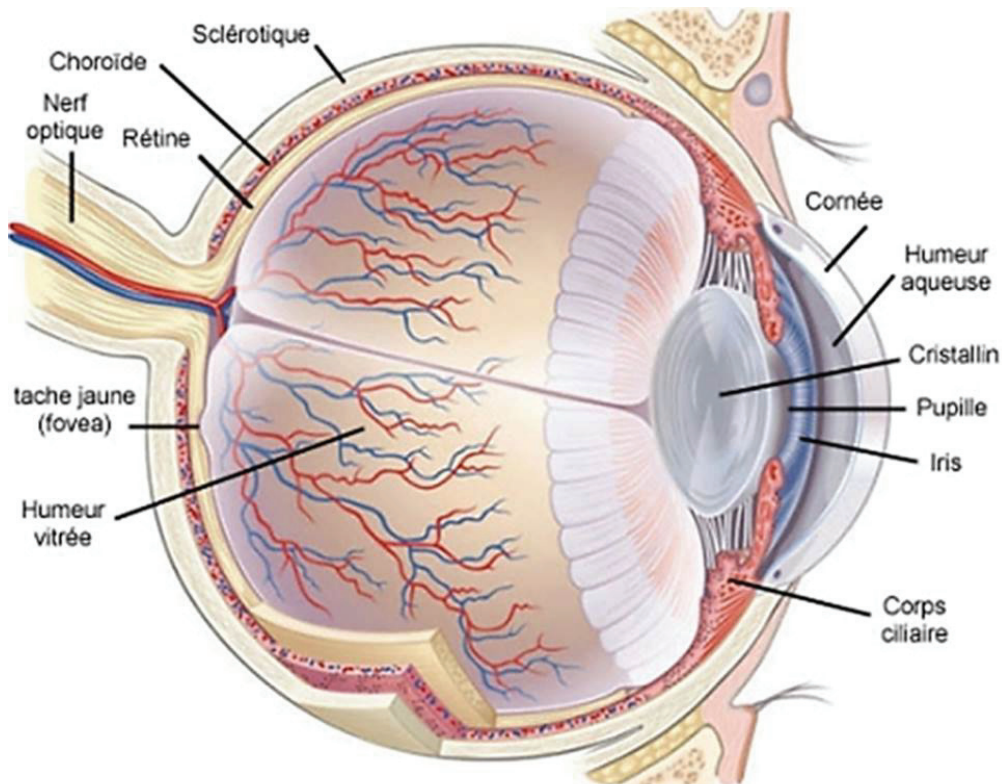


Figure 1 : Anatomie de l'œil

(<http://baladesnaturalistes.hautetfort.com/archive/2012/07/28/des-cellules-souches-dans-la-retine.html>).

1-2 La rétine

La rétine est le tissu responsable de la première étape du traitement des stimuli lumineux, grâce à plusieurs couches de neurones. Ce signal électrique sera ensuite transmis par le nerf optique aux voies optiques jusqu'au cortex occipital, permettant ainsi la formation d'une image. Ce processus est appelé la transduction.

La rétine tapisse la surface intérieure du fond de l'œil et se compose de cellules neuronales successives dont l'aspect des noyaux et connexions synaptiques en histologie s'apparente à des couches successives.

Lors de l'examen du fond d'œil en pratique clinique, après dilatation pupillaire les principaux éléments de la rétine sont visibles : l'extrémité du nerf optique (ou papille optique), les vaisseaux sanguins rétiniens et la macula (Figure 2). La macula est la zone dont dépend la vision centrale de précision. Le reste de la rétine sert à la vision périphérique. Au centre de la macula se trouve la fovéa, appelée également zone avasculaire centrale.

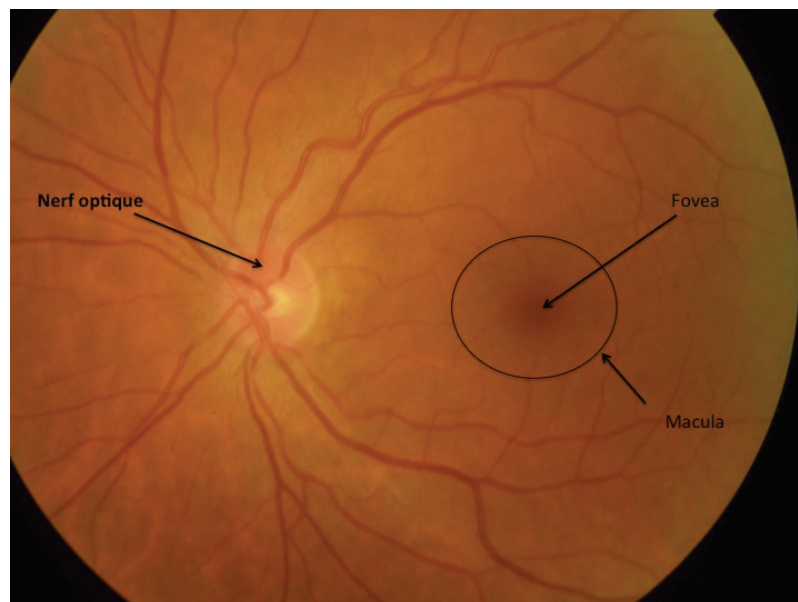


Figure 2 : Photographie couleur d'un fond d'œil gauche (Image Audrey Giocanti/ Avicenne)

Les constituants cellulaires de la rétine sont :

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

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

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

Le réseau vasculaire rétinien est issu de l'artère centrale de la rétine, qui se subdivise en deux branches, supérieure et inférieure, donnant elles-mêmes naissance à deux branches, nasale et temporale. Ce système prend en charge l'apport en besoins métaboliques aux couches internes de la rétine. Artères et artérioles rétiniennes donnent naissance aux capillaires rétiniens. A l'opposé de ceux de la choriocapillaire, les capillaires rétiniens ne sont pas fenêtrés.

1-2.1 La neurorétine

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

La rétine est une structure organisée en dix couches alternées (Figure 3 et 4) : leur alignement a permis de les désigner sous le termes de couches afin d'en faciliter la description. Les couches correspondent à l'alignement des corps cellulaires des neurones ou bien de leurs connexions synaptiques.

On décrit dans le sens de la lumière (d'avant en arrière, figure 3) :

- **La membrane limitante interne (MLI)**, constituée des pieds des cellules gliales de Müller (CGM).
- **La couche des fibres nerveuses** constituée des axones des cellules ganglionnaires et dont les prolongements forment le nerf optique.
- **La couche des cellules ganglionnaires (CCG)**, qui correspond aux corps cellulaires des cellules ganglionnaires.
- **La couche plexiforme interne (CPI)**, qui comprend les synapses formées entre les cellules bipolaire, amacrines et ganglionnaires.
- **La couche nucléaire interne (CNI)**, composée par les corps cellulaires des cellules bipolaires, horizontales, amacrines et CGM.
- **La couche plexiforme externe (CPE)**, qui comprend les synapses formées entre les photorécepteurs et les cellules horizontales.
- **La couche nucléaire externe (CNE)**, formée par les corps cellulaires des photorécepteurs.
- **La membrane limitante externe (MLE)** : correspond aux articles internes des photorécepteurs.
- **La couche IS-OS (actuellement appelée zone ellipsoïde)** correspond à la jonction des articles externes et internes des photorécepteurs.
- **L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR)** qui consiste en une monocouche de cellules qui repose sur la membrane de Bruch. La membrane de Bruch sépare l'EPR de la choriocapillaire.

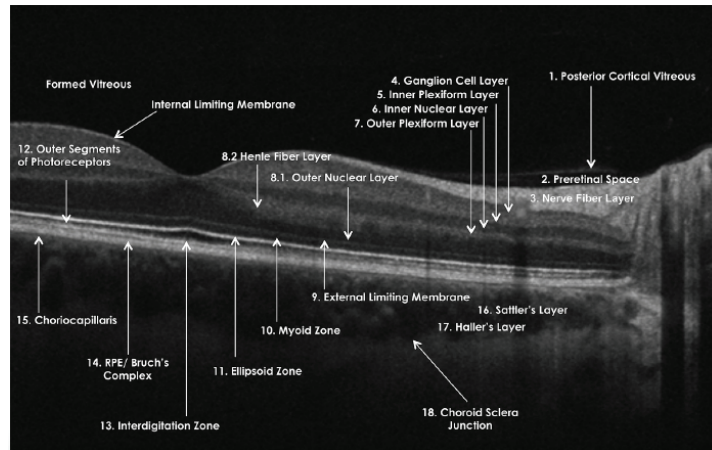


Figure 3 : Différentes couches de la rétine visible en tomographie en cohérence optique (Staurenghi et al. 2014)

Les photorécepteurs (figure 4) sont les cellules les plus profondes, par rapport à l'arrivée de la lumière. Ils sont subdivisés en deux types cellulaires qui sont : les bâtonnets et les cônes. Les bâtonnets permettent surtout une vision de nuit ou lorsque l'environnement est sombre, alors que les cônes permettent d'avoir une vision nette lorsque la lumière est vive, de voir les couleurs et la définition des images. Chez l'homme, la rétine centrale comprend la macula, qui contient en son centre la fovéa, qui est responsable de la vision des détails. Cette région spécialisée, uniquement peuplée de cônes, est l'endroit de la rétine qui permet la meilleure acuité visuelle (Yamada 1969).

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

Les cellules horizontales, forment des synapses avec à la fois les photorécepteurs et les cellules bipolaires. Ces cellules participent à l'inhibition latérale de l'influx nerveux provenant des photorécepteurs par la libération d'acides aminés inhibiteurs, comme le GABA.

Cette inhibition permet de supprimer sélectivement les signaux nerveux superflus, améliorant ainsi le contraste des images visualisées.

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

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

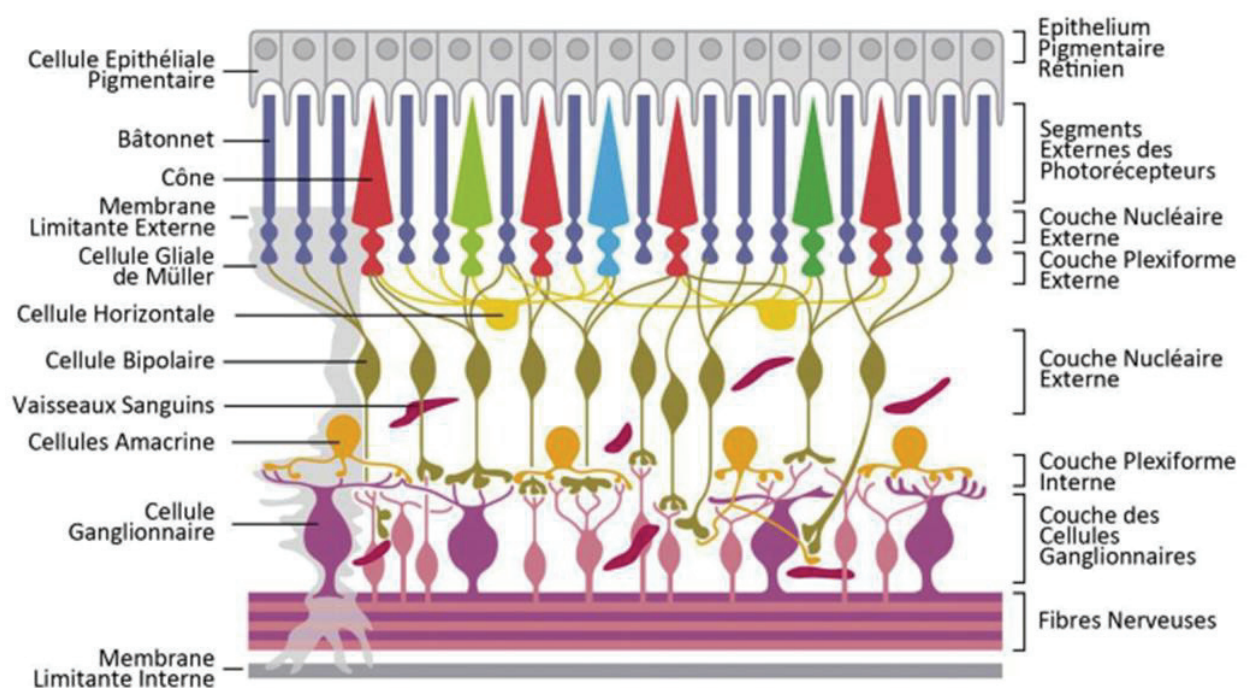


Figure 4. Anatomie de la rétine

(http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM6_15/S1462399404008129sup006.htm).

1-2.2 Les cellules gliales

Les cellules gliales exercent de nombreuses fonctions physiologiques essentielles. Elles sont impliquées dans la réponse aux lésions et dans plusieurs pathologies rétiniennes. La rétine

possède trois types de cellules gliales, les cellules microgliales d'une part et deux types de cellules macrogliales d'autre part, les astrocytes et les cellules gliales de Müller.

1-2.2.1 Les cellules microgliales

Les cellules microgliales sont présentes au niveau de la couche plexiforme interne et des cellules ganglionnaires. Ces cellules sont en moins grand nombre que les autres cellules gliales, mais sont importantes en conditions pathologiques. Ces cellules dérivent des monocytes, cellules immunitaires sanguines de la rétine et ont un rôle de défense. En conditions pathologiques, elles initient un processus d'inflammation et de réparation du tissu. De plus, dans un environnement inflammatoire, les cellules microgliales deviennent très mobiles et migrent vers la rétine externe, pouvant parfois se retrouver au niveau des photorécepteurs en cas d'inflammation importante. Dans des conditions pathologiques, ces cellules microgliales changent de morphologie, avec une augmentation du volume de leurs péricaryons et de leurs prolongements. Il a été montré qu'une stimulation des cellules microgliales rétinienne en culture avec du LPS, provoque une production accrue d'IL-1 β et de TNF- α (A. L. Wang et al. 2005).

1-2.2.2 Les astrocytes

Les astrocytes rétinien, à l'image des astrocytes cérébraux ont des caractéristiques architecturales leur conférant une position idéale permettant de détecter des modifications dans leur microenvironnement et de s'y adapter. Les astrocytes sont situés principalement au niveau de la couche plexiforme interne, la couche des cellules ganglionnaires et des fibres nerveuses de la rétine. Grâce à leurs prolongements ces cellules sont en contact avec les cellules ganglionnaires et les vaisseaux sanguins, contribuant ainsi à l'absorption de certaines

substances liées au métabolisme neuronal et à la stabilisation de la barrière hémato-rétinienne (Gardner et al. 1997).

Par ailleurs, les astrocytes sont des modulateurs intervenant au cours du développement de la vascularisation rétinienne normale. En effet Dorrell et al (Dorrell, Aguilar, et Friedlander 2002) ont montré que le réseau vasculaire superficiel rétinien se développe à partir d'un modèle pré-existant de réseau cellulaire astrocytaire. Et, le réseau superficiel ainsi que le réseau vasculaire profond utilisent les filopodes endothéliales et la R-cadhérine afin de se guider sur cet échafaudage astrocytaire (voire précisions dans le paragraphe astrocytes).

1-2.2.3 Les cellules gliales de Müller

Les cellules gliales de Müller (CGM) sont des cellules gliales importantes, par leur nombre, leur morphologie, leur localisation et leurs fonctions au niveau de la rétine. Ces CGM s'étendent sur toute l'épaisseur de la rétine, avec leur corps cellulaires localisés dans la couche nucléaire interne. A partir de ce corps cellulaire s'étend un prolongement principal qui se termine par un large pied en formant la partie proximale de la CGM, participant ainsi à une séparation avec le vitré, appelée membrane limitante interne (E. A. Newman 1996). Les extrémités distales des CGM participent à la membrane limitante externe autour des photorécepteurs. Les CGM sont ainsi en contact et interagissent avec toutes les cellules rétiniennes, créant de la sorte un lien anatomique et fonctionnel (Figure 5). Leurs prolongements entrent en contact avec les différentes synapses et les vaisseaux sanguins de la rétine, participant ainsi à la formation et au maintien de la barrière hémato-rétinienne (Tout et al. 1993). Les CGM expriment spécifiquement un nombre important de canaux ioniques (exemple : le canal potassique Kir4.1, permettant le tamponnage du potassium), de récepteurs (exemple : les récepteurs au GABA et au glutamate ; qui modulent l'activité neuronale), d'enzymes (exemple : l'anhydrase carbonique, qui permet la conversion du CO₂ en H⁺ et

HCO₃⁻) et de transporteurs transmembranaires (co-transporteur des ions H⁺ et HCO₃⁻, participant à l'élimination de CO₂ produit par l'activité neuronale) (E. A. Newman 1996).

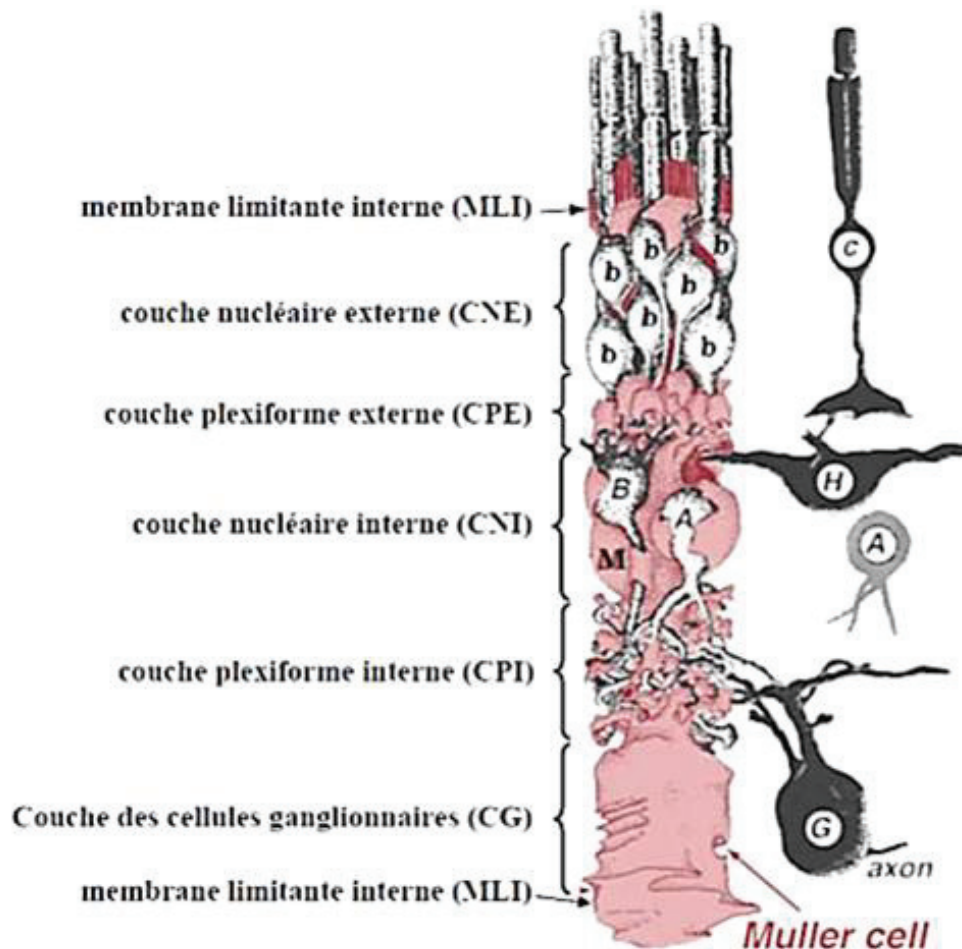


Figure 5 : Représentation schématique des interactions entre la cellule gliale de Müller et les autres neurones de la rétine. c: cône, b: bâtonnet, h: cellules horizontales, B: cellules bipolaires, A: cellules amacrines, M: cellule gliale de Müller, G: cellule ganglionnaire. (<http://webvision.med.utah.edu/book/part-ii-anatomy-and-physiology-of-the-retina/glial-cells-of-the-retina/>)

2. Les dystrophines

2-1 Historique

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

2-2 Le gène

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

2-3 Protéines codées par le gène DMD

Les protéines dystrophines sont nommées par l'abréviation Dp pour « *Dystrophin protein* », suivie du poids moléculaire de la protéine. L'expression du gène DMD est contrôlée par plusieurs promoteurs internes. Ce gène présente trois promoteurs tissus spécifiques (musculaire, cérébral et au niveau des cellules de Purkinje), codant pour un ARNm de 14 Kb pour le produit long de 427 kDa (Dp427) (Tadayoni et al. 2012). D'autres promoteurs internes sont à l'origine de différents produits courts (Figure 6B) :

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

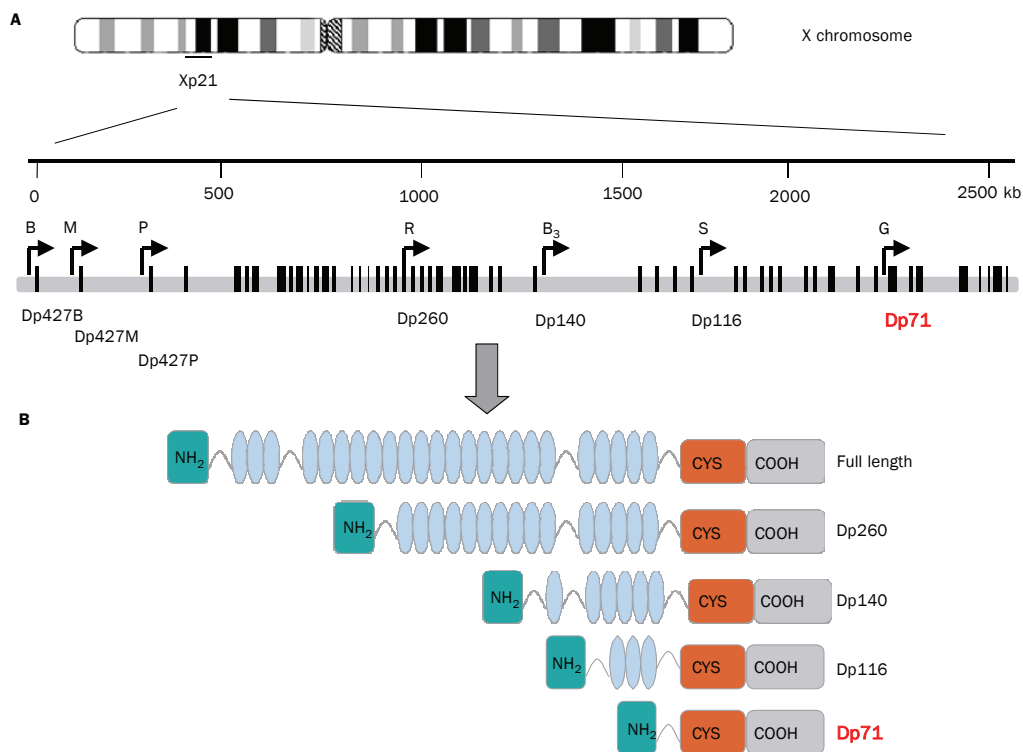


Figure 6. A : Représentation schématique du gène DMD. Les barres verticales représentent les 79 exons. Les flèches indiquent les différents promoteurs tissu spécifiques : Cérébral (B), musculaire (M), des cellules de Purkinje (P), de la rétine (R), des cellules de Schwann (S) et du promoteur général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

2-4 Structure de la protéine dystrophine

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

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

- Un domaine N-terminal de liaison aux filaments d'actines du cytosquelette (Orlova et al. 2001; Renley et al. 1998). Il comprend également deux sites d'interaction avec la calmoduline dénommés CaMBS1 et 2 (CaMBS : Calmodulin binding site) (Bonet-Kerrache, Fabbrizio, et Mornet 1994).
- Un domaine central composé de séquences répétées similaires à la structure triple hélice de la spectrine (Koenig et al. 1987). Ce domaine contient aussi des zones charnières qui sont des séquences non répétées, riches en résidus proline, donnant à la dystrophine sa flexibilité.
- Un domaine riche en cystéines présentant des sites de liaisons au calcium, au zinc et au β -dytroglycane, protéine transmembranaire.
- Le domaine C-terminal permet l'association de la dystrophine avec d'autres protéines, telles que la dystrobrevine et les syntrophines. Les mutations du domaine C terminal sont responsables des phénotypes les plus sévères (Hoffman et al. 1991).

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

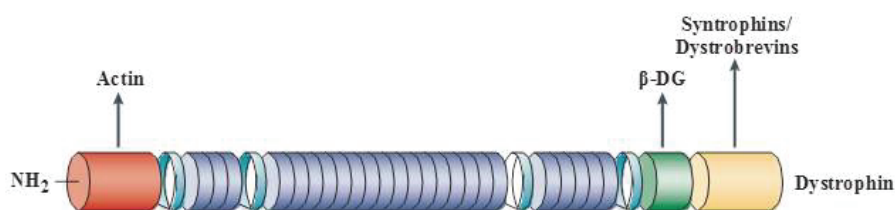


Figure 7 : Structure de la protéine dystrophine (van Deutekom et van Ommen 2003).

2-5 Dystrophines et pathologies

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

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

3. La dystrophine Dp71

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

3-1 La dystrophine Dp71 et les protéines associées

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

Dans le cerveau, au niveau de l'hippocampe, le complexe associé à la Dp71 est composé de l' α -syntrophine, de l' α -dystrobrevine (Blake, Hawkes et al. 1999), du canal aqueux aquaporine-4 (AQP4) (Neely et al. 2001), du β -dytroglycane (Connors et al. 2004). Dans le cerveau, ce complexe Dp71 et DAPs a été localisé au niveau des cellules astrocytaires (Figure 8).

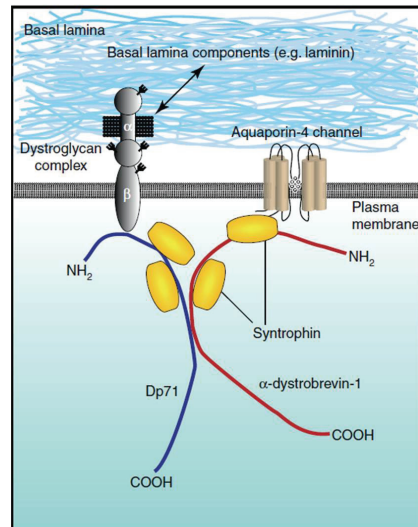


Figure 8 : Représentation schématique du complexe Dp71-DAPs, localisé dans le cerveau, au niveau des prolongements des astrocytes entourant les vaisseaux sanguins (Waite, Brown, et Blake 2012).

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

La protéine Dp71, par sa localisation sous-membranaire et son association au β -dystroglycane (protéine du complexe DAPs) qui se lie à la matrice extracellulaire via l' α -dystroglycane, permet le maintien de la structure de la membrane cytoplasmique. Ce complexe Dp71-DAPs présente aussi un rôle dans la régulation de l'homéostasie ionique et aqueuse via le canal Kir4.1 et le canal AQP4 respectivement (Fort et al. 2008).

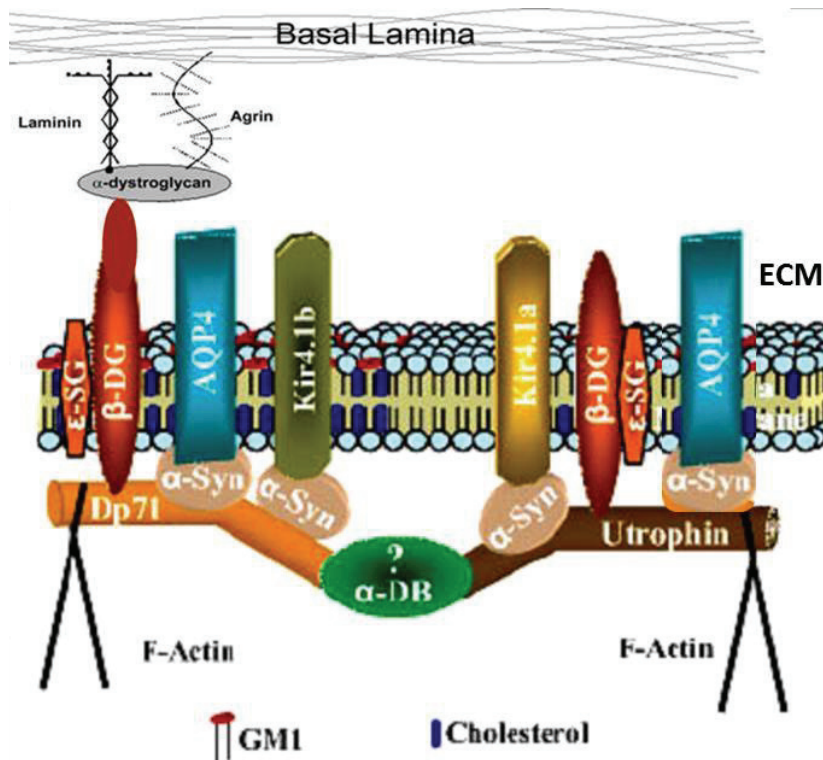


Figure 9 : Représentation schématique du complexe Dp71-DAPs, localisé dans la rétine, au niveau des cellules gliales de Müller. Adaptée de (Fort et al. 2008).

3-2 La Dp71 dans le cerveau

3-2.1 Dp71 et barrière hémato-encéphalique

Dans le cerveau, la Dp71 est exprimée par les astrocytes et les neurones cérébraux (Daoud et al. 2009). Au niveau astrocytaire, la Dp71 est localisée spécifiquement dans la partie périvasculaire de ces cellules, participant ainsi à la mise en place et à la stabilisation de la barrière hémato-encéphalique (BHE) par la formation de l'unité gliovasculaire (Blake et al. 1999). La BHE est un système glio-vasculaire complexe (Figure 10) qui contrôle sélectivement les échanges entre le sang et le tissu nerveux par induction de jonctions serrées et de systèmes de transport spécialisés (Janzer et Raff 1987; Risau et al. 1992; H. Wolburg et al. 1994; Sun, Lytle, et O'Donnell 1997; Hartwig Wolburg et Lippoldt 2002)(B. Nico et al. 2001). Le complexe DAPs est absent ou réduit dans le cerveau des patient atteints de dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et chez la souris *mdx* (Ozawa 1995) un modèle animal de cette maladie (Bulfield et al. 1984) (Figure 11 et 12). Chez la souris *mdx*,

caractérisée par une délétion du gène DMD, inhibant l'expression de la dystrophine Dp427, l'expression de la Dp71 est également fortement réduite dans le cerveau (Beatrice Nico et al. 2010). La structure et la fonction de la BHE sont fortement perturbées chez la souris *mdx*, avec une réduction de l'expression de la protéine zonula occludens-1 (ZO-1) qui participe à la formation des jonctions serrées entre les cellules endothéliales. Cette souris *mdx* présente aussi une réduction de l'expression du canal aqueux AQP4 localisé au niveau des astrocytes (Beatrice Nico et al. 2003). La protéine AQP4 en association à la dystrophine Dp71 est impliquée dans l'homéostasie aqueuse et le maintien de la BHE (Nicchia et al. 2004). En parallèle de ces anomalies structurelles et cellulaires, cette souris développe aussi une forte inflammation cérébrale, avec une augmentation de l'expression du facteur VEGF (vascular endothelial growth factor), ainsi qu'une surexpression de son récepteur de type 2, le VEGFR2 (Beatrice Nico et al. 2002). De plus, les métalloproteinases matricielles, MMP-2 et MMP-9 impliquées dans l'altération de la BHE, sont surexprimées chez la souris *mdx* (B. Nico et al. 2006). Les astrocytes cérébraux apparaissent également anormaux dans ce modèle de souris. Toutes ces anomalies, pourraient participer à l'augmentation de la perméabilité vasculaire trouvée chez la souris *mdx* (Beatrice Nico et al. 2003).

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

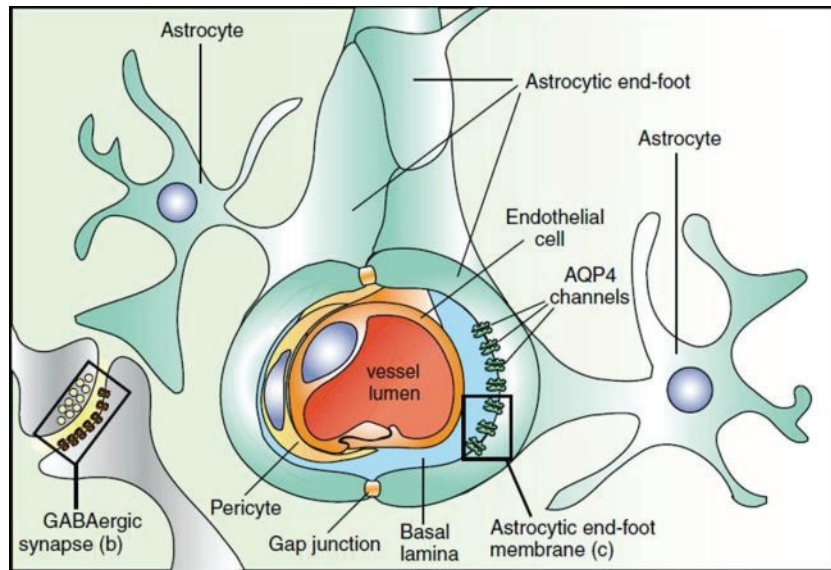


Figure 10: Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique (Waite, Brown, et Blake 2012).

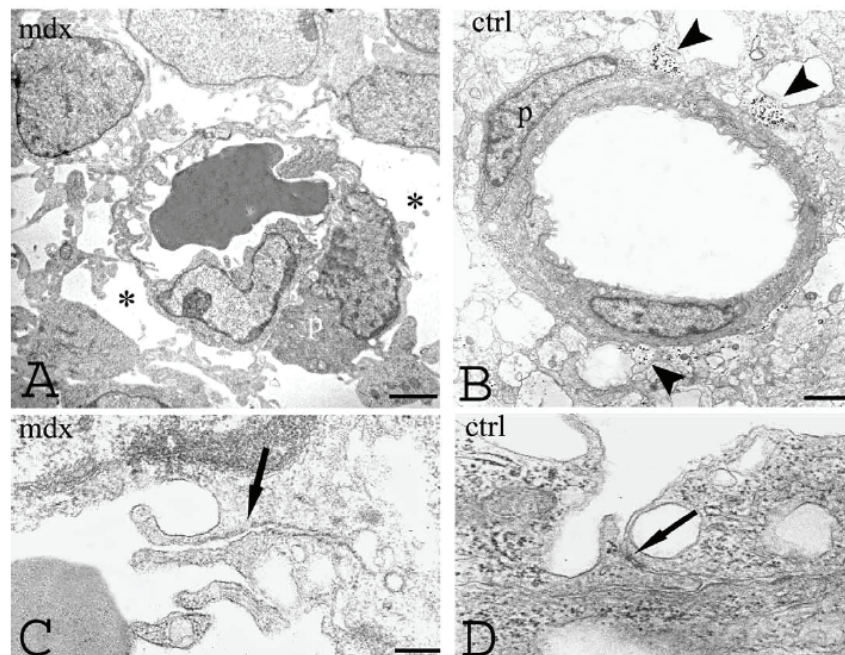


Figure 11: Anomalies de développement de la BHE à P16. Les souris mdx présentent un endothélium irrégulier soutenu par des péricytes (p) qui entourent la lumière vasculaire. Chez la mdx, il existe de larges espaces péri-vasculaires qui entourent les cellules endothéliales (astérisque) dont les membranes plasmiques sont adjacentes. On note en C un espace entre les membranes plasmiques des cellules endothéliales dépourvu de jonctions serrées (TJ : tight junctions) (flèche), alors que les cellules endothéliales apparaissent bien jointives en D. On note les pieds astrocytaires périvasculaires chez la souris contrôlée (B, tête de flèche) contenant des granules de glycogène. (B. Nico et al. 2004)

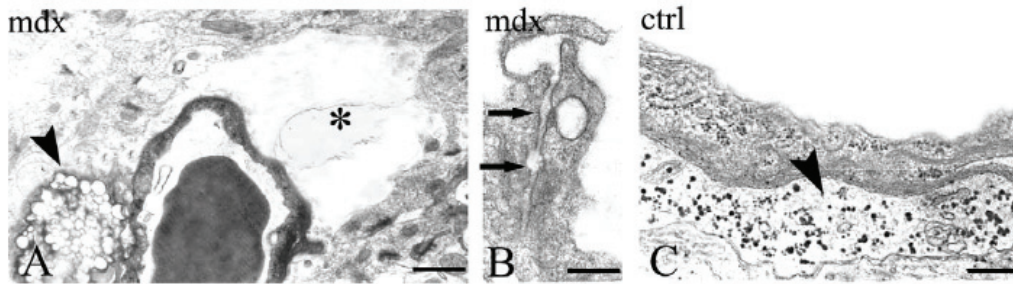


Figure 12: Aspects ultrastructuraux en microscopie électronique d'un vaisseau de souris MDX enveloppé par des pieds astrocytaires renflés (A , astérisque) et vacuolisés (A , flèche) bordés par l'endothélium montrant une altération des TJ détachées permettant de visualiser des espaces entre les membranes plasmiques de cellules endothéliales contigües (B , flèches). En C, les aspects ultrastructuraux du mur d'un vaisseau contrôle montrant un endothélium régulier enveloppé par une membrane basale et par des pieds astrocytaires contenant des granules de glycogène (tête de flèche) (B. Nico et al. 2004)

3-2.2 Dp71 et troubles cognitifs

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

La protéine Dp71 est fortement exprimée dans le gyrus dentelé de l'hippocampe, au niveau neuronal, dans les zones postsynaptiques (Jancsik et Hajós 1999; Górecki et Barnard 1995). La délétion de la protéine Dp71 chez la souris Dp71-null, est à l'origine de l'augmentation de la transmission glutamatergique associée à une réduction de la plasticité synaptique au niveau des neurones CA1 de l'hippocampe. De plus, une perte de l'apprentissage spatial et de la mémorisation, associée à une réduction du nombre des synapses excitatrices, ainsi qu'à une altération morphologique de la zone postsynaptique ont été mises en évidence chez la souris Dp71-null (Daoud et al. 2009).

3-3 La Dp71 dans la rétine

La dystrophine Dp71 est exprimée dans les CGM (Claudépierre, Mornet, et al. 2000), comme nous le verrons dans le paragraphe consacré à ce type cellulaire. Il a été montré précédemment au sein de notre équipe que la dystrophine Dp71 associée au complexe des DAPs, jouaient un rôle clé dans le maintien de la BHR (Sene et al. 2009). En effet, en l'absence de cette protéine, il existe une augmentation significative de la perméabilité vasculaire mesurée par la méthode du bleu Evans (Xu, Qaum, et Adamis 2001), traduisant la perte de l'étanchéité de la BHR interne et la mise en communication des fluides et certaines macro molécules habituellement intra-vasculaires avec la neuro-rétine. Cette rupture de la BHR, pourra se traduire dans certaines conditions, en ophtalmologie clinique, par la présence d'un œdème maculaire (OM), souvent responsable d'une baisse d'acuité visuelle (Bresnick 1983; Larsen, Wang, et Sander 2005). L'œdème peut contribuer à la dégénérescence des photorécepteurs, à la mort des cellules neuronales par compression des fibres nerveuses, des neurones et des capillaires rétiniens. Le développement d'un OM dépend de 2 paramètres : le flux de liquide entrant dans le parenchyme rétinien à travers les parois des vaisseaux devenus perméables, et le taux de réabsorption de fluide à partir du tissu rétinien vers la circulation sanguine. L'absorption de fluide est assurée par l'EP (qui absorbe le fluide des espaces sous rétiniens) et par les CGM (qui absorbent le fluide de la rétine interne par transport d'eau transcellulaire) (Bringmann, Reichenbach, et Wiedemann 2004). L'OM peut être causé par une rupture de la BHR interne (fuites vasculaires provoquant un œdème extracellulaire) ou/et par un gonflement des CGM (œdème intracellulaire, cytotoxique). Il a été montré que l'œdème maculaire diabétique cliniquement significatif se produit uniquement lorsque (en plus de la fuite vasculaire) les mécanismes de transport actif des barrières hémato-rétiniennes sont défectueux (Mori et al. 2002). Ce qui suggère qu'une perturbation de la réabsorption du fluide rétinien est une étape nécessaire dans la formation de l'OM.

4. Les astrocytes

4-1 Fonctions et pathologies astrocytaires dans le cerveau

4-1.1 Astrocytes et développement vasculaire cérébral

Parmi les fonctions auxquelles participent les astrocytes dans le cerveau figure le développement vasculaire basé sur le principe de l'angiogénèse. L'angiogénèse (processus physiologique de formation de nouveaux vaisseaux à partir d'un réseau vasculaire pré-existant) est indispensable au développement embryonnaire et à la cicatrisation. Une dérégulation de l'angiogénèse est impliquée dans des processus pathologiques tels que le cancer, l'ischémie et certaines pathologies rétiniennes. L'angiogénèse, en conditions physiologiques est contrôlée par des molécules pro angiogéniques telles que les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF) (Folkman et Shing 1992), le facteur de croissance vasculaire (VEGF) (Ferrara et al. 1992), l'angiogénine (Fett et al. 1985), le facteur de croissance transformant (TGF) (Derynck 1990), l'interféron (Brem et al. 1993), le facteur de nécrose tumorale (TNF) (Beutler et Cerami 1986), et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (Ishikawa et al. 1989).

Dans le système nerveux central, il a été démontré qu'un réseau d'astrocytes pré-établi est crucial pour le développement vasculaire. Un rôle potentiellement direct des astrocytes dans la promotion de l'angiogénèse cérébrale par interaction avec les expansions des vaisseaux sanguins et les cellules endothéliales a été suggéré (Ma, Kwon, et Huang 2012a). En effet, l'inhibition génétique conditionnelle de l'astrogliogénèse durant la période périnatale, par l'inhibition d'un progéniteur glial *orc3*, gène nécessaire à la réplication de l'ADN, réduit dramatiquement le nombre de cellules progénitrices gliales de la zone sous-ventriculaire, et le nombre d'astrocytes dans le cortex cérébral postnatal précoce et retarde ainsi l'astrogliogénèse. Ceci résulte en une diminution de la densité et des ramifications des

vaisseaux sanguins corticaux. Ces éléments correspondent à une croissance retardée des vaisseaux mais sans régression de la densité vasculaire. De façon concomitante, une prolifération cellulaire endothéliale, un élargissement de la lumière des vaisseaux, et une augmentation de l'expression des gènes de cytosquelette des péricytes ont été observés, ce qui suggère des mécanismes compensatoires. Ces résultats suggèrent l'importance des astrocytes cérébraux dans la promotion de la croissance vasculaire cérébrale durant le développement (Ma, Kwon, et Huang 2012a).

4-2.2 Astrocytes et barrière hémato-encéphalique

Les astrocytes font partie de la barrière hémato encéphalique (BHE), et contrôlent non seulement le développement des jonctions serrées (TJ), mais également l'expression de protéines associées aux TJ telle que zonula occludens 1 (ZO-1) (Krause et al. 1991; Gardner 1995). ZO-1 est une phosphoprotéine de 210-225 kDa qui s'associe à d'autres protéines cytoplasmiques au sein des TJ, telles que ZO-2, ZO-3, cinguline, 7H6 (Stevenson et al. 1986; Citi et al. 1988; Balda et al. 1993; Jesaitis et Goodenough 1994; Zhong et al. 1994) et avec des protéines transmembranaires telles que l'occludine, les molécules d'adhésion jonctionnelles (JAM) ainsi que les protéines de la superfamille des claudines (Furuse et al. 1993; Martin-Padura et al. 1998). De plus, ZO-1 est connectée au cytosquelette via l'actine (Itoh et al. 1997; Fanning et al. 1998) et cette connexion est importante dans la polarisation des cellules endothéliales et la régulation de la perméabilité vasculaire.

4-2.3 Astrocytes et neurotransmission

Dans le cerveau, les astrocytes et neurones sont en contact étroit, permettant des interactions métaboliques entre ces 2 types cellulaires. Ainsi, au cours des dernières années, de nombreuses fonctions ont été reconnues aux astrocytes (E. A. Newman 2001). Parmi celles-ci

figure la constitution de l'architecture cérébrale au cours du développement. Les astrocytes embryonnaires de la glie radiaire servent de « rails » lors de la migration des neurones immatures de l'espace périventriculaire vers les couches externes du cortex cérébral. L'astrocyte est également nécessaire à la formation de la barrière hémato-encéphalique (BHE). De plus, son rôle majeur dans la formation et la plasticité des synapses entre neurones a été mis en évidence (Rakic 2002; Haydon 2001). Par ailleurs, l'astrocyte est le seul lieu de stockage du glucose dans le système nerveux central, donc la seule source énergétique des neurones, et les facteurs de croissance libérés par les astrocytes sont essentiels à la conservation des fonctions neurales et à la survie cellulaire.

Un des exemples de cette interaction est la synthèse de novo de glutamate et d'acide γ -aminobutyrique (GABA) ainsi que la recapture de ces 2 neurotransmetteurs. La recapture par les astrocytes permet de maintenir des concentrations synaptiques basses et ainsi d'éviter l'excitotoxicité (Rothstein et al. 1996). Ainsi les neurones et astrocytes cérébraux sont impliqués dans le cycle glutamate-glutamine dans lequel le glutamate libéré par les neurones est capturé par les astrocytes et notamment par le transporteur glutamate aspartate (GLAST) (Storck et al. 1992) et le transporteur du glutamate 1 (GLT1) (Lehre et al. 1995). Les astrocytes participent également au maintien de la BHE. En conditions pathologiques, lorsque les astrocytes sont activés, la BHE peut être altérée et aboutir à la formation d'un œdème cérébral lié à une issue anormale de plasma à travers la barrière (Chapouly et al. 2015). Les différents rôles des astrocytes dans le cerveau sont nombreux et résumés dans le tableau suivant (Table 1).

Table 1 : Principales fonctions des astrocytes/ Références

Production et relargage de facteurs de croissance : NGF, BDNF, FGF-2, PDGF, GDNF, TGF β	(Raff et al. 1988) Rudge et al. (1993)
Régulation de l'environnement extra-cellulaire : - Homéostasie des ions H ⁺ - Détoxification en ion ammonium - Elimination des radicaux libres - Tamponnage des ions K ⁺	(Norenberg 1987; Walz 1989; Copin, Ledig, et Tholey 1992; Ransom et Sontheimer 1992; Makar et al. 1994)
Support pour les neurones : - Apport précurseurs du TCA - Recapture des neurotransmetteurs - Maintien d'un niveau stable de Glutathion	(Schousboe 1981; Cataldo et Broadwell 1986; Martin 1992; X. F. Wang et Cynader 2000; Shanker et al. 2001)

NGF, nerve growth factor; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; FGF-2, fibroblast growth factor 2 ; PDGF, platelet-derived growth factor ; GDNF, glial cell-derived neurotrophic factor, TGF β , transforming growth factor bêta ; TCA, cycle de l'acide citrique (Sidoryk-Wegrzynowicz et al. 2011)

4-1.4 Astrocytes et pathologies cérébrales

Du fait de leurs rôles multiples dans diverses fonctions du SNC, une dérégulation de la fonction astrocytaire normale peut contribuer à causer ou aggraver un grand nombre de pathologies neurologiques ou psychiatriques telles que le Syndrome de RETT, ou le syndrome de l'X fragile, qui sont des pathologies syndromiques compliquées d'autisme. Des anomalies astrocytaires peuvent également être impliquées au cours de maladies neurodégénératives telles que la sclérose en plaque, la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique (SLA), ainsi que la maladie de Huntington (Molofsky et al. 2012). L'incrimination des astrocytes au cours de ces pathologies est difficile à prouver mais il semble que les différents modèles animaux de ces maladies convergent tous vers l'hypothèse d'anomalies astrocytaires (Molofsky et al. 2012).

Par ailleurs, au cours des pathologies cérébrales, les astrocytes semblent également modifier leur phénotype. Leur morphologie s'altère par épaissement de leurs procès. En plus de changements morphologiques, une gliose astrocytaire (activation des astrocytes)

s'accompagne d'altérations de l'expression génique de ces cellules. Des études récentes ont démontré que plusieurs centaines de gènes pourraient être surexprimés au cours de la gliose astrocytaire (Cahoy et al. 2008). Il s'agit principalement de gènes codant pour des protéines du cytosquelette tels que la Vimentine, GFAP et Nestine, des facteurs de survie neuronaux ainsi que de nombreux gènes codant pour des cytokines, chémokines et protéines impliqués dans la cascade du complément (Cahoy et al. 2008).

4-2 Fonctions et pathologies astrocytaires dans la rétine

4-2.1 Astrocytes et développement vasculaire rétinien

De la même façon que dans le cerveau, les cellules endothéliales du réseau vasculaire rétinien superficiel de la rétine se développent en migrant sur un réseau astrocytaire rétinien pré-établi (Dorrell, Aguilar, et Friedlander 2002). Ce réseau astrocytaire sous-jacent émerge depuis la tête du nerf optique (Marcus Fruttiger 2007; Huxlin, Sefton, et Furby 1992; Watanabe et Raff 1988) vers la périphérie rétinienne. Les plexi vasculaires rétiniens superficiel et profond utilisent le contact entre les expansions filopodiales des cellules endothéliales et une molécule d'adhésion cellulaire R-Cadhérine, comme système de guidage.

Notre connaissance des mécanismes guidant le développement de réseaux vasculaires complexes rétiniens est cependant limitée. Une approche conceptuelle est de considérer le rôle des molécules d'adhésion cellulaire, telles que les intégrines et les cadhérines, ainsi que les molécules de la matrice extra-cellulaire (MEC) dans la régulation des interactions entre les cellules endothéliales en prolifération et leur environnement extracellulaire.

Chez la souris normale, à P0 (naissance), la vascularisation rétinienne est absente. Durant les 3 premières semaines de vie, un plexus vasculaire rétinien adulte se développe par migration et prolifération des cellules endothéliales depuis l'artère centrale de rétine vers la périphérie rétinienne (Figure 13). En plus de cette extension longitudinale des cellules endothéliales,

permettant la formation du plexus vasculaire superficiel rétinien, des expansions des cellules endothéliales plongent de la superficie de la rétine vers les couches plus profondes afin de former les plexi vasculaires rétiniens profonds (Figure 14).

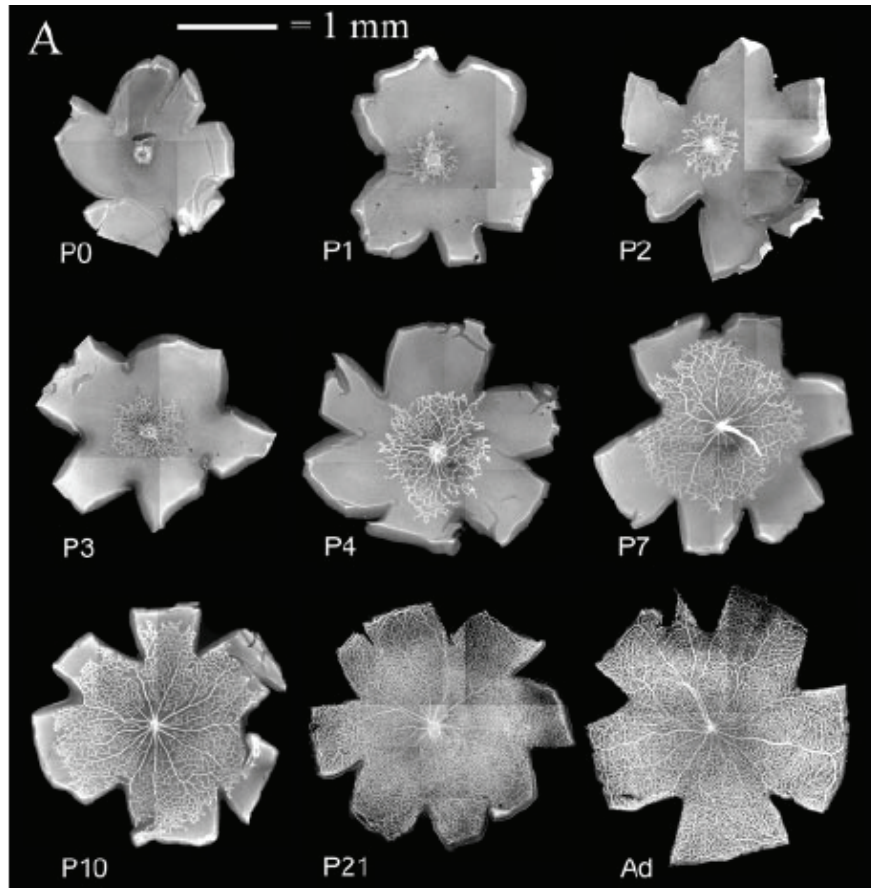


Figure 13: Développement du réseau vasculaire superficiel (jusqu'à P10) puis le réseau se densifie par superposition sur les rétines à plat du plexus superficiel et profond (Dorrell, Aguilar, et Friedlander 2002)

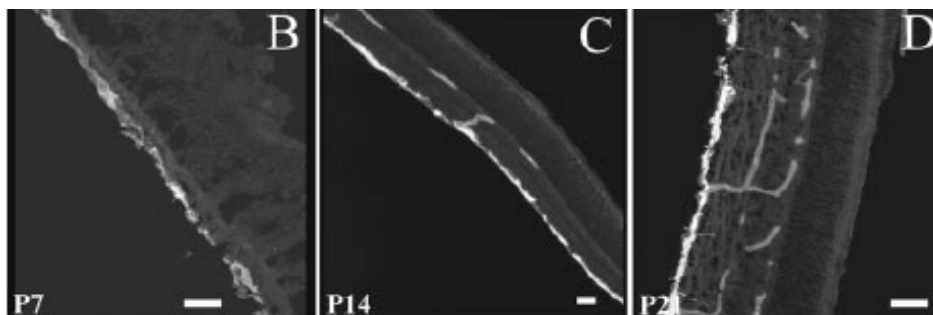


Figure 14: Rétine en coupe objectivant à P7 le marquage des vaisseaux par le collagène IV. Les vaisseaux sont présents à P7 à la superficie de la rétine, puis se développent en plongeant progressivement dans les couches plus profondes de la rétine (Dorrell, Aguilar, et Friedlander 2002)

Ce réseau vasculaire forme trois plexi vasculaires au niveau de la rétine interne chez la souris : le plexus superficiel localisé au niveau des cellules ganglionnaires, le plexus intermédiaire situé au niveau de la couche plexiforme interne et le plexus profond situé au niveau de la couche plexiforme externe de la rétine. Dans le plexus superficiel, les artérioles sont prédominantes, alors que le plexus profond contient un plus grand nombre de veinules. Le plexus intermédiaire est formé de vaisseaux orientés perpendiculairement aux vaisseaux des plexi superficiel et profond. La majorité des micro-vaisseaux (environ 70%), ont tendance à orienter le flux artériolaire du plexus superficiel vers le plexus profond. De manière symétrique, la circulation veineuse provenant du plexus profond, rejoint les veines du plexus superficiel via les veinules du plexus intermédiaire (Figure 15) (Paques et al. 2003).

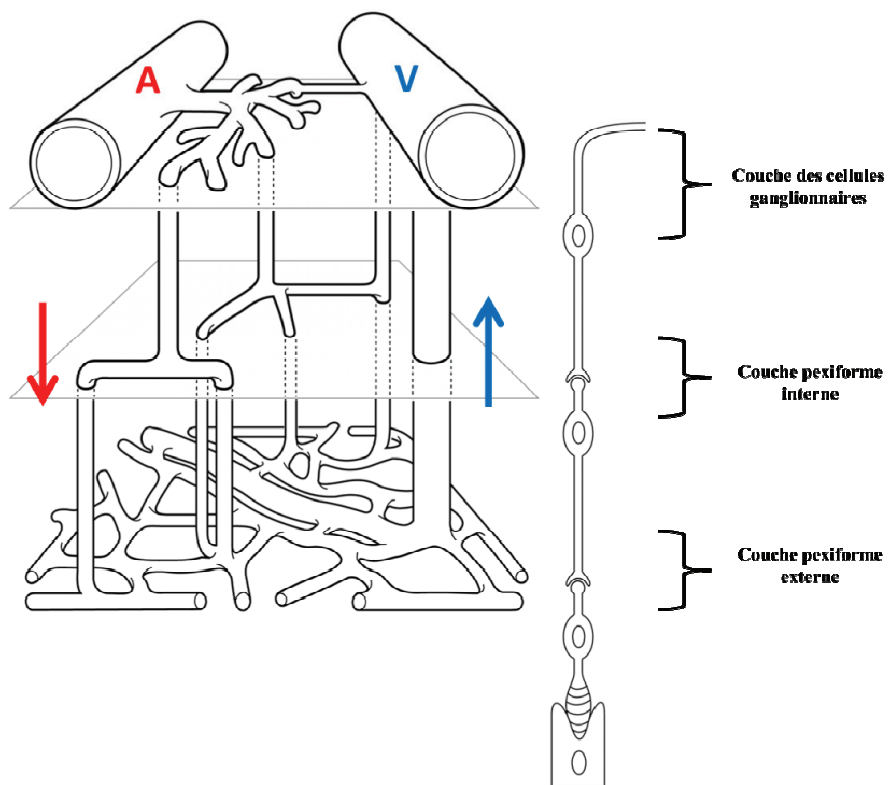


Figure 15 : Représentation schématique de l'architecture vasculaire et de la circulation du sang de la rétine. A: artériole; V: veinule; flèches: circulation du sang. Figure adaptée de (Paques et al. 2003)

Dorrell et al, (Dorrell, Aguilar, et Friedlander 2002) ont examiné des rétines de souris à différents temps du développement post natal en utilisant un marqueur spécifique des cellules astrocytaires (GFAP spécifique) permettant ainsi d'observer que les astrocytes rétiniens sont présents loin devant le front de migration vasculaire sur la rétine. Les astrocytes sont présents dès la naissance jusqu'en périphérie de la rétine (Figure 16). C'est sur ce réseau astrocytaire pré-établi à la naissance que migrent les cellules endothéliales pour former ainsi le réseau vasculaire rétinien superficiel. Les cellules endothéliales ne sont jamais observées dans des zones sans astrocytes.

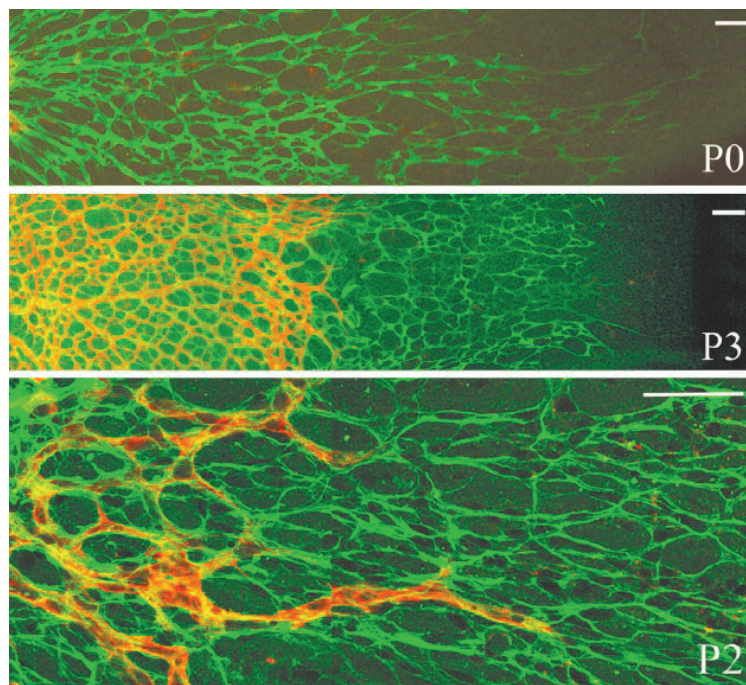


Figure 16 : A la naissance (P0), le réseau astrocytaire (image du haut) est déjà présent jusqu'en périphérie rétinienne (en vert), le réseau vasculaire rétinien superficiel ne s'est pas encore développé. A P3 (image du milieu), le réseau vasculaire superficiel rétinien est en cours de constitution par migration des cellules endothéliales sur un réseau pré-établi de cellules astrocytaires. Un fort grossissement, à P2 (image du bas) permet d'observer la parfaite co-localisation entre cellules endothéliales et astrocytes. (Dorrell, Aguilar, et Friedlander 2002)

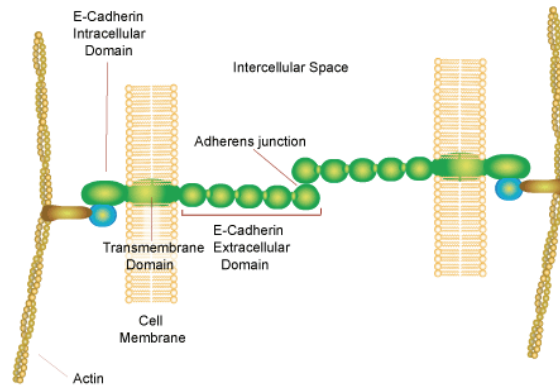


Figure 17 : Les cadhérines sont des molécules d'adhésion intercellulaire qui fonctionnent par dimérisation des domaines extra-cellulaires de la protéine. (<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/structural-proteins/cadherin.html>)

Le contact entre les cellules endothéliales en migration au cours du développement et le réseau astrocytaire pré établi a été attribué en partie à la protéine R-Cadhérine, un membre de la superfamille des molécules d'adhésion intercellulaire calcium dépendantes (figure 17). Ce rôle est suspecté par la mise en évidence d'un profil d'expression de cette protéine durant les premiers jours de vie parfaitement superposable à la croissance vasculaire rétinienne (voir figure 18).

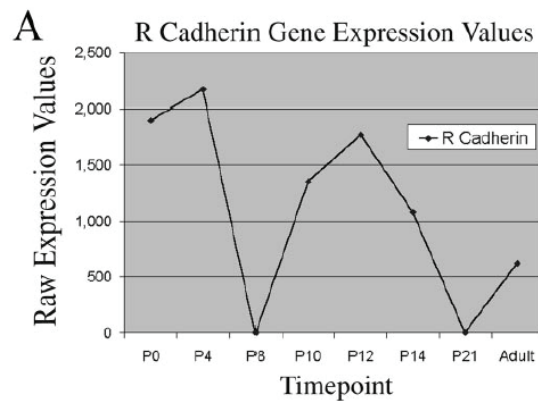


Figure 18 : Profil d'expression de la R-cadhérine durant les premiers jours de vie. (Dorrell, Aguilar, et Friedlander 2002)

Par ailleurs, des anticorps prévenant la dimérisation de la R-cadhérine, injectés par voie intravitréenne chez la souris au cours de son développement vasculaire rétinien, empêchent le lien entre les cellules endothéliales et les astrocytes (Dorrell, Aguilar, et Friedlander 2002). Les vaisseaux rétiens des souris injectées par anti R-cadhérines ne se développent pas jusqu'en

périphérie rétinienne, contrairement aux vaisseaux pour lesquels la dimérisation de la R-Cadhérine n'est pas empêchée (Figure 19).

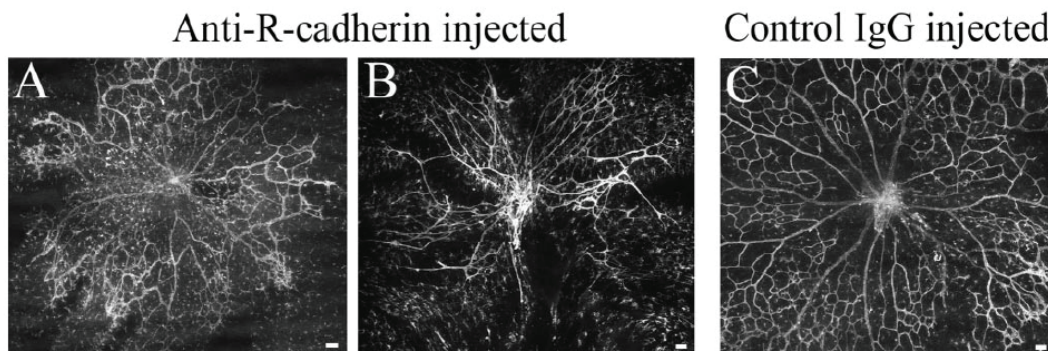


Figure 19 : En A et B, rétine à plat de 2 souris différentes injectées par inhibiteurs de la R-Cadhérine, dans lesquelles le développement vasculaire rétinien superficiel n'atteint pas la périphérie rétinienne. En C, développement du réseau vasculaire superficiel normal, chez une souris injectée avec une IgG contrôle. (Dorrell, Aguilar, et Friedlander 2002)

Les mécanismes impliqués dans le guidage vasculaire par les astrocytes durant le développement, ne sont pas complètement élucidés. Certaines pistes existent cependant : le *Tlx*, un récepteur nucléaire orphelin impliqué dans le développement du système nerveux, ainsi que dans la neurogénèse chez l'adulte (Qin et al. 2014), est également responsable de la migration astrocytaire harmonieuse sur la rétine. En effet, en absence de *Tlx* chez des souris mutées, le développement astrocytaire est désorganisé (figure 20), et la vascularisation rétinienne est absente (Miyawaki et al. 2004) (Figure 21). Egalement, les études au cours desquelles le niveau de PDGF est altéré montrent que la formation du réseau astrocytaire dépend du taux de PDGF. A l'appui de cette hypothèse, une étude menée par Fruttiger (M. Fruttiger et al. 1996) a montré qu'une hyperexpression astrocytaire obtenue par la surexpression de PDGF, qui est un mitogène pour les astrocytes rétiniens (M. Fruttiger, Calver, et Richardson 2000), entraîne une augmentation de la vasculogénèse. Une inhibition du PDGF résulte à l'opposé en une réduction et une distorsion de la formation du réseau

astrocytaire. Cependant les mécanismes intrinsèques qui régulent la densité et la morphologie du réseau astrocytaire ne sont pas clairement établis.

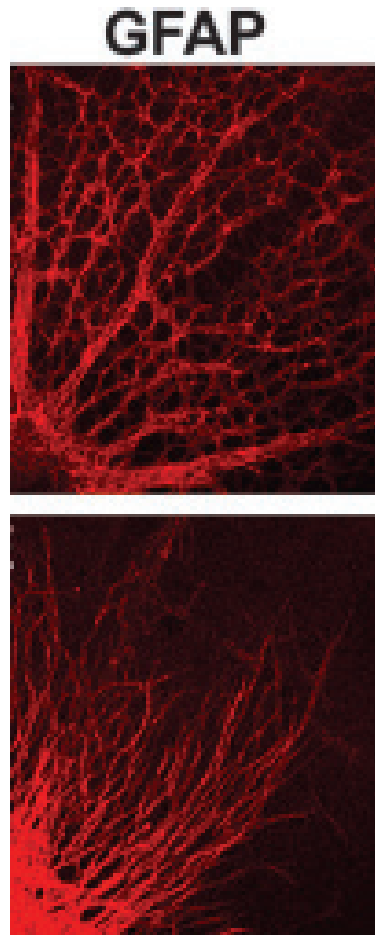


Figure 20 : Aspect des astrocytes rétiniens (en rouge) à P7 chez une souris sauvage en haut et chez une souris mutée pour le gène *Tlx* en bas. Chez la souris mutée, les astrocytes ne sont pas harmonieusement répartis sur toute la surface rétinienne, et ne sont pas organisés en réseau comme c'est le cas chez la souris sauvage. (Miyawaki et al. 2004)

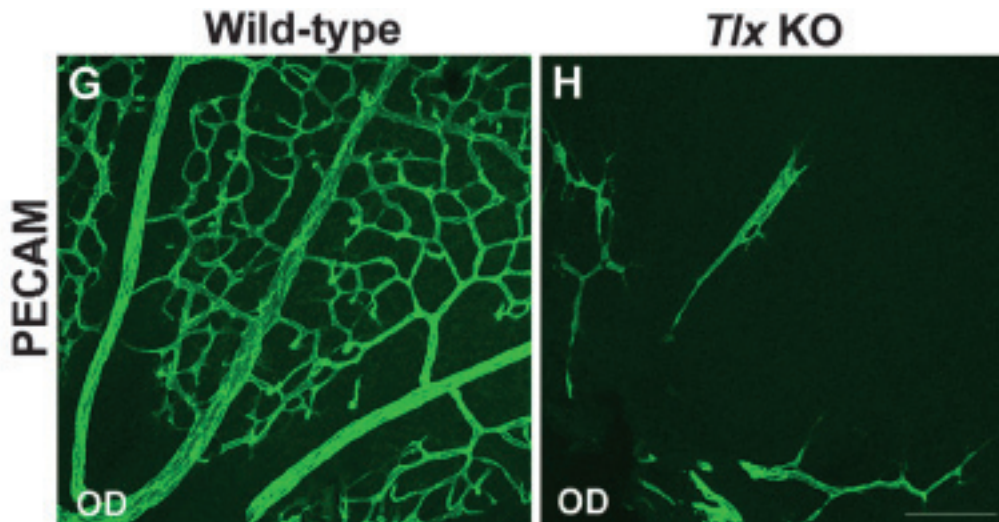


Figure 21 : A P7, rétine à plat objectivant un réseau vasculaire normal chez la souris sauvage. A droite, la rétine à plat objective une absence de développement vasculaire chez la souris muté pour *Tlx* (Miyawaki et al. 2004)

4-2.2 Astrocytes et BHR

Afin d'étudier le développement vasculaire rétinien il faut également apprécier la formation de la barrière hémato rétinienne (BHR). Il existe 2 BHR, la BHR interne autour des vaisseaux rétiniens et la BHR externe proche des vaisseaux choroïdiens formée par les cellules de l'EP (Choi et Kim 2008; I. S. Lee et al. 2011; Toda et al. 2011).

La BHR interne joue un rôle capital en séparant la neuro-rétine, du contenu vasculaire. Elle est composée des cellules endothéliales unies entre elles par des jonctions serrées, et entourées par les péricytes, les pieds des CGM et des astrocytes (Choi et Kim 2008; I. S. Lee et al. 2011; Toda et al. 2011). Cette BHR est probablement formée par une induction coordonnée de ces différents types cellulaires qui sécrètent des cytokines et conduisent au développement de jonctions serrées (Choi et Kim 2008; I. S. Lee et al. 2011; Toda et al. 2011) au cours du développement vasculaire (figure 22).

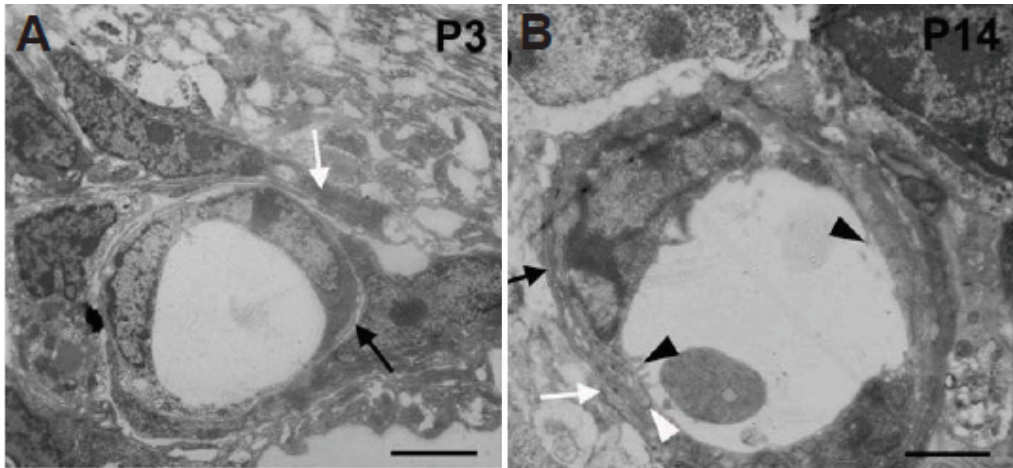


Figure 22 : **A.** Développement de la BHR interne à P3 (au niveau de la couche des fibres nerveuses). **B.** Développement de la BHR interne à P14. Membrane basale (flèche noire) et les pieds des cellules astrocytaires (flèches blanches) (Yao et al. 2014)

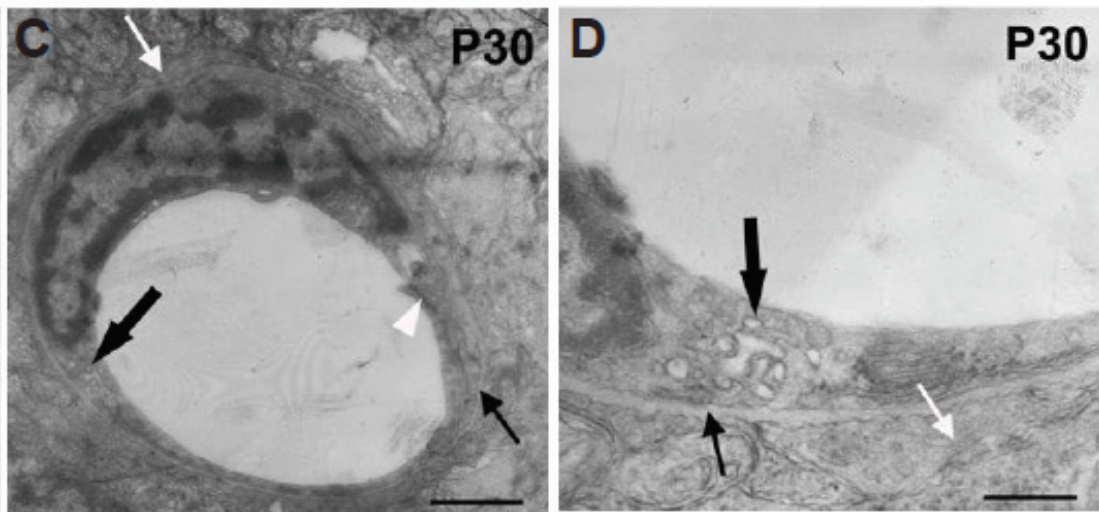


Figure 22 C et D : Développement de la BHR interne à P30 (au niveau de la plexiforme externe) Yao HL et al. 2014

Chez la souris, la BHR est visible au niveau de la couche des fibres nerveuses dès P3 (Figure 22A). Elle est alors composée de cellules endothéliales, de la lame basale et des pieds des astrocytes. A cet âge, aucune jonction serrée n'est visible entre les cellules endothéliales. Le développement de la lame basale (flèche noire) et des pieds des astrocytes (flèche blanche) sont encore incomplets. Puis, progressivement (Figure 22B), les cellules endothéliales deviennent plus matures et sont dotées de nombreuses microvillosités à la surface de la lumière des capillaires à P14 (têtes de flèches noires).

Enfin, l'ultrastructure de la BHR interne au niveau de la plexiforme externe (plexus vasculaire rétinien le plus profond) devient mature à P30 (Figure 22C). A ce stade l'endothélium au contact de la lumière vasculaire est lisse, avec des jonctions serrées entre les cellules endothéliales (têtes de flèches blanches), et la membrane basale est complète. Un fort grossissement (Figure 22D) permet d'observer une membrane basale typique (flèche noire fine), entourée par les pieds astrocytaires (flèche blanche). A l'intérieur des cellules endothéliales, de nombreuses organelles sont visibles, telles que des vésicules d'endocytose (flèche noire épaisse).

Les astrocytes, en plus de leur participation au maintien de la BHR interne, participent également à la régulation de l'homéostasie rétinienne. En effet, ils sont pourvus de canaux potassiques et participent également au tamponnage spatial des ions K^+ (Figure 23).

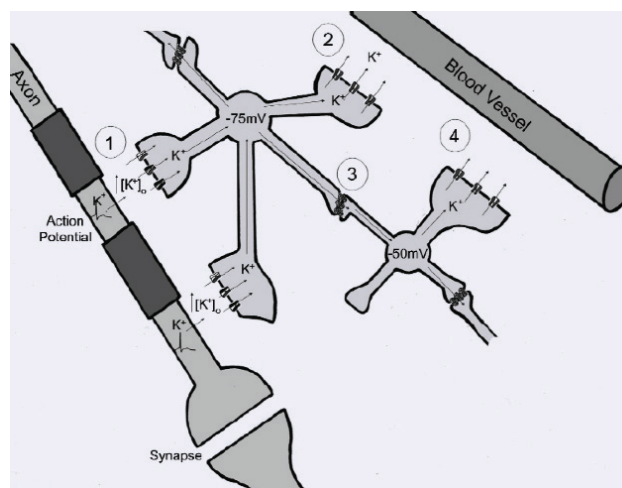


Figure 23 : Schéma du phénomène de tamponnage spatial du K^+ (potassium siphoning) effectué par les astrocytes dans le système nerveux central (Butt et Kalsi 2006).

4-2.3 Astrocytes et pathologies rétinienne

La connaissance et l'intérêt pour les astrocytes rétiens comme acteurs dans les pathologies rétiennes est récent, car ces cellules (au même titre que les CGM) ont longtemps été considérées comme de simples cellules de soutien, et prennent actuellement une place centrale dans la compréhension des différentes pathologies rétiennes. Il a été reporté

notamment que l'activation et la dysfonction des astrocytes rétiniens sont impliqués dans le phénomène de rupture de la BHR au cours de nombreuses pathologies (Zheng, Li, et Song 2008; Shen et al. 2010). En effet, les cellules macrogliales augmentent les propriétés de barrière des cellules endothéliales des capillaires rétiniens par augmentation de production de protéines de jonctions de type zonula occludens ZO-1 (Gardner 1995; Gardner et al. 1997).

Toutefois, les cellules macrogliales ne sont pas uniquement responsable du maintien de la BHR interne, elles interviennent également dans les mécanismes d'homéostasie afin de maintenir une bonne cohésion rétinienne (Butt et Kalsi 2006).

Enfin, dans la pathologie glaucomateuse également la gliose astrocytaire pourrait jouer un rôle important, en effet l'hypertrophie gliale pourrait contribuer à des strangulations axonales aboutissant ainsi à la perte du transport axoplasmique observé dans certains modèles animaux de glaucome au niveau de la tête du nerf optique. Par ailleurs, les astrocytes activés expriment la protéine superoxyde dismutase qui a une action toxique directe sur les motoneurones au cours de la sclérose latérale amyotrophique (Nagai et al. 2007; Di Giorgio et al. 2007), cette protéine pourrait être également toxique sur d'autres types de cellules neuronales telles que les cellules ganglionnaires rétiniennes au cours du glaucome.

5- Les cellules gliales de Müller

5-1 Fonctions et pathologies des CGM dans la rétine

Tout comme les astrocytes, les CGM sont en contact direct avec le plexus vasculaire superficiel rétinien, et avec l'interface vitréo-rétinien via des extensions cytoplasmiques. Les CGM sont également impliquées dans les mécanismes d'homéostasie et de cohésion de la rétine (Bringmann et al. 2006).

5-1.1 Configuration spatiale des CGM

Comme vu précédemment, les CGM sont des cellules gliales radiales spécialisées qui s'étendent sur toute l'épaisseur de la rétine (Figure 24) et sont en contact de tous les corps cellulaires des neurones de la rétine. Ainsi, les CGM constituent un lien anatomique entre les neurones rétiniens et les compartiments avec lesquelles elles échangent des molécules (les vaisseaux sanguins rétiniens, le vitré, et l'espace sous-rétinien). Ce lien n'est pas seulement anatomique mais aussi fonctionnel. A cet effet, les CGM sont dotées de différents canaux ioniques, de récepteurs de ligand, de protéines de transport transmembranaires, et d'enzymes (E. A. Newman 1996).

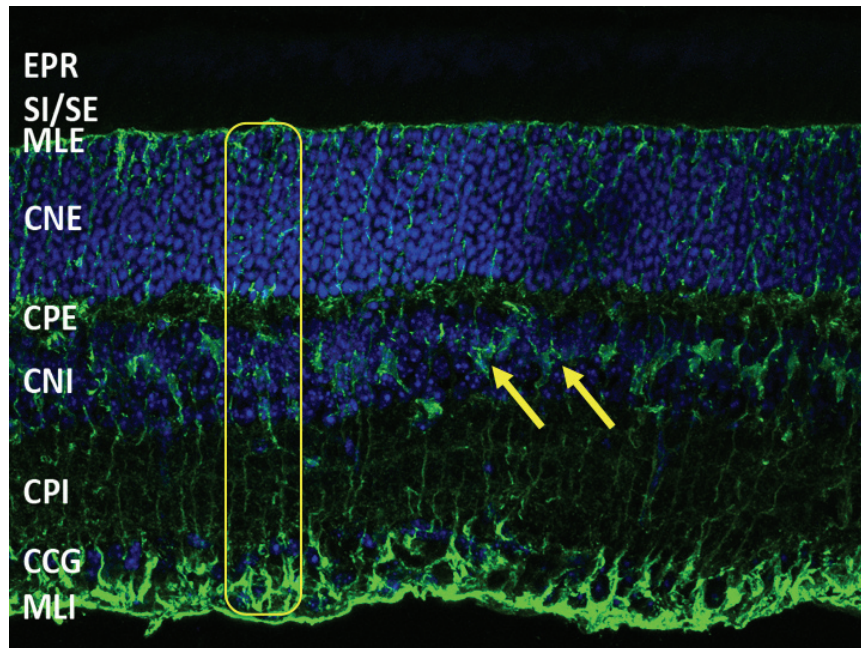


Figure 24 : Rétine en coupe marquée pour marquage GS pour les CGM et DAPI pour les noyaux chez la souris (Dr Ophélie Vacca, institut de la Vision).

5-1.2 Homéostasie rétinienne potassique

Le transport d'eau au travers des CGM est couplé à des courants K^+ . Une diminution du nombre de canaux K^+ sur la membrane des CGM en conditions pathologiques, altère donc l'élimination transgliale d'eau. Les CGM des rétines de rats diabétiques gonflent dans des conditions hypotoniques (Bringmann et al. 2006) (Les conditions hypotoniques imitent le gradient osmotique entre le tissu rétinien hyperosmolaire [accumulation de K^+] et le sang et le vitré). Le gonflement osmotique (ou ballonnisation) des CGM est inhibé par le blocage de la phospholipase A2 ou de la cyclo-oxygénase, et en présence d'un agent réducteur, ce qui suggère que les conditions inflammatoires et de stress oxydatif jouent un rôle important dans ce phénomène (Thomas Pannicke et al. 2006). La ballonnisation des CGM en conditions aniso-osmotique suggère que les CGM ont perdu leur capacité à éliminer rapidement les osmolytes (et notamment, des ions K^+) et, par conséquent, l'eau vers les vaisseaux et le vitré.

Les CGM sont fondamentalement impliquées dans l'homéostasie rétinienne des ions K^+ , en assurant un transfert transmembranaire de cet ion. Cette fonction permet d'équilibrer les

modifications de concentrations potassiques extracellulaires associées à l'activité neuronale (E. A. Newman 1985; E. A. Newman 1996; Reichenbach et al. 1992). Les neurones libèrent activement des ions K^+ en particulier au niveau des couches plexiformes (= correspondant à la localisation des synapses) (Steinberg, Oakley, et Niemeyer 1980). Cela provoque des flux de courants potassiques entrants dans les CGM. Les CGM captent l'excès de K^+ dérivés des neurones au niveau des couches plexiformes, et éliminent une quantité similaire de K^+ dans des espaces liquidiens en dehors de la rétine neuronale (sang, vitré, et l'espace sous-rétinien) (Karwoski, Lu, et Newman 1989; E. A. Newman 1985; Reichenbach et al. 1992). Il existe une polarisation de l'expression des canaux Kir4.1 dans la membrane plasmique des CGM, avec une forte densité dans les domaines plasmiques en contact avec les zones d'excès de K^+ extra-cellulaire, dans les espaces périvasculaires, et au niveau des membranes limitantes interne et externe (Paulo Kofuji et al. 2002; Nagelhus et al. 1998). La CGM permet ainsi le contrôle du PH intra-rétinien, par la régulation des ions potassique (K^+) (E. A. Newman, Frambach, et Odette 1984).

En cas de pathologies rétiniennes, les canaux Kir4.1 peuvent être délocalisés (perdent leur polarisation) ou même manquants (T. Pannicke et al. 2000; Skatchkov et al. 2006). Un dérèglement de l'homéostasie du K^+ peut être à l'origine d'une hyper-excitation neuronale et d'une excitotoxicité.

Par ailleurs en pratique clinique, il est suspecté que le gonflement des CGM soit impliqué dans le développement de l'OM cystoïde, dans lequel les logettes kystiques souvent visibles en angiographie correspondraient aux CGM ballonnées (Fine et Brucker 1981; Yanoff et al. 1984).

5-1.3 Homéostasie aqueuse

Dans des conditions normales, l'eau s'accumule dans le tissu rétinien, provenant :

- De la production endogène d'eau associée à la synthèse oxydative de l'adénosine 5'-triphosphate (ATP)
- D'un afflux d'eau provenant de la circulation sanguine couplé à la capture de substrats métaboliques tels que le glucose
- D'un passage d'eau dans la rétine par élévation de la pression intraoculaire (Marmor 1999).

Cette eau est éliminée en permanence par l'épithélium pigmentaire (EP) qui déshydrate l'espace sous-rétinien, et par les CGM qui déshydratent la rétine interne (Bringmann, Reichenbach, et Wiedemann 2004). L'EP et les CGM permettent l'élimination d'eau par des flux transcellulaires aqueux couplés à des flux d'osmolytes, grâce à des canaux aqueux de type aquaporines. Les CGM permettent l'élimination aqueuse du milieu interstitiel vers l'intérieur des cellules puis vers les vaisseaux sanguins. La co-expression de canaux K^+ (Kir4.1) et de canaux aquaporines-4 (AQP4) au niveau des CGM a conduit à la suggestion que le transport de l'eau à travers les CGM est étroitement couplé aux courants rectificateurs K^+ (Nagelhus et al. 1998). La co-expression des AQP-4 et Kir4.1 suggère que les différences osmotiques entre le tissu rétinien et le sang ou vitré sont compensées par les entrées et sorties d'eau et de K^+ des CGM en fonction de l'activité neuronale du moment.

5-1.4 CGM et neurotransmission

Au niveau de la zone d'interactions neurone-glie, les CGM jouent un rôle fondamental dans le recyclage des neurotransmetteurs. Les CGM expriment à leur surface un système de capture des neurotransmetteurs, tels que le glutamate, la glycine et l'acide γ -aminobutyrique (GABA) (Sarthy et al. 2005). Le glutamate représente le neurotransmetteur principal de la rétine. Pour permettre un bon fonctionnement de la synapse excitatrice et éviter une neurotoxicité, le glutamate est éliminé de la fente synaptique par les CGM (Barnett et Pow 2000). Afin d'éliminer le glutamate de la rétine, les CGM expriment le transporteur glutamate/aspartate

dépendant du sodium, GLAST (Otori et al. 1994). Un dysfonctionnement de ce transporteur dans les CGM, provoque une augmentation du glutamate extracellulaire, contribuant ainsi à une dérégulation neuronale et à l'apoptose dans des conditions pathologiques (Barnett et Pow 2000). A la suite de sa capture par les CGM, le glutamate est transformé en glutamine par l'action de la glutamine synthase (GS), qui est exclusivement exprimée par les CGM. La glutamine est ensuite transportée vers les neurones en tant que précurseur pour la synthèse du glutamate et de GABA (Pow et Crook 1996).

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

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

5-1.5 Homéostasie rétinienne et Dp71

Il a été précédemment montré dans notre équipe que l'absence de Dp71 chez la souris Dp71-null s'accompagnait non seulement d'une augmentation de la perméabilité vasculaire rétinienne correspondant à une rupture de la barrière hémato-rétinienne interne (Sene et al. 2009), mais également de perturbations des canaux potassiques Kir 4.1 qui ne sont plus uniquement localisés au niveau des pieds des CGM mais délocalisés tout au long de la CGM, ainsi qu'une diminution de l'expression protéique du canal AQP4 (Fort et al. 2008). Par ailleurs, dans un modèle expérimental de décollement de rétine chez la souris, l'expression de Dp71 est diminuée dans les rétines décollées comparativement aux rétines saines et s'associe également à une délocalisation de Kir4.1 et une diminution de l'expression d'AQP4 (Sene et

al. 2009). La diminution d'expression de Dp71, dans ce modèle de décollement de rétine, s'accompagne également d'une diminution des courants entrants rectificateurs K^+ et d'une ballonnisation des CGM (Sene et al. 2009). Ces travaux placent la Dp71 au cœur des mécanismes de maintien de l'homéostasie rétinienne, par son lien étroit avec les canaux Kir4.1 et AQP4 au sein des DAPs.

6- Pathologies et rupture de BHR

Les pathologies qui atteignent le système vasculaire rétinien sont principalement la rétinopathie diabétique (Figure 25), et les occlusions veineuses (Figure 26).

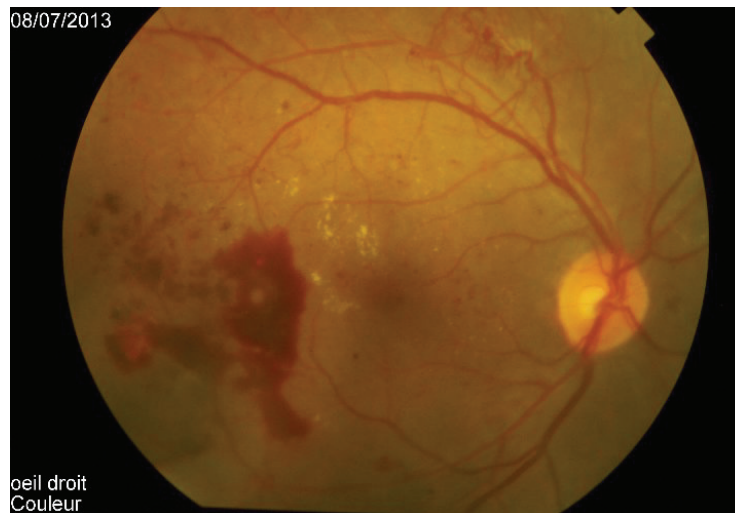


Figure 25 : Rétinopathie diabétique proliférante (atteinte du réseau vasculaire rétinien)
(Image Audrey Giocanti, hôpital Avicenne)

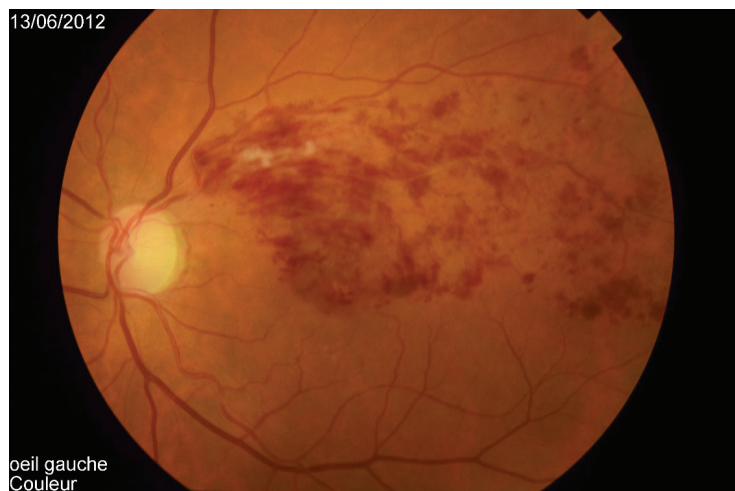


Figure 26 : Occlusion de branche veineuse rétinienne temporelle supérieure gauche : atteinte du réseau vasculaire rétinien. (Image Audrey Giocanti, hôpital Avicenne)

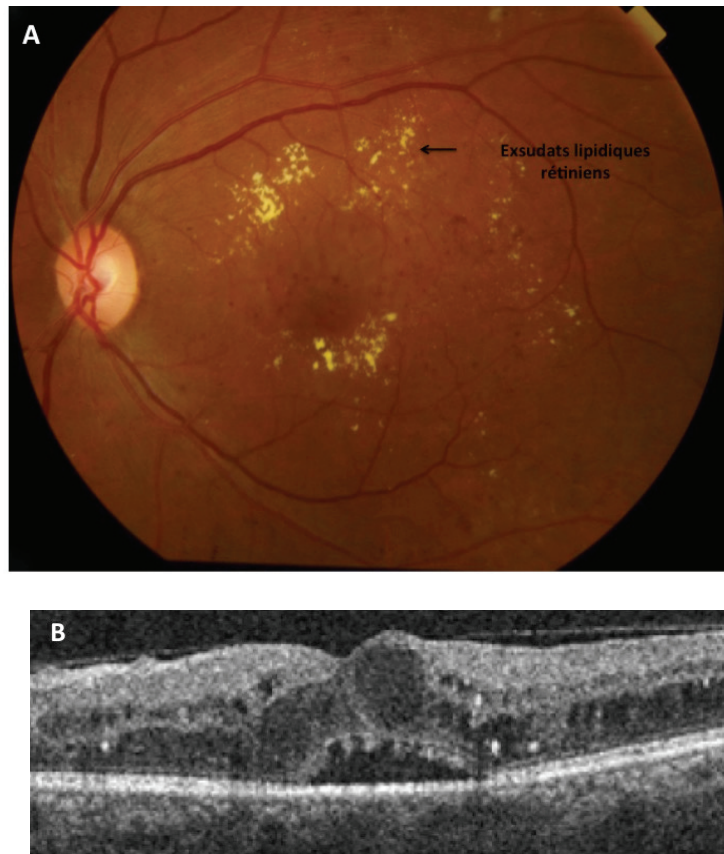


Figure 27 : Œdème maculaire diabétique. A : photographie du fond d’œil, présence d’exsudats au pôle postérieur. B : Tomographie en cohérence optique permettant de visualiser l’épaississement rétinien correspondant à l’œdème maculaire diabétique. (Images Audrey Giocanti, hôpital Avicenne)

Ces pathologies qui altèrent le réseau vasculaire rétinien peuvent aboutir à la rupture la BHR interne et conduire à l’apparition d’un œdème maculaire (Figure 27) qui est responsable d’un baisse de l’acuité visuelle par plusieurs mécanismes : perte de la transparence rétinienne, effet Stiles Crawford (perte du parallélisme des photorécepteurs), et probablement à plus long terme toxicité du fluide sur les cellules neuronales rétiniennes. Après chirurgie de la cataracte également, dans environ 1% des cas, un œdème maculaire peut se développer et entraîner une baisse de vision, ce tableau clinique correspond à un syndrome d’Irvine Gass, dont l’hypothèse physiopathologique principale est l’inflammation péri-opératoire qui entraîne une rupture de la BHR à l’origine d’un œdème maculaire (Lobo 2012) (Figure 28).

L'œdème maculaire est diagnostiqué principalement grâce à l'examen OCT (tomographie en cohérence optique), qui objective la présence de fluide intra-rétinien à l'origine d'un épaissement rétinien maculaire avec perte du profil fovéolaire.

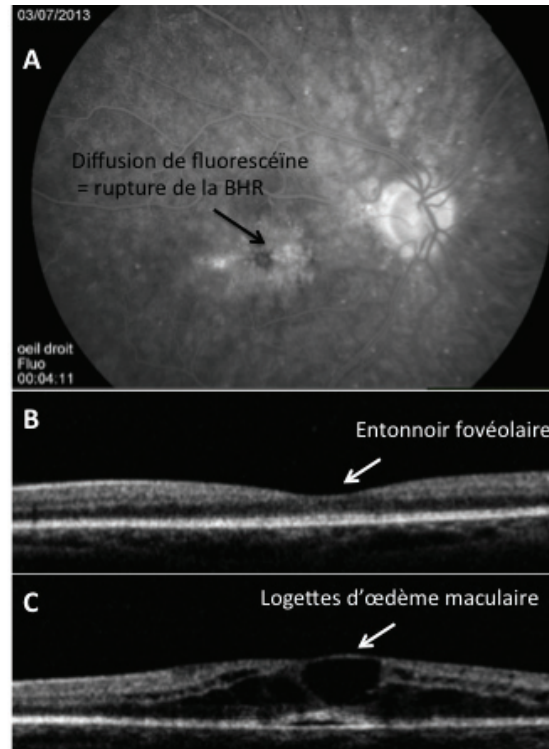


Figure 28 : Il s'agit ici de l'angiographie d'un patient souffrant d'un syndrome d'Irvine Gass, œdème maculaire post-opératoire. A : Angiographie à la fluorescéine, diffusion maculaire anormale du colorant ; B : Examen OCT normal œil controlatéral ; C : Epaissement rétinien et perte de l'entonnoir fovéolaire correspondant à un œdème maculaire

7- Corticostéroïdes

7-1 Corticostéroïdes et barrières hémato neuronales

Les glucocorticoïdes ont un effet robuste sur la BHR (Keil, Liu, et Antonetti 2013) en altérant de nombreuses voies physiopathologiques. Ils ont un puissant rôle anti inflammatoire (Aveleira et al. 2010) et améliorent également les propriétés de barrière par augmentation de l'intégrité des jonctions serrées entre les cellules endothéliales (Zetl et al. 1992; Romero et al. 2003). L'occludine et la Claudine 5 sont des constituants transmembranaires des jonctions serrées contribuant aux propriétés de barrière. Ces 2 protéines jouent également un rôle clé dans le cerveau. En effet, la délétion du gène de la claudine 5 conduit à l'augmentation de la perméabilité de la BHE et la mort peu après la naissance (Runkle et Antonetti 2011; Nitta et al. 2003). Les corticoïdes sont utilisés depuis des décennies dans le traitement de l'œdème cérébral secondaire au développement des tumeurs cérébrales (Kaal et Vecht 2004; Heiss et al. 1996), agissant en réduisant le signal VEGF-dépendant et par augmentation des propriétés de barrière. Au niveau rétinien, les corticoïdes ont montré leur efficacité en pratique clinique sur la résorption de l'œdème maculaire, lié aux occlusions veineuses, aux uvéites et au diabète (Lam et al. 2015). Le rôle de l'occludine au sein des jonctions serrées est complexe, puisque la phosphorylation et l'ubiquitination de l'occludine sont nécessaires à la perméabilité de la BHR induite par le VEGF (Murakami et al. 2012; Murakami, Felinski, et Antonetti 2009). Le traitement glucocorticoïde conduit à une augmentation de la transcription de l'occludine (David A. Antonetti et al. 2002; Förster et al. 2005) et de la claudin-5 (Felinski et al. 2008) et une diminution de la phosphorylation des occludines, conduisant à une augmentation de l'étanchéité des jonctions serrées et une diminution des phénomènes de fuites paracellulaires (David A. Antonetti et al. 2002). La fenêtre d'action des corticoïdes est de 24 à 48h.

Dans les modèles de diabète, chez l'animal, les jonctions serrées sont très diminuées et désorganisées dans les vaisseaux rétiniens, ce qui conduit à une augmentation de la perméabilité des parois vasculaires rétiniennes (D. A. Antonetti et al. 1998; Klaassen et al. 2009). La Claudine 5 est exprimée dans l'endothélium vasculaire rétinien (Barber et Antonetti 2003). Les glucocorticoïdes permettent une conservation du nombre de jonctions serrées entre cellules endothéliales et ainsi un maintien de la BHR.

7-2 Corticostéroïdes et équilibre homéostatique de la rétine

L'équilibre homéostatique de la rétine est assuré en partie par les CGM, par l'intermédiaire des courants de membranes rectificateurs permis par la polarisation des canaux Kir4.1 principalement et l'expression de canaux AQP4. Les corticoïdes peuvent agir sur ces phénomènes de transport aqueux et ioniques. En effet, la dexaméthasone et la triamcinolone exercent des actions différentes et spécifiques de régulation des canaux 24 heures après injection intra-vitréenne. Chez le rat, la dexaméthasone augmente sélectivement Kir4.1 (et pas AQP4) dans la rétine normale et inflammatoire alors que la triamcinolone agit sur AQP4 (et pas Kir4.1) (Zhao et al. 2011). La triamcinolone inhibe également la ballonnisation de la CGM dans la rétine post-ischémique, inflammatoire, et diabétique (Thomas Pannicke et al. 2006; Uckermann et al. 2005).

De plus, en situation pathologique (Zhao et al. 2011), les CT permettent l'augmentation des canaux potassiques et aqueux des CGM après injection intra-vitréenne à forte dose.

En l'absence de Dp71, chez la souris Dp71-null, les CGM sont ballonnées du fait de la perte de l'équilibre homéostatique rétinien. Or, l'adjonction de CT (Indométhacine) bloque la ballonnisation des CGM (Sene et al. 2009).

7-3 Corticostéroïdes et Dp71

Il n'y a pas à l'heure actuelle de preuve formelle dans la littérature rapportant un effet direct de la Dexaméthasone sur l'expression de la protéine Dp71. Il existe cependant quelques éléments en faveur de cette hypothèse, puisque l'expression de la protéine HSF1, très récemment découverte comme étant un des facteurs de transcription régulant l'expression de Dp71 (Tan et al. 2015), est augmentée dans des cellules de tissu synovial de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde en culture, en présence de fortes doses de Dexaméthasone (Schett et al. 1998). De même, dans un modèle murin de maladie de Huntington, maladie neurodégénérative héréditaire (Maheshwari et al. 2014), s'associant à une diminution de l'expression d'HSF1 dans le cerveau des souris, l'administration sous-cutanée quotidienne de Dexaméthasone permet de restaurer des taux d'HSF1 similaires au contrôle sain (Maheshwari et al. 2014).

8- Problématique

Au fil des années l'implication de la protéine Dystrophine Dp71 a été identifiée dans divers mécanismes physiologiques. Ces implications sont principalement liées à sa position sous-membranaire au sein d'un complexe appelé DAPs, Dystrophine associated Protein, par l'intermédiaire duquel la Dp71 assure un lien entre le cytosquelette des cellules et le milieu extra-cellulaire. Au sein de l'équipe, nous avons précédemment montré que la Dp71 était exprimée dans la rétine par les CGM. Et, cette expression n'est pas sans conséquence, puisqu'en l'absence de Dp71, il existe des modifications de localisation et de quantité des canaux aqueux AQP4 et potassiques Kir4.1 au sein de la CGM à l'origine de perturbations de l'homéostasie rétinienne.

Par ailleurs, il a également été montré qu'en l'absence de Dp71, la rétine se trouvait dans un état pro-inflammatoire, avec une augmentation de VEGF, ICAM-1 et AQP4, ainsi qu'une augmentation du nombre de leucocytes adhérents aux parois des vaisseaux rétiniens (Mathari et al. 2015), et une rupture de la barrière hémato rétinienne interne (Sene et al. 2009), faisant de cette souris un bon modèle d'étude pour les maladies vasculaires de la rétine.

L'objectif de mon travail était ainsi de rechercher, en tenant compte de l'existence d'une expression cérébrale connue de Dp71 au niveau astrocytaire, une expression de la Dp71 également dans les astrocytes rétiniens et, la conséquence de l'absence de cette protéine sur les fonctionnalités astrocytaires au sein de la rétine. Nous avons souhaité observer deux aspects du fonctionnement rétinien: le développement de la vascularisation rétinienne qui nécessite l'existence d'une fonction astrocytaire de qualité, d'une part. Et, d'autre part, connaissant l'impact de l'absence de Dp71 sur la perméabilité rétinienne notre objectif second

était quantifier dans un modèle de rupture de la barrière hémato-rétinienne l'expression de la protéine Dp71, et d'évaluer le comportement des CGM et des astrocytes dans ce modèle.

L'objectif final qui sous-tendait ce travail fondamental de thèse étant bien entendu la volonté de mieux comprendre les mécanismes qui régissent non seulement les phénomènes de rupture de la BHR, que nous savons désormais traiter en pratique clinique, en asséchant la rétine grâce à l'utilisation d'agents antiVEGF ou corticoïdes. Cependant, malgré l'existence de ces traitements, nous ne savons pas encore protéger les neurones rétiniens contre la toxicité de l'œdème rétinien. Or, la protection neuronale étant assurée par les cellules macrogliales de la rétine, nous avons décidé de nous intéresser à ces cellules. Chaque connaissance supplémentaire du fonctionnement macroglial nous aide dans l'avancée thérapeutique et dans une meilleure prise en charge de nos patients souffrant d'œdème maculaire, et de dysfonction vasculaire rétinienne.

III/ RESULTATS

1- PARTIE 1

**Manuscrit soumis à publication au Journal Glia
(juin 2015)**

**Altered astrocyte morphology and vascular development in Dystrophin-
Dp71-null mice**

Audrey Giocanti-Auregan, Ophélie Vacca, Romain Bénard, Sijia Cao, Lourdes Siqueiros, Cecilia Montañez, Michel Paques, José-Alain Sahel, Florian Sennlaub, Xavier Guillonnet, Alvaro Rendon, Ramin Tadayoni.

1-1 Situation du sujet

Les CGM ont été considérées longtemps comme le seul type cellulaire macroglial rétinien exprimant la protéine Dp71. Or, les CGM jouent un rôle majeur à la fois dans le maintien de la BHR et également dans le maintien de l'homéostasie rétinienne. Les astrocytes, qui constituent l'autre type cellulaire macroglial rétinien, sont connus pour jouer un rôle dans le guidage vasculaire au cours du développement vasculaire de la rétine (Hirota et al. 2011), par un mécanisme VEGF dépendant (West, Richardson, et Fruttiger 2005). Les astrocytes guident le développement du réseau vasculaire rétinien superficiel (Marcus Fruttiger 2007) jusqu'à P6, puis les ramifications vasculaires plongent dans l'épaisseur rétinienne en suivant les prolongements des CGM afin de former le plexus vasculaire profond parallèle au plexus superficiel.

Le développement du réseau vasculaire superficiel est intimement lié au réseau astrocytaire sous-jacent, qui recouvre dès la naissance l'intégralité de la surface rétinienne entre le nerf optique et la périphérie rétinienne. Une protéine d'adhésion, appelée R-Cadhérine, impliquée dans le guidage neuronal et produite par les astrocytes a déjà été retrouvée impliquée dans le développement du réseau vasculaire superficiel de la rétine. Quand cette protéine est inhibée durant le développement vasculaire rétinien, la migration des vaisseaux rétiniens est compromise (Dorrell, Aguilar, et Friedlander 2002). Les interactions moléculaires précises existant entre les vaisseaux rétiniens en développement et les autres types cellulaires rétiniens ne sont pas clairement définies. La localisation de la protéine Dp71 autour des vaisseaux dans la rétine adulte (Bordais et al. 2005) et son implication dans le maintien de l'homéostasie rétinienne, suggèrent que cette protéine pourrait jouer un rôle dans les différentes fonctions impliquant les vaisseaux. Compte tenu des similitudes existant entre cerveau et rétine, et l'expression déjà connue de la protéine Dp71 dans les astrocytes cérébraux, ce travail s'est intéressé à l'analyse de l'expression de la Dp71 dans les astrocytes rétiniens. Après avoir

prouvé l'expression de Dp71 dans les astrocytes rétiniens, nous avons analysé la morphologie astrocytaire dans un premier temps chez des souris transgéniques n'exprimant pas la Dp71 comparativement à des souris contrôles. Nous avons ainsi mis en évidence une diminution importante du nombre d'extensions plasmatiques astrocytaires en absence de Dp71. Nous avons alors émis l'hypothèse qu'un réseau astrocytaire anormal pouvait affecter le réseau vasculaire sus-jacent. En effet, nous avons détecté un développement vasculaire rétinien retardé en l'absence de Dp71 ainsi qu'une densité vasculaire modifiée et un nombre diminué de ramifications. L'ensemble de ces données supporte l'hypothèse que la dystrophine Dp71 est un élément clé du fonctionnement vasculaire rétinien.

1-2 Résumé des résultats

Dans ce travail, nous avons démontré l'expression de la protéine Dp71 par les astrocytes rétiniens, par l'existence d'une co-localisation entre la protéine Dp71 et le marqueur cellulaire astrocytaire GFAP, à la fois sur des coupes de rétines et sur des cellules astrocytaires isolées.

Nous avons également mis en évidence, en l'absence de la protéine Dp71 une modification de morphologie et de densité des astrocytes rétiniens. En effet, nous avons noté chez les souris mutées (Dp71-null) une diminution importante des prolongements astrocytaires ainsi que de la densité cellulaire rétinienne à P6, qui persiste à l'âge adulte.

Nous avons par ailleurs étudié l'effet de cette modification astrocytaire sur le développement vasculaire rétinien durant les premiers jours de vie et avons constaté qu'en l'absence de Dp71, le développement vasculaire rétinien à la fois du plexus superficiel et profond survenait avec retard comparativement aux souris contrôles. La différence maximale de couverture rétinienne par le plexus superficiel entre souris Dp71-null et souris normales est constatée à P6, et à P12 pour le plexus profond.

Nous avons également quantifié l'expression de la Dp71 en QPCR, et montré que cette expression chez la souris normale est présente dès le premier jour de vie et augmente progressivement au fil des jours parallèlement au développement vasculaire rétinien.

Si les astrocytes ont une densité et une morphologie modifiée en absence de Dp71, cette protéine n'affecte toutefois pas leur migration apparente après la naissance puisque dès les premiers jours de vie les astrocytes ont d'ores et déjà couvert l'ensemble de la rétine entre le nerf optique et la périphérie, permettant de servir d'échafaudage à la croissance vasculaire sus-jacente. En effet, les vaisseaux suivent exactement le même patron que les astrocytes au cours de leur développement.

Ce rapport étroit entre migration vasculaire sur la surface rétinienne et astrocytes pourrait être en partie expliqué par la production de VEGF, par les astrocytes, qui servirait de médiateur à cette croissance (Scott et al. 2010). En effet nous retrouvons des taux de VEGF-A et de son récepteur VEGFR1 plus élevé chez les souris non mutées pour la Dp71.

1-3 Conclusion

Nous avons dans cet article mis en évidence le rôle capital de l'architecture astrocytaire rétinienne dans le développement vasculaire normal de la rétine. Nous avons également montré qu'en l'absence de Dp71, le réseau astrocytaire rétinien était architecturalement perturbé et que la densité astrocytaire était également diminuée.

Nous savons que les astrocytes comme les CGM participent au maintien de la BHR interne. Or, cette BHR interne est souvent lésée dans la majorité des pathologies rétiniennes, c'est pourquoi chaque avancée en matière de compréhension du fonctionnement cellulaire impliqué dans le maintien de cette BHR est capitale.

L'article suivant a fait l'objet d'une soumission au journal *Glia*.

1-4 Article

Altered astrocyte morphology and vascular development in Dystrophin-Dp71-null mice

Authors: Audrey Giocanti-Auregan^{1,2,3,4}, Ophélie Vacca^{2,3,4}, Romain Bénard^{2,3,4}, Sijia Cao^{2,3,4}, Lourdes Siqueiros^{2,3,4}, Cecilia Montañez⁵, Michel Paques^{2,3,4,6}, José-Alain Sahel^{2,3,4,6,7}, Florian Sennlaub^{2,3,4}, Xavier Guillonneau^{2,3,4}, Alvaro Rendon^{2,3,4*}, Ramin Tadayoni^{2,3,4,8}.

Affiliations:

1. Avicenne hospital, Ophthalmology department, 125 rue de Stalingrad, Bobigny
2. Institut de la Vision, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 968, Paris, F-75012, France;
3. INSERM, U_968, Paris, F-75012, France;
4. CNRS, UMR_7210, Paris, F-75012, France;
5. Department of Genetics & Molecular Biology, Research Centre for Advanced Studies, IPN, Av. I.P.N. 2508, C.P. 07360 Mexico City, Mexico.
6. Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts, DHU ViewMaintain, INSERM-DHOS CIC 1423, Paris, F-75012, France;
7. Fondation Ophtalmologique Rothschild, Paris, F-75019 Paris, France;
8. Ophthalmology departement, Hôpital Lariboisière, AP-HP, Université Paris 7 – Sorbonne Paris Cité, 2 rue Ambroise Paré, 75010 Paris

Alvaro Rendon and Ramin Tadayoni have contributed equally to the work

Running title: Role of astrocytes in retinal vascular development

Total count of words:

Abstract: 233

Introduction: 842

Methods: 1403

Results: 1258

Discussion: 1945

Bibliography: 1612

Number of figures: 7

Number of supplementary figures: 2

Number of tables: 2

Correspondence sent to: Dr Alvaro Rendon, alvaro.rendon@inserm.fr, Institut de la vision, 17 rue Moreau, phone: +33(0)1 53.46.25.65

Main points: Dystrophin Dp71, a membrane-associated cytoskeletal protein and the major *Duchenne muscular dystrophy* gene product in the retina, regulates astrocyte morphology and density and is associated with subsequent normal blood vessel development.

Keywords: Dystrophin Dp71; astrocytes; retinal vascular development; angiogenesis.

Abstract

Objectives: Understanding retinal vascular development is crucial because many retinal vascular diseases such as diabetic retinopathy (in adults) or retinopathy of prematurity (in children) are among the leading causes of blindness. Given the localization of the protein Dp71 around the retinal vessels in adult mice and its role in maintaining retinal homeostasis, the aim of this study was to determine if Dp71 was involved in astrocyte and vascular development regulation.

Methods/Results: We conducted an experimental study in mouse retinas and retinal astrocytes. Using a dual immunolabeling with antibodies to Dp71 and astrocytes on retinal sections and isolated astrocytes, we found that Dp71 was expressed in wild-type (WT) mouse astrocytes from early developmental stages to adult stage. In Dp71-null mice, a dramatic reduction in astrocyte density was observed as early as postnatal day 6 (P6) compared to WT mice. Using real-time PCR, we showed that Dp71 mRNA increased between P1 and P6, in parallel with astrocyte expansion. Regarding morphology in Dp71-null and WT mice, we found a significant decrease in overall process number in Dp71-null retinas. Using fluorescence-conjugated isolectin *Griffonia simplicifolia* on whole mount retinas, we also found subsequent impairment of developing vascular network at the same age in Dp71-null mice.

Conclusion: We provide evidence that the Dystrophin Dp71, a membrane-associated cytoskeletal protein and one of the smaller *Duchenne muscular dystrophy* gene products, regulates astrocyte morphology and density and is associated with subsequent normal blood vessel development.

Introduction

Angiogenesis is a physiological process involving the growth of new blood vessels. In the retina, physiological angiogenesis during early development is essential for normal vision. Understanding the retinal vascular development is crucial because many retinal vascular diseases such as diabetic retinopathy (in adults) or retinopathy of prematurity (in children) are among the leading causes of blindness. Astrocytes are intimately involved in the formation, development and function of central nervous system vessels (Ma, Kwon, et Huang 2012b). In the retina, astrocytes are believed to play an important role in the development of the mammalian retinal vasculature (M. Fruttiger et al. 1996; Hirota et al. 2011; Kubota et Suda 2009; Scott et al. 2010; Stenzel et al. 2011). Shortly after birth, blood vessels are known to emerge at the optic disc and sprout radially just underneath the vitreal surface of the retina until they reach the peripheral margin (Marcus Fruttiger 2007). The growing vessels are guided by an astrocyte network producing vascular endothelial growth factor (VEGF) (Marcus Fruttiger 2007; West, Richardson, et Fruttiger 2005). In a second phase starting around postnatal day 6 (P6), the vascular branches also sprout downwards into the retina to form additional plexus. In rodents, vascular sprouts grow down along Müller cell processes into the retina and turn sideways when they reach the inner and outer boundaries of the inner nuclear layer to establish two additional networks parallel to the primary plexus (Marcus Fruttiger 2007). Retinal astroglial cells are only found in species with a vascularized retina, and are restricted to vascularized areas (Marcus Fruttiger 2007; M. Fruttiger et al. 1996; Provis, Sandercoe, et Hendrickson 2000; Schnitzer 1988). The formation of the primary vascular layer in the retina is closely associated with the underlying astrocytes that are present at birth on the retina surface from the optic nerve to the peripheral retina. Primary layer vessels are known to migrate on this pre-established network. Adhesion proteins produced by astrocytes such as R-cadherin, an adhesion molecule involved in neuronal cell guidance have

been shown to be involved in the formation of the primary vascular layer in the retina. When R-cadherin expression is inhibited during retinal vascular development, vessel migration on the retina is compromised (Dorrell, Aguilar, et Friedlander 2002). Laminins, some extracellular matrix components of the internal limiting membrane (ILM), also appear to regulate retinal blood vessel growth and maintain vascular integrity.

Dp71, a membrane-associated cytoskeletal protein and one of the smaller *Duchenne muscular dystrophy (DMD)* gene products that is the core of the Dystrophin-Associated Protein (DAP) complex, links the intracellular actin cytoskeleton to the extracellular matrix. Studies on nervous tissue support the potential involvement of Dp71 in neuronal and glial cell functions. Dp71 mRNA and protein have been shown to be expressed in different brain structures and cell types, including perivascular astrocytes, neurons in the hippocampus and olfactory bulb, cultured hippocampal neurons and forebrain astrocytes, and postsynaptic densities *in vivo*. It has been suggested that in the brain, the Dp71 protein located in the astrocyte perivascular endfeet membrane, participates in water and K⁺ homeostasis and blood-brain barrier stabilization. In the retina, we have shown that the inwardly rectifying potassium channel Kir4.1 and the aquaporin 4 water channel (AQP4) associate with the Dp71-DAP dependent subcomplex at Müller cell endfeet (Fort et al. 2008) and that this complex subsequently associates with laminin through β -dystroglycan (P. G. Hirrlinger et al. 2011). Genetic inactivation of Dp71 (in Dp71-null mice) alters Kir4.1 and AQP4 distribution in Müller cells and this mislocation is associated with impaired retinal water regulation and retinal nerve cell vulnerability to transient ischemia. Moreover, the absence of Dp71 in mouse retina causes a breakdown of the blood-retinal barrier (BRB) (Sene et al. 2009) that is associated with retinal vascular inflammation, vascular lesions with increased leukocyte adhesion and capillary degeneration (Mathari et al. 2015). Given the localization of Dp71 around the vessels in adult

mouse retina and its role in maintaining retinal homeostasis, we hypothesized that Dp71 could play a role in astrocyte and vascular development regulation.

Based on similarities between the brain and the retina, and the expression of Dp71 reported in brain astrocytes (Szabó et al. 2004), we first investigated using a dual immunolabeling whether or not Dp71 was expressed in retinal astrocytes. We found that Dp71 was expressed in wild-type (WT) mice from early developmental stages to adult stage. We then investigated astrocyte biological factors which could underlie the role of Dp71. To this end, cytotopographical studies were performed in Dp71-null mice, including analysis of astrocyte density and morphology. We found that the absence of Dp71 resulted in a dramatic reduction in astrocyte density as early as at P6 compared to WT mice. Compared to WT mice, we found a significantly decreased overall process number in Dp71-null mouse retinas. We then hypothesized that the altered astrocyte phenotypes induced by the absence of Dp71 could impair the subsequent vascular development. We found that the vascular growth in Dp71-null mice was significantly reduced with a significant decrease in vessel density, number of their branches and branching points. Taken together, these data support the assumption that Dp71 plays a crucial role in retinal vascular functions.

Methods

Animals

All experiments were done in compliance with the European Communities Council Directives (86/609/EEC) for animal care and experimentation (HMG). Mice were handled in accordance with the ARVO statement for the use of animals in ophthalmic and vision research (IOVS). Dp71-null mice were obtained as described previously (Sarig et al. 1999) by replacing, via homologous recombination, most of the first and unique exon of Dp71 and a small part of Dp71 first intron by a sequence coding a β -galactosidase (β -gal)-neomycin-resistance

chimeric protein (β -geo). Dp71 expression was abolished without interfering with the expression of other *DMD* gene products. Moreover, the expression of the inserted promoterless β -geo gene was under the control of the *Dp71* promoter. Dp71-null mice and their WT littermates (C57BL6J) were bred in our laboratory.

Retinal flat-mount preparations

The exact birth time of mice was monitored by checking twice a day the cages for birth. Mice were sacrificed at specific terms (P0, P3, P6, P9, P12 or Adult stage, i.e. 8-week old mice) and they were enucleated. Eyes were then fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 1 hour. Retinas were dissected free from surrounding tissues, incubated in methanol (-20°C) for 10 minutes, blocked with 3% normal goat serum (NGS) - 0.1% Triton – 1X Phosphate Buffered Saline (PBS) for 1 hour and incubated overnight at +4°C in 0.1% Triton X-100 – 1X PBS with different primary antibodies or markers. After 3 washes (1X PBS for 5 minutes), retinas were incubated with the appropriate fluorescence-conjugated secondary antibody (1:500; in saturation buffer, Life Technologies) for 1 hour at room temperature then washed three times and mounted on slides with aqueous mounting medium (Thermo Scientific). Antibodies and molecular markers included fluorescence-conjugated lectin *Griffonia simplicifolia* (1:100; Sigma-Aldrich) and rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:1000; Dako). In each case, secondary control incubations were performed to determine labeling specificity.

Retinal cryosections

Mice were sacrificed at different timepoints. Eucleated eyes were fixed in 4% PFA, transferred into 30% sucrose – 1X PBS overnight at +4°C, and embedded in optimal cutting temperature compound (OCT cryomatrix, ThermoScientific). Ten-micrometer frozen sections were washed with PBS, and blocked for 1 hour with 0.1% Triton X100 - 1% BSA – 1X PBS before overnight incubation at +4°C with rabbit anti-dystrophin H4 (1:2000) (Fabrizio et al.

1994), mouse monoclonal anti-GFAP (1:500; Sigma-Aldrich), fluorescence-conjugated lectin *Griffonia simplicifolia* (1:100; Sigma-Aldrich) antibodies. Sections were then incubated with a goat anti-rabbit and a goat anti-mouse secondary antibody (1:500; Life Technologies) for 1 hour at room temperature. Cell nuclei were stained with DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, 300 nM; Life Technologies). In each case, secondary control incubations were performed to determine labeling specificity.

Astrocyte isolation

Eyes were enucleated before being dissected in PBS. Both retinas were then removed and incubated in PBS containing 3% Papain for 30 minutes at +37°C. Retinas were washed 3 times with PBS then fixed with 4% PFA for 10 minutes at room temperature. Once the PFA removed, the retinas were again washed 2 times with 1X PBS. Cells were then mechanically dissociated by trituration with a pipette tip. Cell suspensions from WT and Dp71-null mice were diluted to the same concentrations after counting using a hemocytometer.

For immunolabeling, cells were freshly separated and deposited on a slide placed on a warm plate at +37°C for adherence. They were then rehydrated with 1X PBS and incubated with 1X PBS - 0.1% Triton X-100 for 5 minutes. After saturation for one hour in a 1X PBS solution containing 0.1% Tween 20 - 3% NGS - 1% BSA, cells were incubated with primary antibodies for 2 hours at room temperature or overnight at +4°C. Cells were then washed 3 times with a 1X PBS solution containing 0.1% Tween 20 and incubated for 1 hour with the secondary antibody (Alexa coupled). This incubation was followed by 2 washes with 1X PBS solution containing 0.1% Tween 20 and 1 wash with distilled water. Cells were subsequently mounted between slides and coverslip with fluorsave (Thermo Scientific).

Counting of retinal astrocytes

Dissociated cells were labeled with a polyclonal anti-GFAP antibody (1:1000, Dako), a monoclonal anti-GS antibody (Glutamine Synthetase, 1:2000, Millipore) and DAPI (1:1000, Life Technologies). After mounting, nine fields on each slide were captured under X10 objective with a fluorescence microscope. DAPI-stained nuclei in each field were counted using Fiji software and the GFAP positive and GS negative stellar-like astrocytes were counted manually. Results from all nine fields on each slide were summed to calculate the astrocyte density.

RNA Isolation and Real-Time Quantitative RT-PCR

mRNA level of several proteins was measured by real-time qRT-PCR at 2 or 3 development timepoints (P1, P3 and P6). For each timepoint, retinas were dissected in RNase-free medium and frozen at -80°C. Subsequently, retinas were pooled and total RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA integrity was verified before reverse transcription through visualization of the 28s and 18s ribosomal RNA bands.

Total RNA was reverse transcribed using SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) with random hexamers (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1 µl of random hexamers and 1 µl of dNTP mix were added to 9 µl of extracted RNA and incubated at +65°C for five minutes. After adding 2 µl of 10X RT buffer, 4 µl of 25 mM MgCl₂, 1 µl of RNaseOUT, 2 µl of 0.1 M DTT, and 1 µl SuperScript III RT (50 U/µl), a thermocycler (Applied Biosystems) was used to incubate the samples at room temperature for 10 minutes, at +42°C for 50 minutes and at +70°C for 15 minutes.

Subsequently, 10 ng of the resulting cDNA were added to FastStart universal SYBR Green Master Mix (Rox) (Roche) and placed into the StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied

Biosystems) for 40 cycles. Forward and reverse primers were designed using Primer 3 software (Table 1).

PCR amplification consisted of an initial denaturation step at +95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at +95°C for 15 seconds and annealing and extension at +60°C for one minute. Melting curve analysis (+60°C to +95°C increment at +0.3°C) was used to determine the melting temperature of specific amplification products and the possible formation of primer dimers. These experiments were independently repeated at least three times. Real-time quantitative RT-PCR was performed to quantitatively assess the mRNA level of Dp71, and VEGF-A. β -Actin was used as an internal control for normalization purposes. Following the generation of the standard curve, the PCR efficiency was determined for each gene. The $2^{-\Delta Ct}$ method was used for normalization.

Image analysis

Images of astrocytes and vessels were captured using a fluorescence microscope (Leica Z6 APO Microsystem Inc., Deerfield, IL) and a confocal microscope (TCS SP2, Leica) for captured localization of Dp71 in the retina. For vascularization development, the retina surface covered by vessels was measured and expressed as a percentage of the entire retina surface to obtain the vascularized area. Measurements were made using Photoshop 7.0 software.

To quantify astrocyte and vessel morphology, flat-mounted retinas from P6 and adult mice were analyzed using Fiji algorithms on two-dimensional (2D) images. Analyze Skeleton plugin (Arganda-Carreras et al. 2010) tags all pixels in a skeleton image then counts all its junctions, branches, and measures their mean length. 8-bit gray-scale images were open with Fiji software. Image noise was removed by processing a smooth filter (Plugins > Process > Smooth (3D) > Gaussian Method - 1 sigma). Then, images were binarized (Image > Adjust > Threshold > Apply) and the skeleton was extracted from binary images using Skeletonize

(2D/3D) (Figure S1). Figure S1 shows the protocol used for astrocyte vessel morphology analysis. Finally, the resulting skeletons were analyzed on the 2D images using Analyze Skeleton (2D/3D). For each skeleton, the number of branches (astrocyte processes or number of branches), number of actual junctions (astrocyte intersections or branching points) and mean branch length (process or vessel length) were investigated. Results are expressed as a number per mm² or length (μm) per mm².

To quantify vessel density, four epifluorescence images were taken per retina, using the same settings, with a DM5500 Leica microscope. Then, three fields per image were taken near the migration front. Thus, twelve fields per retina were analyzed and fluorescence areas were quantified using Fiji software.

Statistical analyses

All data were analyzed using the non-parametric Mann-Whitney test ± SEM except for vessel density where an unpaired t test ± Standard Deviation (SD) was used. Graphpad prism 6 software was used for all analyzes and statistical significance was set at p<0.05

Results

Dp71 localization in astrocytes

The expression of Dp71 in retinal astrocytes was investigated. Retinal sections from WT mice were double immunolabeled with antibodies to dystrophin (H4) and GFAP. The anti-dystrophin antibody H4 revealed a signal around blood vessels and at the ILM that colocalized with GFAP signal in astrocytes from P6 and 2-month (2M) old mice (Figures 1A and 1B). To confirm this observation, retinal cells from adult WT and Dp71-null mice were dissociated and double immunolabeled with the same antibodies. Dystrophins and GFAP colocalized in dissociated astrocytes from WT retinas. In astrocytes from Dp71-null retinas,

only the GFAP signal was obvious (Figure 1C). These observations confirm that Dp71 is expressed in retinal astrocytes.

Dp71 deletion affects astrocyte morphology and density

The morphology of GFAP⁺ retinal astrocytes was investigated in Dp71-null mouse retinas. Figures 2A, 2B and 2C show clearly a conspicuous morphological dissimilarity in the density of astrocytes present around the vessels as well as an apparent decrease in the number of astrocyte processes in P6 and 2M old Dp71-null mice compared to WT mice. At higher magnification, an obvious morphological difference in shape was observed between WT and Dp71-null astrocytes (Figure 2C). In Dp71-null mice, a narrow contact was observed between astrocyte endfeet and endothelial cells while the contact was wider in WT mice.

The number of processes and ramification size in WT and Dp71-null retinas were quantified in a rectangular area at P6 and 2M (Figures 2D and 2E). The number of processes was significantly reduced in Dp71-null astrocytes compared to WT astrocytes in neonate and adult retinas. In WT astrocytes, the number of processes increased over time. Conversely, the number of processes was stable in Dp71-null astrocytes in neonate and adult retina. However in WT and Dp71-null mice, no significant difference in process length was observed between two bifurcations at P6 or 2M. To further examine the morphological changes in Dp71-null astrocytes, the number of times a process segment crossed over another one was measured. A significant decrease in the number of intersections was observed in adult Dp71-null mice compared to WT mice, meaning that the mature astrocyte network was less complex and less developed when Dp71 was not expressed.

The potential impact of the absence of Dp71 was also assessed on the retinal density of astrocytes by counting manually the GFAP positive astrocytes per unit area of Dp71-null versus WT retinas at different ages, from P6 to adult stage. The number of retinal astrocytes

decreased with age in Dp71-null and WT mice (Figure 3A). Moreover, as shown in figure 3B, the deletion of Dp71 aggravated the age-dependent astrocyte loss: at P6, the retinal astrocyte density was 28% less in Dp71-null retinas and at 2M and 4M the astrocyte density was reduced by 44% and 49%, respectively. Statistical differences are detailed in Table 2.

Delayed angiogenesis in Dp71-null retina and Dp71 development

Based on our first findings, Dp71 could play a role in the regulation of astrocyte density and morphology. The postnatal retinal vessel development was thus compared between WT and Dp71-null mice. In WT mice, the development of the inner vasculature was labeled with lectin *Griffonia simplicifolia* (GS) and results showed that at P0, 3% of the total retinal surface was covered by vessels, with progressive growth of the first vessel layer covering 23% at P3 and 65% at P6 (Figures 4A and 4B). In Dp71-null mice, the vasculature was comparable to that in WT mice at P0 (2%); however quantification in 29 separate litters at P3 revealed that 16% of the retinal surface was covered, a value significantly less than that found in WT mice. This corresponded to a subtle, but significant, delay in angiogenesis. Moreover, at P6 this difference increased, showing a dramatic reduction in vascular network spreading by 37% in Dp71-null mice and 65% in WT mice (Figures 4A and 4B). The deep plexus developed later with a highly significant difference at P12. However, despite the difference in vasculature development, the retinal surface appeared totally covered by vessels in adult Dp71-null mice (Figure S2).

A Dp71 development analysis of Dp71 mRNA level was performed in the retina of WT mice using real-time qPCR. Figure 4C shows that Dp71 mRNA was expressed at P1 and its expression level increased until P6. Dp71 being expressed in astrocytes, a similar mRNA expression pattern for Dp71 at the same time points as those of the covering of the retinal

surface by retinal vessels suggested that Dp71 could be necessary to support the astrocyte role in the maturation of the retinal vascular plexus.

Impacts of Dp71 deletion on astrocyte migration and retinal angiogenesis and vascular plexus guidance

To improve our understanding of the relationship between astrocytes and the development of the mouse retinal vasculature, the retina of Dp71-null mice was examined at various development stages. Using a GFAP polyclonal antibody, a nearly complete astrocyte network covering the entire retina was observed at birth. At P3, fluorescent cells were visible in the vicinity of the retinal periphery edges in both WT and Dp71-null mice (Figure 5A), suggesting that the absence of Dp71 did not interfere with the postnatal astrocyte migration during retinal development.

The double immunostaining of GFAP and lectin GS allowed visualizing the pattern of retinal vessels and retinal astrocytes. As shown at P6 (Figure 2), a conspicuous dissimilarity in astrocyte density and morphology was observed at P3 between WT and Dp71-null mouse retinas (Figure 5B - GFAP). The close examination of the superficial vascular plexus (Figure 5B - Lectin) showed that the absence of Dp71 also induced a vasculature dissimilarity in terms of vessel morphology and density compared to WT mouse retinas. Merging lectin GS and GFAP images (Figure 5C - merge) showed that endothelial cells were always associated with the underlying astrocytes in WT and Dp71-null mice despite astrocyte and vasculature malformation. This observation suggest that the initial mechanism involved in endothelial cell guidance signals during their migration through the underlying astrocyte template during development, was not impaired in the absence of Dp71.

The possible impairment in the vasculature plexus was also studied in the absence of Dp71. Flat-mount retinas were analyzed at P6, i.e. when most of the primary network is usually

formed in WT mice. As described for astrocytes, the vascularization area, number of branches, branching points and vessel length were measured in a rectangular area (Figures 6A and 6B). A significant decrease in vasculature density, number of branches as well as branching points was found in Dp71-null mice compared to WT mice (Figures 6C and 6E). However, due to the decrease in branching points, the vessel length was dramatically increased (Figure 6F). Using qRT-PCR, the mRNA level of R-Cadherin, which is required for retinal endothelial cell guidance, was quantified 3 days after birth. R-cadherin mRNA level was lower at P3 in Dp71-null mice (Figure 7A), probably due to a lower retinal astrocyte density. These data indicate that the impaired vasculature and delayed retinal vascular plexus maturation in Dp71-null mice could be due to a disruption of the astrocyte template.

Impaired VEGF expression in Dp71-null mice

In order to assess the impact of Dp71 deletion on astrocyte morphology and density, the role of VEGF, a mediator of astrocyte-vessel interaction during retinal vasculature development, was assessed by measuring VEGF-A mRNA level by qRT-PCR at P3 in WT and Dp71-null mice.. Dp71 deletion was associated with a significant increase in VEGF-A mRNA level at P3 in Dp71-null mouse retinas compared to WT mice (Figure 7B), indicating that VEGF produced by astrocytes was not directly involved in the angiogenesis delay observed in Dp71-null mice.

Discussion

Understanding the retinal vascular development is crucial because many retinal vascular diseases such as diabetic retinopathy or retinopathy of prematurity are among the leading causes of blindness. To date, an increasing number of molecules are known to contribute to the formation of the primitive vascular plexus, leading to an organized architecture (Gariano

et Gardner 2005). Among the dystrophin superfamily members, the dystrophin Dp71 has been found in the ILM and around blood vessels in adult mouse retinas (Howard et al. 1998). Dp71 is mainly and strongly expressed in Müller glial cells and is critical for the clustered localization of Kir4.1 and AQP4 (Thomas Pannicke, Bringmann, et Reichenbach 2002). The role of Dp71 in maintaining retinal homeostasis led us to assume that Dp71 could play a role in astrocyte and vascular development regulation. In the mouse retina, it is well established that astrocytes act as the primary proangiogenic cell type required for the development of the retinal vascular system. We showed that Dp71 was expressed in retinal astrocytes and provided evidence that the expression of Dp71 directly correlated with the covering of the retinal surface by vessels, suggesting that Dp71 could be necessary to sustain the role of astrocytes in the development of the retinal vascular plexus.

In the nervous system, it has been demonstrated that an astrocyte-derived template is crucial for the development of angiogenesis. In the brain, the inhibition of astroglialogenesis results in a reduced astrocytic coverage, and subsequently in a reduced vessel growth and branching during the postnatal period. The authors have suggested a potentially direct role of astrocytes in promoting brain angiogenesis through interaction with blood vessels and in particular through their processes due to a close interaction with endothelial cells (Ma, Kwon, et Huang 2012b). Similarly, in the retina, several studies have shown that the formation of the primary vascular layer is closely associated with the underlying astrocytes that emerge from the optic nerve (Huxlin, Sefton, et Furby 1992; Watanabe et Raff 1988). Recently, in line with this hypothesis, a study conducted by Fruttiger et al. (M. Fruttiger et al. 1996) has shown that the extent of the astrocyte network assessed by overexpressing PDGF, a mitogen factor for retinal astrocytes (M. Fruttiger, Calver, et Richardson 2000), led to an increase in vasculogenesis. Conversely, the loss of astrocyte migration in Tlx knock-out mice was accompanied by the loss of retinal vasculature (Miyawaki et al. 2004).

Here, we analyzed the astrocyte density in Dp71-null mouse retinas from early postnatal stages to adult stage and showed a marked decrease in density compared to WT mice. One day after birth, perinatal mature astrocytes maintained their proliferative and migratory capacity, but this capacity could be lost thereafter. It has been reported in mouse retina that the termination of developmental apoptosis at approximately P10, seemed to initiate the down-regulation of Bcl-2 family members (Donovan, Doonan, et Cotter 2006). In Dp71-null mice, the decreased density of astrocytes compared to WT mice could be due to a high rate of astrocyte apoptosis (Chan-Ling et al. 2009). To date, evidence supports a role of Bcl-2 family members and the ‘classical’ mitochondrial caspase-dependent pathway in retinal apoptosis during development (Donovan, Doonan, et Cotter 2006). We have recently reported that the Bcl-2 mRNA level was increased in Dp71-null mice compared to WT mice. In contrast, the caspase-3 mRNA level did not differ between Dp71-null and WT mice (Mathari et al. 2015). Based on these findings, we could assume that the *Dp71* gene deletion could lead to retinal compensatory adaptation mechanisms against the greater loss of astrocytes in Dp71-null mice compared to WT mice. It would be interesting to further investigate the upstream signaling events that induce the decrease in astrocyte density in Dp71-null mice.

To the best of our knowledge, this is the first study to show the density of retinal astrocytes and their morphological features in a retina lacking a *DMD* gene product. Indeed, here we also showed that the Dp71 deletion affected not only the density but also strongly the morphology of astrocytes. In the brain of *mdx* mice, Nico et al. (B. Nico et al. 2004) have reported that the dystrophin Dp71 deficiency altered tight junction biogenesis which is due to the swollen and/or degeneration of perivascular astrocyte endfeet in prenatal and postnatal life.

In the retina, we have previously reported that the Müller cell endfeet are looser in the absence of Dp71 (Fort et al. 2008). Furthermore as reported by Fruttiger (Marcus Fruttiger

2007), the deeper retinal plexus is related to Müller glial cells rather than to astrocytes. The morphological change observed in Müller glial cells is probably related to the delayed development of the deeper vascular plexus.

Astrocytes show a dynamic plasticity in their distal processes in response to changes in their extracellular environment (J.-C. Lee et al. 2013; J.-C. Lee et al. 2014; Renner et al. 2013; Snook et al. 2014; Theodosis, Poulain, et Oliet 2008). Our *in situ* analysis showed that Dp71-null astrocytes had fewer processes and intersections. These structural changes could decrease the number of astrocyte processes establishing contacts with endothelial cells and neurons. The loss of astrocyte processes is directly linked to leakage of endothelial cell through the down-regulation of tight junctions (Willis, Leach, et al. 2004; Willis, Nolan, et al. 2004). We also quantified the number of times a process segment crossed over a concentric ring (intersections) and we observed that the number of bifurcations decreased significantly in Dp71-null astrocytes compared to WT astrocytes, suggesting a decrease in arbor complexity in these cells. As previously mentioned, the development of the retinal vasculature is preceded by the presence of astrocytes in the retina. They emerge from the optic nerve as a proliferating cell population forming a cellular network that provides a template for blood vessels. As reported by Fruttiger (Marcus Fruttiger 2007), there is a strict correlation between the presence of astrocytes and blood vessels in the retina. As a consequence, the changes in the fine neuroanatomy of astrocytes observed in Dp71-null mice could be an important upstream factor at the origin of the altered vascular development in these mice associated with a significant decrease in vessel density, number of their branches and branching points compared to WT mice.

All these data are consistent with the observation reported by Acosta et al. (Acosta et al. 2004) showing that a Dp71 protein deficiency in PC12 cells resulted in an impaired ability of PC12 cells to extend neuritis when incubated with nerve growth factor (NGF) to induce their

differentiation (Acosta et al. 2004; Enríquez-Aragón et al. 2005). This deficiency was responsible for a decreased adhesion activity of PC12 cells on different extracellular matrix components such as laminin, collagen and fibronectin (Enríquez-Aragón et al. 2005).

Laminin is a key component of the ILM throughout development which could play key roles in its organization. Mice with compound deletion of both the $\beta 2$ and $\gamma 3$ *laminin* genes show ILM disruption (Pinzón-Duarte et al. 2010). In accordance with this finding, we have shown that the absence of Dp71 affects laminins and significantly alters ILM organization (Vacca et al. 2014). Laminins bind to numerous cell-surface receptors, including integrins, dystroglycans, syndecans and Lutheran blood group glycoproteins (Durbeej 2010). As dystroglycans are down-regulated in Dp71-null Müller glial cells (Daloz et al. 2003), it is not surprising that in the absence of Dp71, laminins become disorganized both at the ILM and within the extracellular matrix (Vacca et al. 2014). Anchoring laminins are also essential for the development of a normal retinal vascular network. Indeed, in laminin mutant models (Edwards et Lefebvre 2013), a highly reduced number of astrocytes, with vessels only present in the peripapillary region has been reported (Gnanaguru et al. 2013). Thus based on this observation, it could be assumed that the visible disorganization of the ILM substantiated by laminin may contribute to the mechanism leading to the delayed development of the primary and deeper vascular plexus as well as the impaired astrocyte network and morphology in Dp71-null retina.

The notion that the primary plexus formation is due to sprouting angiogenesis (Marcus Fruttiger 2002) is supported by the identification of specialized endothelial tip cells at the leading edge of the growing vascular network. They extend long filopodia, suggesting that they could trigger the growth of vascular sprouts as a response to attractant and repellent guidance signals. In our work, we noticed that the deletion of Dp71 did not affect filopodia-

like process extension during the development of endothelial cells onto a preexisting astrocyte template (see arrows, figure 5B).

VEGF mediates angiogenesis by promoting endothelial cell migration, proliferation and survival. But it is also well known as a vascular permeability enhancing factor (Feng et al. 1999). Here, we showed that the deletion of Dp71 was associated with a significantly higher VEGF-A mRNA level at P3 in Dp71-null mouse retinas compared to WT retinas, suggesting that VEGF produced by astrocytes was not directly involved in the angiogenesis delay observed in Dp71-null mice.

Furthermore, the study of an adhesion molecule known to be involved in neuronal cell guidance, R-cadherin, during the early stages of retinal vascular development has shown that when this specific protein was blocked by a monoclonal anti R-cadherin antibody, the astrocytic template was not affected, unlike the retinal vascularization, suggesting that R-cadherin antibodies could prevent the guidance signals required by endothelial cells to follow the pattern preformed by astrocytes (Dorrell, Aguilar, et Friedlander 2002). In accordance with this observation, we showed that R-cadherin was down-regulated in the absence of Dp71. This could be due to a lower density of retinal astrocytes and vessels given that R-cadherin is known to be responsible for vessel branching in the primary vascular plexus as well as for the proper localization of the deep vascular network.

We have shown previously that the absence of Dp71 decreased the expression of AQP4 protein and induced the redistribution of Kir4.1, initially restricted to the endfeet of Müller glial cells along the cell membrane (Daloz et al. 2003; Fort et al. 2008). Moreover, the absence of Dp71 also leads to a decrease in β -dystroglycan expression around retinal vessels (Daloz et al. 2003). It has also been demonstrated that the deletion of the *Dp71* gene resulted in a highly permeable inner BRB which is formed by endothelial cells linked together by tight junctions, which separate the neural compartment from the blood (Sagaties et al. 1987), but

also by the surrounding pericytes, Müller glial cells and astrocytes (Choi et Kim 2008; I. S. Lee et al. 2011; Toda et al. 2011). Taken together, our data suggest that Dp71 could mediate Müller glial cell, astrocyte and endothelial cell interactions, thus preserving the integrity of the inner BRB (Shen et al. 2010). To date, we did not yet analyzed the impact of Dp71 deletion on the role of pericytes in maintaining the retinal vascular stability. Preliminary data suggest that Dp71 is expressed in mural cells but further investigations are needed to explore the impact of Dp71 deletion on their structure and function.

In this study, we provide evidence that the Dystrophin Dp71, a membrane-associated cytoskeletal protein and the main *DMD* gene product in the retina, regulates astrocyte morphology and density and is associated with subsequent normal blood vessel development. Understanding retinal vascular development is crucial because many retinal vascular diseases such as diabetic retinopathy, retinopathy of prematurity, or BRB disorders that are among the leading causes of blindness are related to the quality of this retinal vascular network. Changes in the fine neuroanatomy of astrocytes observed in Dp71-null mice could be an important upstream factor at the origin of the altered vascular development associated with a significant decrease in vessel density compared to WT mice. Knowing the key role of Dp71 in these mechanisms opens the way for further investigations aiming at identifying intermediate steps involved in angiogenesis in order to identify new therapeutic targets for the treatment of retinal vascular diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS: The authors are grateful to AFM, CONACyT, ECOS Nord, Allergan, Labex, AVOPH.

CONFLICT OF INTEREST: none.

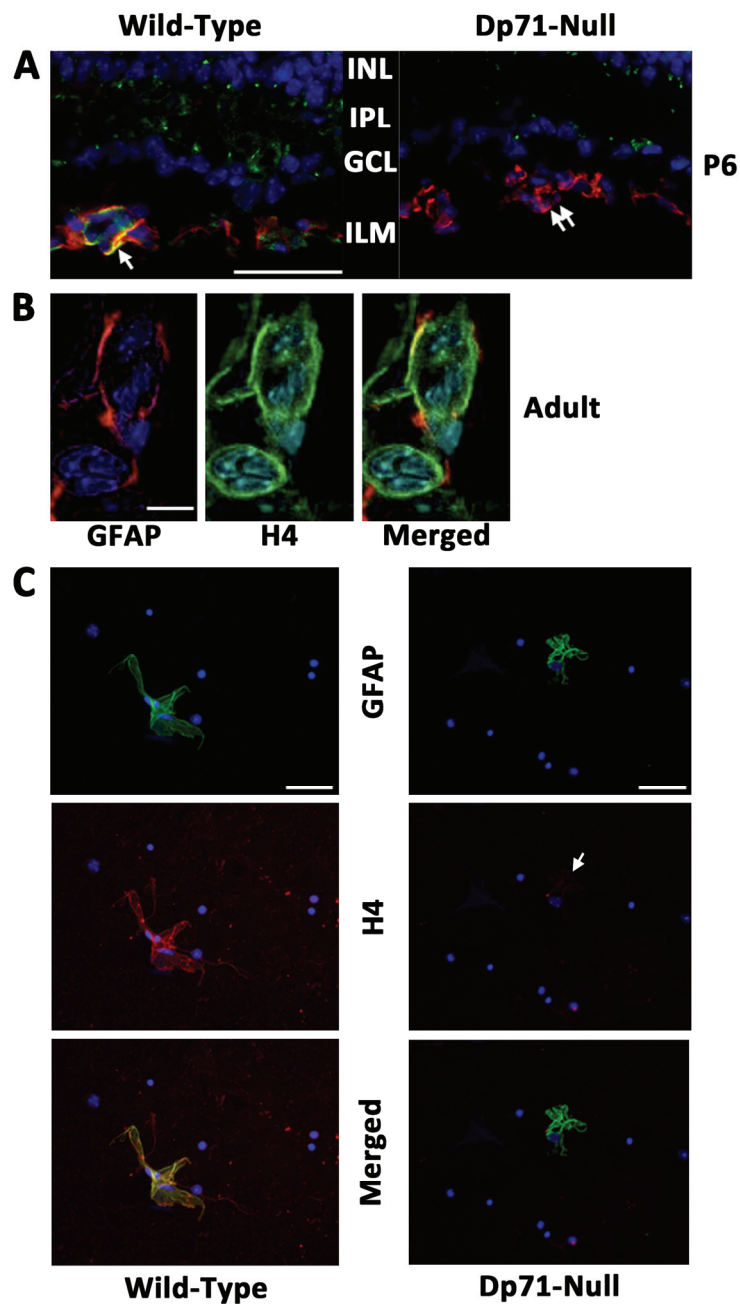


Figure 1 : Localization of Dystrophin-Dp71 in Astrocytes. (A) At P6, Dp71-null mice retina presents no significant H4 staining (green) below the limit of ganglion cells layer (double arrow). However, WT mice retina displays a clear H4 staining at the inner part of the retina (single arrow) co-localizing with GFAP staining (red) at this stage of retinal development (scale bar = 50 μ m). (B) In adult WT mice, H4 staining (green) also co-localizes with GFAP staining (red) (scale bar = 10 μ m). (C) In isolated astrocytes, H4 staining (green) co-localizes with GFAP staining (red) in WT mice whereas in Dp71-null mice, H4 staining is absent (single arrow) (scale bars = 10 μ m).

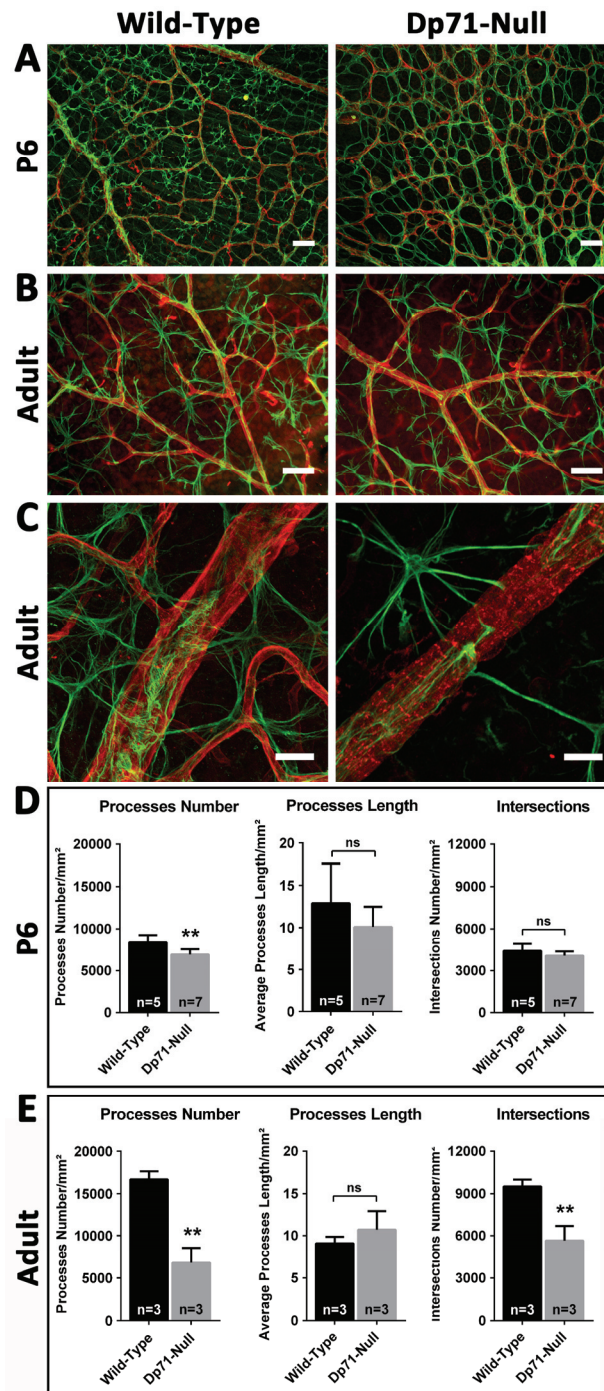


Figure 2 : Astrocytes Morphology of WT and Dp71-null mice retina. (A-B) Visualization of the astrocyte network labeled with GFAP antibody (green) and of the vascular network labeled with lectin GS (red) at post-natal day 6 (A) and at the adult age (B) (scale bars = 25 μ m). Higher magnification of astrocytes network around major vessels in adult WT and Dp71-null mice retina (C). (D-E) Quantification of the astrocytes processes number, of their length and of their intersections number on images such as A for P6 (n = 5-7) and B for adults (n = 3), using Analyze Skeleton plugin of Fiji software (Unpaired t test \pm SD; **p<0.01) (see Figure S1).

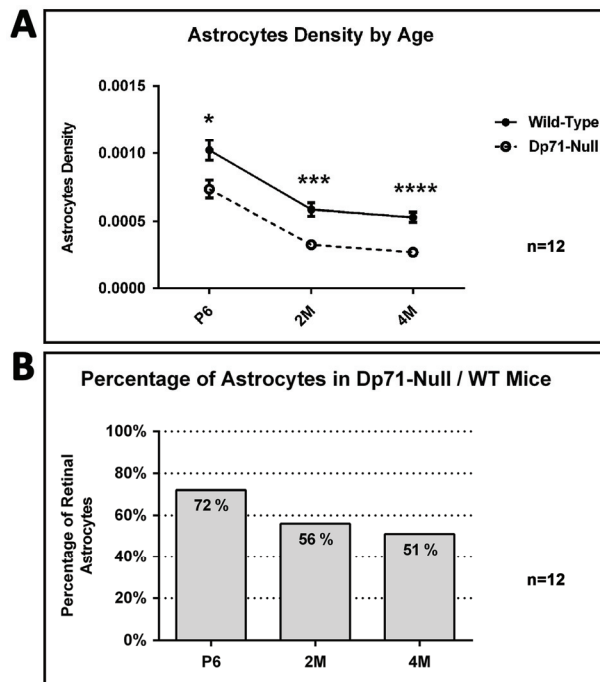


Figure 3 : Astrocytes Density of WT and Dp71-null mice retina at different ages. (A) The percentage of retinal GFAP+ astrocytes in Dp71-null mice with respect to WT mice at the same age. The ratio of astrocytes decreases with age in Dp71-null mice. More detailed information is provided in Table 1. (B) Evolution of the astrocytes density at P6, 2M and 4M after birth, expressed as the proportion of the astrocytes number for 10,000 retinal cells. The number of retinal astrocytes decreased with aging in both mice strains. Retinal GFAP+ astrocytes decreased significantly in the Dp71-null mice compared to WT mice of the same age at every age point (Mann-Whitney test \pm SEM; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; $n = 12$).

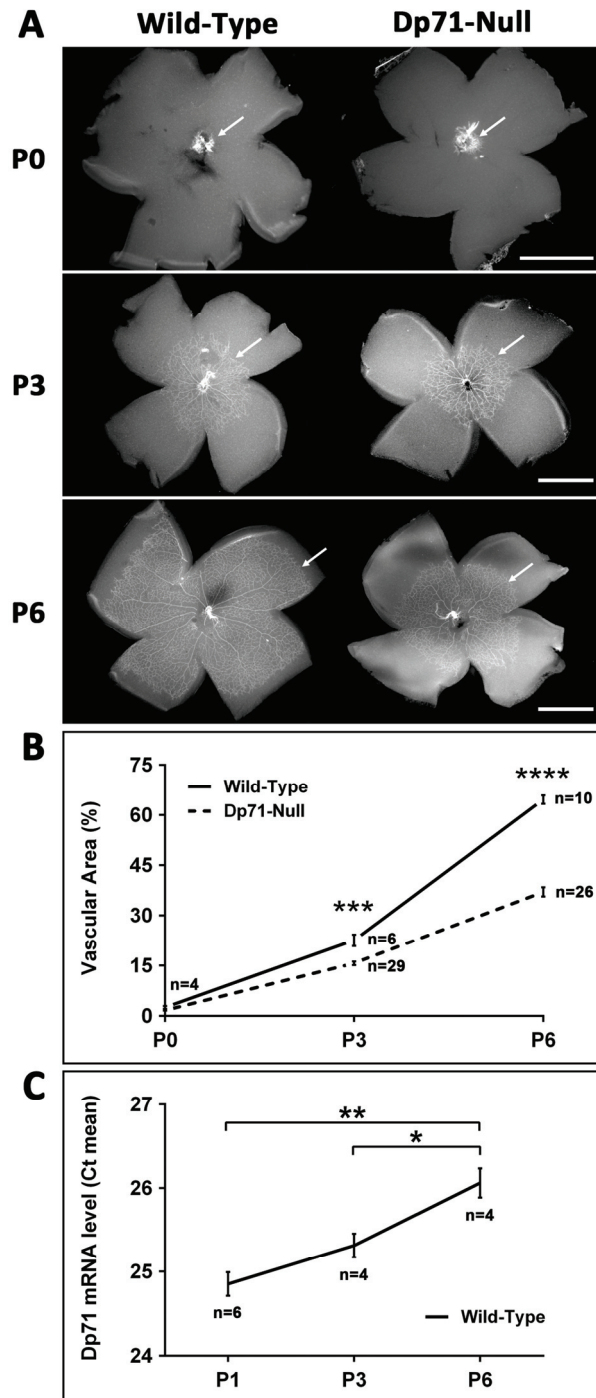


Figure 4 : Formation of the superficial vascular plexus in WT and Dp71-null mice retina. (A) Visualization of the retinal vasculature from WT and Dp71-null mice retina by lectin GS staining. At birth (P0), mouse retinal vasculature is absent. Then, vessels grow from the optic nerve to the retinal periphery. At P3 and remarkably at P6, vascular area of Dp71-null mice retina is delayed compare to WT (arrows) (scale bars = 100 μ m). (B) Representation of the superficial vascular development delay. Data show significant delay of vascular area at P3 and P6 for Dp71-null mice (Mann-Whitney test \pm SEM; *** p <0.001, **** p <0.0001; n = on the graph). (C) Dp71 mRNA expression in 10 ng of WT retina cDNA, performed in triplicate, expressed in Ct mean since normalization to β -actin was not possible. β -actin expression levels vary too much between P1, P3 and P6. The difference in Dp71 mRNA expression was statistically significant between P1 and P6 and between P3 and P6 (Mann-Whitney test \pm SEM; * p <0.05, ** p <0.01; n = 4 or 6).

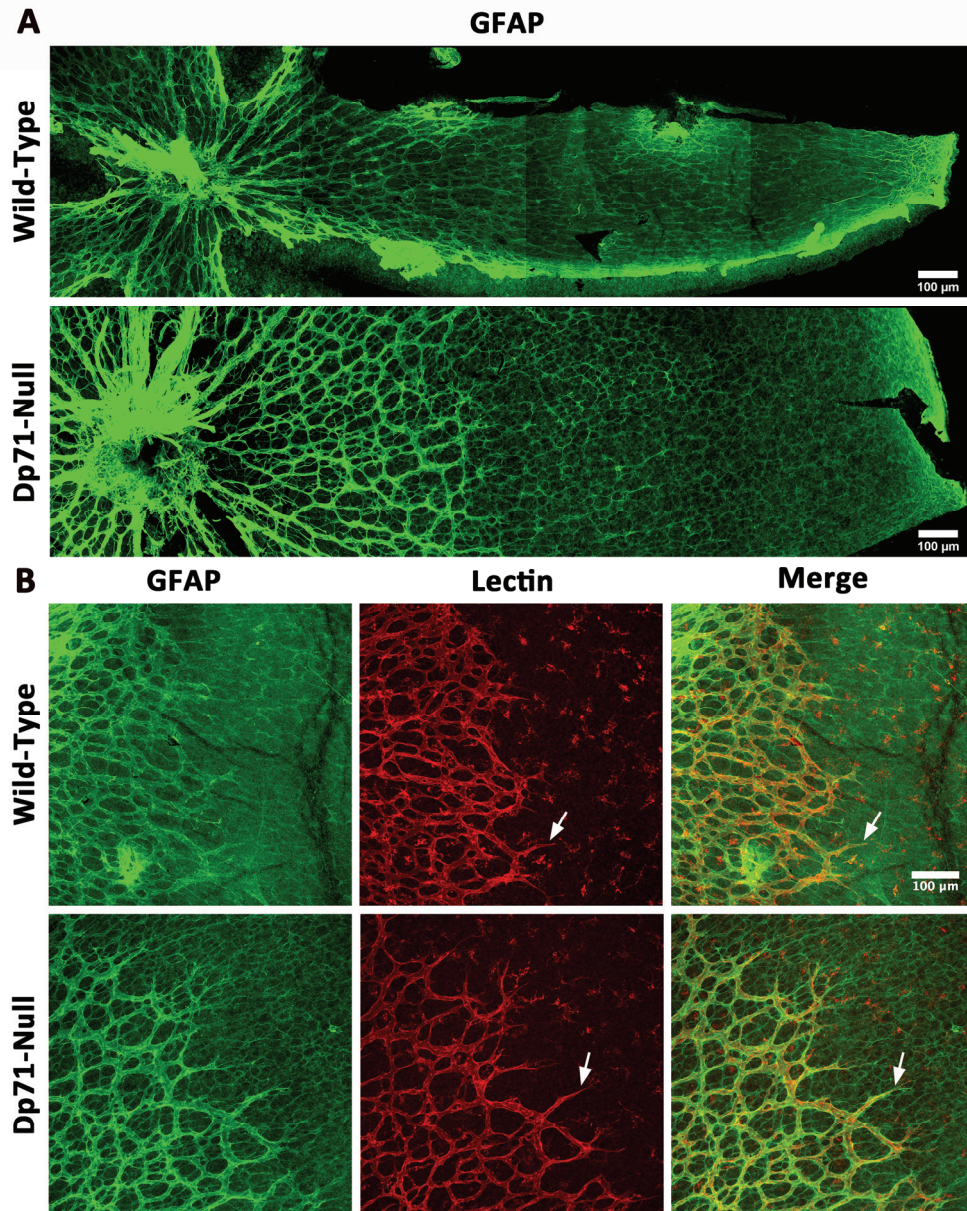


Figure 5 : Endothelial cells development onto a pre-existing astrocytes template

(A) Visualization of the astrocytes network labeled with GFAP antibody (green) on flatmount retinas showing that either in WT or in Dp71-null mice, astrocytes form a complete astrocytic network and are present at the peripheral edges of the retina from day 3 after birth. (B) Visualization of the astrocytes network labeled with GFAP antibody (green) and of the vascular network labeled with lectin GS (red) at post-natal day 3. The merge pictures show that vessels are growing onto a pre-existing astrocytes template. (scale bars = 100 μm).

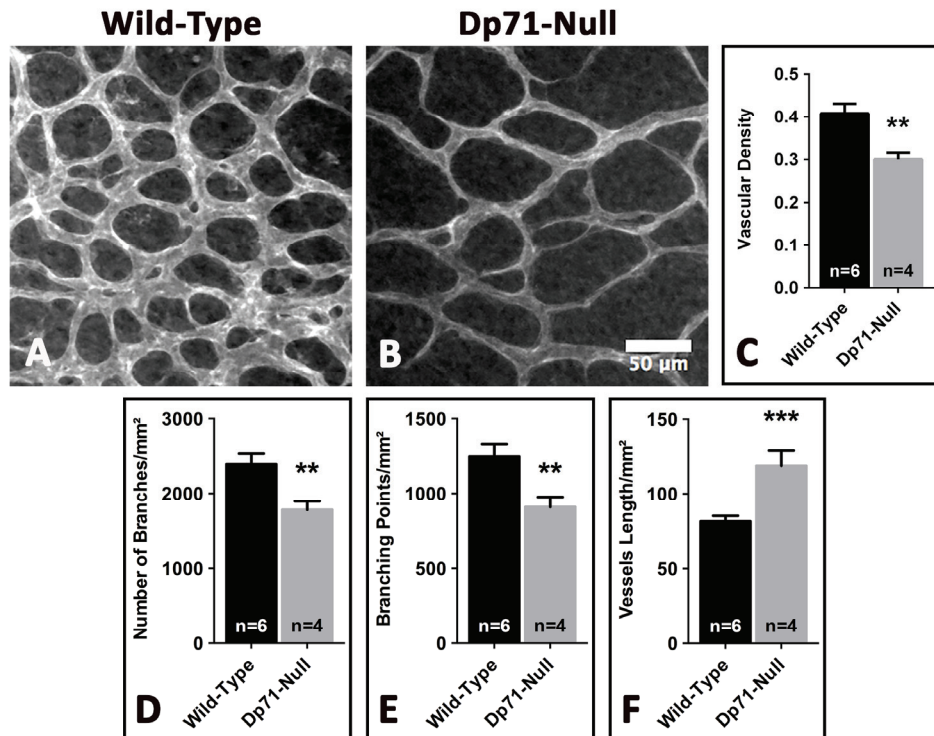


Figure 6 : Retinal vessels morphology of WT and Dp71-null mice retina. (A-B) Visualization of the retinal vascular network labeled with lectin GS at post-natal day 6 in WT (A) and Dp71-null mice (B) (scale bars = 50 μm). (C) Quantification of retinal vessels density using Fiji software. (D) Quantification of retinal vessels number of branches (D), branching points (E) and of the total vessels length (F) at P6 (n = 4 or 6) using the Analyze Skeleton plugin from Fiji software (see Figure S1, same method as for astrocytes quantification).

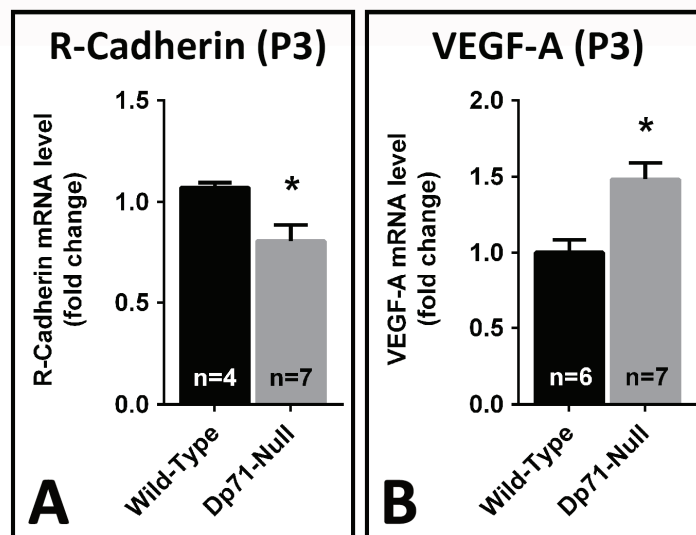


Figure 7 : R-Cadherin and VEGF-A mRNA expression level in WT and Dp71-null mice retina during superficial vasculature plexus formation. Relative mRNA expression of R-cadherin (A) and VEGF-A (B) on β-actin at P3 in WT and Dp71-null mice. The Dp71 deficient mice expressed statistically significant lower level of R-Cadherin mRNA at P3 (Mann-Whitney test ± SEM; *p<0.05; n = 4 or 7), but significantly more VEGF-A mRNA at P3 (Mann-Whitney test ± SEM; *p<0.05; n = 6 or 7).

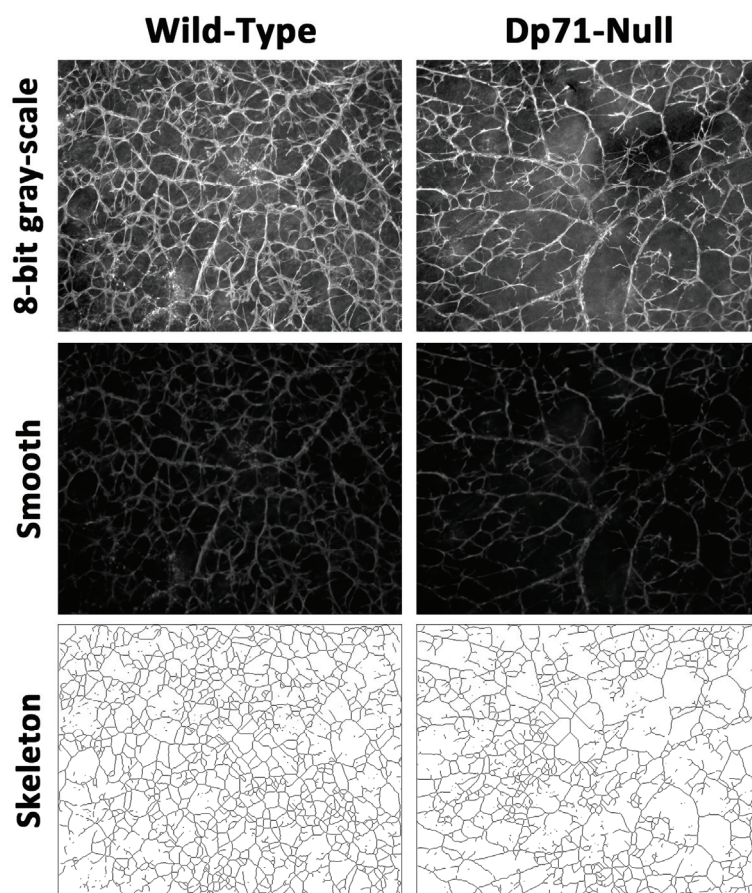


Figure S1 : Quantification of astrocytes morphology on flatmounted retinas analyzed by Fiji algorithms on two-dimensional (2D) images. (Top) 8-bit gray-scale images of adult WT and Dp71-null mice retina used for astrocytes morphology quantification. (Middle) To remove noise from these images, a smooth filter was applied. (Bottom) After adjusting of a threshold, ‘Skeletonize’ plugin allows the extraction of the skeleton that can be analyzed by ‘Analyze Skeleton’ algorithms (results in Figure 2).

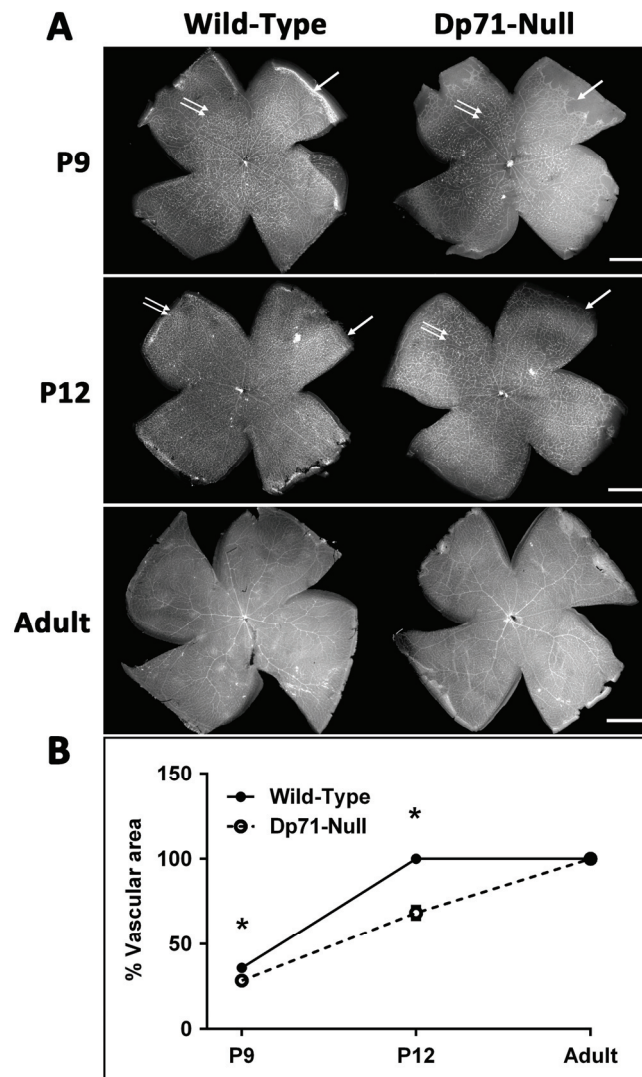


Figure S2 : Development of deeper layers of retinal vasculature in WT and Dp71-null mice retina. (A) Visualization of the retinal vasculature from WT and Dp71-null mice retina by lectin GS staining. A delay in the development of the second layer (double arrows) is visible at P9 and P12 (scale bars = 100 μ m). (B) Percentage of retinal surface covered by the second layer of retinal vasculature in WT and Dp71-null mice. In absence of Dp71, a significant delay in the development of retinal vessels deeper layers is visible at P9 and P12. Later, all retinas are covered by all vascular layers as confirmed in adult mice. (Mann-Whitney test \pm SD; * p <0.05; n = 12).

Table 1: Statistic informations of the retinal astrocytes density at different ages.

	P6		2M		4M	
	WT	Dp71-Null	WT	Dp71-Null	WT	Dp71-Null
Mean	0,001021	0,0007345	0,0005847	0,0003274	0,0005288	0,0002723
SD	0,0002625	0,0002039	0,0001684	7.276e-5	0,0001319	0,0001047
SEM	7.578e-5	6.448e-5	4.862e-5	2.1e-5	3.807e-5	3.021e-5
N	12	10	12	12	12	12
P value	P=0,0205*		P=0.0001***		P<0.0001****	

SD: standard deviation. SEM: standard error of mean. N: number of trials. Mann-Whitney test was used. All values are expressed as the proportion of the astrocytes number for 10,000 retinal cells.

Table 2: Forward and Reverse Primers

<i>Gene</i>	<i>Forward Primer</i>	<i>Reverse Primer</i>
Dp71	ATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACG	TCTGGAGCCTTCTGAGCTTC
R-Cadherin	GACGTGAGGGACAACATCCT	CTGTTGCAGCTGGCTGAG
VEGF-A	ATCTTCAAGCCGTCCTGTGT	GCATTCACATCTGCTGTGCT
β -Actin	GCTCTTTTCCAGCCTTCCTT	CTTCTGCATCCTGTCAGCAA

2- PARTIE 2

Manuscrit en préparation

Protection of Glial Muller cells by Dexamethasone in a mouse model of post surgical blood retinal barrier breakdown

Audrey Giocanti-Auregan, Lourdes Siqueiros, Ophélie Vacca, Romain Bénard, Cecilia Montañez, Michel Paques, José-Alain Sahel, Florian Sennlaub, Xavier Guillonnet, Ramin Tadayoni, Alvaro Rendon.

2-1 Situation du sujet

Notre équipe avait précédemment montré qu'en l'absence de Dp71 chez des souris mutées (Dp71-null) n'exprimant pas la Dp71, il existait à la fois une anomalie du maintien de l'homéostasie rétinienne par diminution de l'expression des canaux aqueux et une délocalisation des canaux potassiques Kir4.1 au niveau des CGM (Fort et al. 2008), ainsi qu'une rupture de la BHR (Sene et al. 2009).

A la lumière des travaux précédents et de l'article numéro 1, nous pouvons donc supposer que l'absence de Dp71 conduit à un dysfonctionnement macroglial (CGM et astrocytaire) conduisant à une augmentation de la perméabilité vasculaire ainsi qu'une réorganisation des canaux Kir4.1 et AQP4 qui sont situés au niveau du complexe membranaire dont la Dp71 fait partie et constitue un point d'encrage et de connexion au cytosquelette, permettant ainsi probablement un positionnement adapté des canaux.

Dans ce contexte, nous avons souhaité étudier, si un modèle de rupture de barrière le plus « pur » possible, ne comportant ni ischémie, ni injection de VEGF avait un effet sur les canaux potassiques Kir4.1 et aqueux AQP4, ainsi que sur l'expression de la dystrophine la Dp71.

2-2 Résumé des résultats

Nous avons donc mis au point un modèle de chirurgie du cristallin, consistant à aspirer une partie du cristallin et mettant directement en contact le contenu cristallinien avec le milieu intra oculaire, afin de reproduire le mécanisme supposé du syndrome d'Irvine Gass, qui correspond au développement d'un œdème maculaire après chirurgie. Le mécanisme suspecté du syndrome d'Irvine Gass est la production de facteurs inflammatoires lors de la mise en contact du contenu cristallinien avec le milieu intra oculaire. Cette inflammation serait à l'origine d'une rupture de la BHR interne, causant ainsi un œdème maculaire.

Nous avons donc vérifié l'existence d'une rupture de la BHR (augmentation de la perméabilité vasculaire rétinienne) par la méthode du Bleu Evans consistant à injecter ce colorant qui se fixe à l'albumine et permet ainsi de tracer l'albumine qui traverse une BHR anormale. Il existe bien dans ce modèle une augmentation de la perméabilité vasculaire immédiate après chirurgie et qui perdure 48 heures. Cette augmentation de la perméabilité vasculaire est concomitante d'une diminution d'expression de la dystrophine Dp71. Cette diminution d'expression de la Dp71 s'associe également à une diminution d'expression du canal aqueux AQP4 et à une délocalisation du canal potassique Kir4.1 qui n'est plus localisé au niveau des pieds des CGM ou en péri-vasculaire, mais qui devient indifféremment localisé tout le long de la membrane plasmique des CGM. Enfin, dans ce même modèle, nous avons réalisé des injections de faible dose de Dexaméthasone, 24 heures après chirurgie cristallinienne et observé qu'en présence de Dexaméthasone, toutes les anomalies précédemment citées (diminution d'expression de la Dp71, d'AQP4 et la délocalisation de Kir4.1) étaient évitées, comparativement à une injection de solution saline, qui n'évitait pas la survenue de ces anomalies.

Nous avons également ajouté dans cet article, un cas clinique permettant d'illustrer la faible corrélation qui existe en pratique clinique entre l'existence d'un œdème maculaire et le niveau d'acuité visuelle. A différents temps, chez un même patient, la même quantité d'œdème maculaire, mesurée en tomographie en cohérence optique (OCT) ne s'associe pas au même degré d'acuité visuelle. Les anomalies de l'homéostasie rétinienne que nous explorons au travers de ce travail pourraient constituer un des éléments d'explication de cette absence de corrélation anatomo-clinique.

2.3 Conclusion

L'augmentation de la perméabilité vasculaire rétinienne, et la diminution d'expression de Dp71, survenant dans ce modèle, confirment l'implication de la dystrophine Dp71 dans le maintien de la BHR. Cette protéine semble pouvoir à la fois être impliquée dans la rupture de BHR (Sene et al. 2009) et à la fois être la conséquence d'une telle rupture. Par ailleurs, la diminution d'expression d'AQP4, et la délocalisation de Kir4.1, concomitantes de la diminution d'expression de Dp71 confirment également l'implication de cette protéine dans le maintien de l'homéostasie et de la cohésion rétinienne. Ces résultats sont en accord avec les précédents travaux de l'équipe, portant sur un modèle murin de décollement de rétine, qui retrouvaient également des anomalies d'homéostasie rétinienne associés à une diminution de l'expression de la Dp71 (Sene et al. 2009). Par ailleurs, cette étude nous permet également de confirmer l'effet de la Dexaméthasone sur les canaux aqueux et potassiques des CGM en condition pathologique, puisque la Dexaméthasone prévient la diminution de Dp71, d'AQP4, et la délocalisation de Kir4.1.

2.4 Article 2

Protection of Glial Muller cells by Dexamethasone in a mouse model of post surgical blood retinal barrier breakdown

Authors: Audrey Giocanti-Auregan^{1,2,3,4}, Lourdes Siqueiros^{2,3,4}, Ophélie Vacca^{2,3,4}, Romain Bénard^{2,3,4}, Sijia Cao^{2,3,4}, Cecilia Montañez⁵, Michel Paques^{2,3,4,6}, José-Alain Sahel^{2,3,4,6,7}, Florian Sennlaub^{2,3,4}, Xavier Guillonneau^{2,3,4}, Ramin Tadayoni^{2,3,4,8*}, Alvaro Rendon^{2,3,4}.

Affiliations:

1. Avicenne hospital, Ophthalmology department, 125 rue de Stalingrad, Bobigny
2. Institut de la Vision, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 968, Paris, F-75012, France;
3. INSERM, U_968, Paris, F-75012, France;
4. CNRS, UMR_7210, Paris, F-75012, France;
5. Department of Genetics & Molecular Biology, Research Centre for Advanced Studies, IPN, Av. I.P.N. 2508, C.P. 07360 Mexico City, Mexico.
6. Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts, DHU ViewMaintain, INSERM-DHOS CIC 1423, Paris, F-75012, France;
7. Fondation Ophtalmologique Rothschild, Paris, F-75019 Paris, France;
8. Ophthalmology departement, Hôpital Lariboisière, AP-HP, Université Paris 7 – Sorbonne Paris Cité, 2 rue Ambroise Paré, 75010 Paris

Alvaro Rendon and Ramin Tadayoni have contributed equally to the work

None of the authors declare any conflicts of interest concerning the topic of this report

Keywords: blood-retinal barrier; retinal edema; Irvine Gass syndrome; dystrophin Dp71 mouse model; ocular surgery; macular edema.

Abstract

Purpose.

Breakdown of inner blood retinal barrier (BRB) occurs in diabetic retinopathy, retinal vein occlusions, and uveitis. This breakdown can lead to a retinal edema, which is often responsible for vision loss.

The purpose of our study was first to reproduce and quantify permeability of the inner blood retinal barrier (BRB) in a post-surgical model of BRB breakdown in mice. And secondarily, to characterize the impact of this BRB breakdown on Muller glial cells (MGC), and particularly on protein Dystrophin Dp71, and aqueous and potassic channels AQP4 and Kir4.1. Furthermore, we sought to further characterize the effect of Dexamethasone on these proteins in this model.

Methods.

We performed a partial lens surgery in C57BL6/J mice that induces an Irvine Gass syndrome. We quantified permeability of the inner BRB applying Evans blue method. We quantified the effect of the partial lens extraction on expression of Dystrophin Dp71, AQP4 and Kir4.1 using quantitative RT-PCR, Western Blot and immunohistochemistry. Twenty-four hours after surgery, some of the mice were treated with a single intravitreal injection of dexamethasone (DEX) while control mice were treated with a single injection of vehicle. We compared the effect of both of these 2 treatments on expression of Dystrophin Dp71, AQP4 and Kir4.1, and on permeability of the inner BRB.

Results.

Inner BRB permeability increased after partial lens surgery. After partial lens surgery only or when the surgery was followed by a treatment with intravitreal vehicle injection, Dp71 and

AQP4 proteins decreased and Kir 4.1 was delocalized. When partial lens surgery was followed by intravitreal DEX injection, Dp71 and AQP4 proteins did not decrease, and Kir4.1 did not delocalize even at a dose of DEX, which did not affect the inner BRB permeability.

Conclusions.

Partial lens surgery induces an inner BRB breakdown. This BRB breakdown is responsible for molecular changes in MGC such as increase in expression of Dp71, AQP4 and delocalization of Kir4.1. Those proteins are thought to have a key role in retinal homeostasis, but seem to suffer from a BRB breakdown. DEX seems to protect retina against the molecular changes involved in BRB breakdown.

INTRODUCTION

Inner blood retinal barrier (BRB) involves retinal endothelial cells, pericytes, and Muller glial cells (MGC). The presence of transport processes and tight junctions around the cells composing the inner BRB regulates the transport of ions, nutrients and toxic molecules between the retina and vessels. Formation and maintenance of this barrier is required for a normal vision. The loss of this barrier changes the balance of fluids in retinal tissues from retinal vessels and can lead to retinal edema. BRB breakdown usually leads to retinal thickening called retinal edema. In rare cases, BRB breakdown can be compensated by the permanent fluid absorption by the retinal pigment epithelium (RPE), which forms the outer blood retinal barrier, and by MGC [1] with no retinal thickening. While RPE cells dehydrate sub-retinal spaces, MGC dehydrate the inner retinal tissue [1]. An excess of fluid in the retina associated with an exceeding of the absorption capacities of the outer BRB, and MGC, leads to retinal edema. Retinal edema complicates the course of many retinal diseases such as central retinal vein occlusion, uveitis, and diabetic retinopathy (first cause of blindness worldwide in people of working age). Vision loss following retinal edema is complex and not yet completely understood. Moreover, retinal edema is partially correlated to loss of vision, and visual acuity is weakly correlated with the central foveal thickness in humans. Nevertheless, visual acuity seems to decrease with the duration of edema, probably due to neural tissue damages. There are evidences that retinal edema involves also MGC, with their swelling, associated to the commonly known increased extracellular fluid [2].

MGC are the principal glial cells of the vertebrate retina. One of the functions of MGC is to ensure retinal tissue homeostasis by maintaining the ionic balance of the extracellular fluid and to participate to the maintenance and regulation of BRB [3, 4]. This function is performed by the cooperation of selective water transport protein, Aquaporin-4 (AQP4) with rectifying potassium channels (Kir) especially Kir4.1 [5, 6]. In normal mice retina, AQP4 and Kir4.1

proteins, are both strongly expressed in MGC where these proteins are mostly localized at the inner endfeet and in cell processes surrounding blood vessels. In many retinal diseases, such as diabetic retinopathy (DR), retinal vein occlusion, and retinal detachment with BRB breakdown, the expression and distribution of these channels in MGC is altered [7-10]. Another important function of MGC is the uptake of neurotransmitters from nerve terminal, because some of them could be toxic on neuronal cells while they are in the extracellular space.

We have previously shown, in our laboratory, that an experimental retinal detachment in mouse induces reactive gliosis and alterations in protein expression or localization of AQP4 and Kir4.1 in MGC [11]. This was showed to be associated with a decrease of a Dystrophin protein, called Dp71. Dp71, a cytoskeleton membrane associated protein, was showed to be mainly localized in MGC within the retina [12], and responsible for the clustering and anchoring of AQP4 and Kir4.1 [7, 13], which regulate water and potassium transportation through MGC. The study of Dp71, the smallest product of Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene and the main DMD gene product in non-muscle tissues, has acquired relevance since we know the involvement of this protein deficit in retinal dysfunction. First, electroretinogram performed on DMD patients reveals indeed a reduction in the amplitude of the b-wave in 80% of patients [14]. Secondly, the genetic inactivation of Dp71 (in Dp71-null mice) is associated with a change in AQP4 expression, Kir4.1 distribution in MGC and BRB breakdown [11] on the one hand, and these modifications increase the vulnerability of retinal nerve cells to transient ischemia [7, 13] on the other hand.

Regarding the localization of Dp71 in mouse retina, this protein is found surrounding blood vessels and at the inner limiting membrane of the retina, which has been showed comparing mice deficient for Dystrophin Dp71 (Dp71-null mice) and wild type mice [7, 13]. Furthermore, osmotic swelling capacity of MGC has been shown, when they are exposed to a

hypotonic solution, and this capacity is exceeded while there is a lack of Dp71 in Dp71-null mice [11]. In previous studies of MGC, Dystrophin Dp71 (Dp71), seems to be responsible for an important contribution in the maintenance of a dry retina, by its action on AQP4 and Kir4.1 channels [15]. This was only suggested in a retinal detachment model in mice, and we would like to confirm these results in a BRB breakdown model.

To further explore the role of MGC, in case of BRB breakdown and the implication of Dp71, AQP4, and Kir4.1, we sought to adapt in mice, a post surgical model of BRB breakdown, reproducing an Irvine Gass syndrome, which is a post-surgical macular edema, observed in around 1% of cases after cataract surgery in humans. To study the implication of these proteins, it was necessary to work with a model of blood retinal breakdown as pure as possible excluding BRB breakdown models associated with vascular or ischemic lesions, or induced by VEGF injection, or in the Dp71-null mice model of BRB breakdown, which could directly act on these proteins. The aim of the study was to evaluate the probable pathway leading from a BRB breakdown induction to AQP4 and Kir4.1 expression or localization modifications, and to find a way to prevent these modifications to occur. Dexamethasone (DEX) was the candidate drug we chose.

Glucocorticoids have indeed been used for decades to treat cerebral edema [16, 17]. They are currently injected intravitreally to lower macular edema in diabetic retinopathy and retinal vein occlusions because of their anti-inflammatory and anti-edematous effects on the retina [18], despite side effects such as intraocular hypertension, cataract. Furthermore, in rat retina, DEX controls the expression of the potassium channel Kir4.1 in MGC [19]. Intravitreal injections of DEX in a streptozotocin-induced diabetic rat model inhibit also significantly the BRB breakdown [20, 21].

The purpose of our study was first to reproduce a post-surgical model of BRB breakdown [22] in mice and quantify permeability of the inner blood retinal barrier (BRB) with a

different method. And secondarily, to characterize the impact of this BRB breakdown on Muller glial cells (MGC), and particularly on Dystrophin Dp71, and aqueous and potassium channels AQP4 and Kir4.1. Finally, our last aim was to study whether DEX had an effect on these proteins.

MATERIAL AND METHODS

Animal care and surgical procedure of partial lens surgery

For this study, we used 8 week-old C57BL/6J mice (Janvier, St Bethervin, France) in accordance with the ARVO statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. We performed the surgical procedure on the left eye. For the procedure, we anesthetized mice using Isoflurane. Prior to the surgery, the pupils were dilated with topical phenylephrine (2,5%) and tropicamide (1%). Under an operating microscope, a 30-gauge needle was inserted through the limbus into the lens of adult male C57BL/6 mice. The anterior portion of the lens was aspirated before removing the needle. In order to develop this surgical procedure (Figure 1A), we simplified a previously described method of post-surgical breakdown of the BRB in a mouse model [22].

Quantification of blood-retinal barrier permeability

We applied in mice the BRB breakdown quantification method using Evans blue described in the literature in rats [23] and already used in mice [11]. Evans Blue dye (Sigma, St Louis, MO) was prepared by dissolution in a normal saline solution (6mg/mL), sonication for 5 minutes in an ultrasonic cleaner (G1125P1T; Laboratory Supplies, Hicksville, NY), and filtration through a 5 μ m filter (Millipore, Bedford, MA). Subsequently, Evans blue was injected to the mice through the penis vein under ISOFLURANE anesthesia. Following Evans blue injection, the mice turned blue, confirming the uptake and distribution of the dye. Blood

samples were drawn 3 hours after injection of the dye before mice were perfused for 2 minutes via the left ventricle with a citrate buffer (0.05 M, pH 3.5) warmed up to 37°C. At this step, mice were sacrificed and both of the eyes were enucleated and carefully dissected. Retinas were dried in a Speed-Vac overnight, weighed and the Evans blue dye was extracted by incubating the retina with 100 µl of formamide for 18 h at 70°C. Retina samples were centrifuged at 4 000 rpm for 2 hours and blood samples were centrifuged at 12 000 rpm for 15 minutes. Both supernatants were used to measure absorbance. A background-subtracted absorbance was determined by measuring each sample at both of the wavelengths 620 nm, the maximal absorbance for Evans blue, and 740 nm, the minimal absorbance. Evans blue concentration in the plasma and the retina was calculated from a standard curve of Evans blue in formamide. Blood-retinal barrier permeability was expressed in microliter of Evans blue per gram of dry retina per hour ($\mu\text{l Evans blue} \times \text{g dry retina}^{-1} \times \text{h}^{-1}$). BRB permeability was quantified 24, 48, 72, and 96h after lens surgery in different group of mice (8 mice for each time point).

Intravitreal dexamethasone injection and experimental procedure

Mice were anesthetized by isoflurane inhalation and pupils were dilated with tropicamide (1%) and phenylephrine hydrochloride (2.5%). A single dose (1 µL) of 10 mg/ml of DEX (Sigma-Aldrich, France) diluted in balanced salt solution (Alcon Laboratories, Inc.) was injected into the vitreous of the left eye with a 33-gauge microinjector (Hamilton, Switzerland) under a surgical microscope (Leica). In a control group of mice, the left eye received an equal volume of vehicle (balanced salt solution). We realized all injections under surgical microscope in order to not wound the lens during intravitreal injection.

For experimental procedure, lens surgery was performed at Day 0. Twenty-four hours after surgery, mice received either DEX (DEX group) or vehicle injection (vehicle group). 22

mice were treated per group. The BRB permeability was quantified after the sacrifice by the Evans Blue method 24h (5 mice sacrificed in the DEX group and 5 mice in the vehicle group) and 48h (5 mice sacrificed in the DEX group and 5 mice in the vehicle group) after intravitreal injection. 72h after intravitreal injection, 12 mice in the DEX group and 12 mice in the vehicle group were sacrificed and eyes were removed for protein extraction.

Quantitative RT-PCR analysis of retinal RNA

In 4 control mice, and in 4 mice at each time point (24h, 48h and 72h after lens surgery), the total RNA from the left retina was extracted using Trizol reagent (Invitrogen, France) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed on 5 µg total RNA using SuperScript II and random hexamers (Invitrogen, France). PCR amplifications of cDNA were performed using power SYBR Green[®] (Applied Biosystems, UK) on a LightCycler instrument (Applied Biosystems, UK). PCR primers were designed using Primer3 software [24]. The following primer pairs were used: Dp71, sense 5'-ACAACCATGAGGGAACACCT-3', anti-sense 5' TCTGGAGCCTTCTGAGCTTC-3'; β - Actin, sense 5'-GCTCTTTTCCAGCCTTCCTT-3', antisense 5'-CTTCTGCATCCTGTCAGCAA-3'. For relative comparison, the Ct values of real-time PCR results were analysed using the dCt method according to the manufacturer's instructions. The amount of Dp71 cDNA was normalized to the standard internal control obtained using primers for β -Actin.

Western blot analysis

In 6 control mice, and in 6 mice at each time point for Dp71 (24h, 48h and 72h after lens surgery), Western blot analysis was performed as previously described [25]. Basically, retinal protein from the left retina was extracted and resolved using NuPAGE Tris– Acetate 3–8% gradient gels (Invitrogen, France) and electrotransferred to polyvinylidene difluoride (PVDF, Millipore, Billerica, MA) membranes according to the manufacturer's instructions. PVDF membranes were blocked in PBS containing 0.1% Tween 20, 1% BSA, 5% dry milk (Bio-Rad, France) for 1 h at room temperature then incubated with the primary antibody in the same blocking buffer. Blots were then washed and incubated with the secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch laboratories). Chemiluminescence was performed using ECL plus Western blotting detection system (X) and documented on film (GE Healthcare, UK).

Immunohistochemistry

Enucleated eyes were dissected to remove lens and cornea, and fixed by immersion in 4% paraformaldehyde for 1 h. Fixed eyes were cryoprotected in 30% sucrose, frozen and embedded in Cryomatrix (ThermoScientific, Strasbourg, France), and then cut into 10 μ m cryostat sections and mounted on SuperFrost/Plus slides (Microm, Francheville, France). Sections were prepared for hematoxylin and eosin staining or immunohistology. Sections were permeabilized for 10 minutes with 0.1% PBS (Phosphate Buffer Saline) -Triton X100 and blocked for 1 h with 1% bovine serum albumin, 0.1% Tween 20, and PBS. Sections were then incubated with primary antibody at 4°C for night. Polyclonal antibodies directed against dystrophins (H4) were previously characterized, whereas the ones directed against Kir4.1 and AQP4 were from Alomone Labs (Souffelweyersheim, France).

After several washes with PBS, secondary antibodies (Interchim, France) coupled to Alexa fluor (Invitrogen, France) were used diluted 1:800 in 1% bovine serum albumin, 0.1% Tween 20, and PBS for 1 h. Sections were washed, mounted with Fluorsave reagent (Millipore, Billerica, MA) and viewed with a confocal microscope. To evaluate rate of Dp71, we used ImageJ to quantify pixel green dye (H4 staining) and we focalised ILM region.

Semi-quantification of Dystrophins, AQP4, Kir4.1

Confocal micrographs of fluorescent specimens from retinal sections preparations were captured using a Zeiss LSM 700 Meta Axioplan 2 laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss) equipped with argon and helium-neon lasers. Images were captured, in the same area with same objective and intensity. In order to compare the expression and localization of proteins, we performed an immunolocalization of GFAP, Dystrophins, AQP4 and Kir4.1 on retinal sections. For all comparison, we used the same localization of sections within the retina through the optic nerve. We proceeded in a pixel quantification of the staining for each single protein using a semi-quantitative measure of the staining with the software ImageJ. First, we selected the same area of interest in both of the sections to compare. We integrated density and the mean gray value, of the area of interest after subtraction of the background.

We calculated the corrected total cell fluorescence (CTCF), which was defined by the following formula: $CTCF = \text{Integrated Density} - (\text{Area of selected cell} \times \text{Mean fluorescence of background readings})$. For IPL and ILM, we considered the complete area of the section captured for calculation. For vessels, we quantified 20 vessels, on the captured area. (n=6 retinas).

Data analysis

Mann-Whitney U-test on Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA) was used for comparison of quantitative data.

RESULTS

Partial lens surgery increases inner BRB permeability

Using Hematoxylin and Eosin staining, we confirmed lens anatomic changes on cryosections after partial lens surgery (black arrow, Fig. 1B et C). Retinal vascular permeability was assessed in C57BL6/J (control) and in C57BL6/J after partial lens surgery, 24, 48, 72 and 96h after surgery using the Evans Blue-dye technique [19]. In C57BL6/J control mice, we found an Evans Blue extravasation rate at $4,03 \pm 0,5 \mu\text{l Evans blue} \times \text{g dry retina}^{-1} \times \text{h}^{-1}$. The Evans Blue extravasation was increased in mice after lens surgery, up to $13,78 \mu\text{l Evans blue} \times \text{g dry retina}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ (SD 2,5), and $13,23$ (SD 2,5), respectively 24 and 48 hours after lens surgery. The difference of BRB permeability assessed by Evans Blue method was statistically significant between control and post-surgical mice for 2 time-points, 24h ($p < 0,001$) and 48h after surgery ($p < 0,001$). At the following time-points (72 h and 96h), the permeability of BRB came back to normal and was at $5,65 \mu\text{l Evans blue} \times \text{g dry retina}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ (SD 1,1) at 72h and at $6,1 \mu\text{l Evans blue} \times \text{g dry retina}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ (SD 1,2) at 96h (fig 1D).

Increased BRB permeability was associated with downregulation of Dystrophin Dp71

In real time PCR, mRNA-rate of Dp71 significantly decreased 24h and 48h after surgery and came back to normal after 72h (Fig. 2A). 72 hours after lens surgery, Western blot analysis confirmed a significant decreased of Dp71 protein expression, followed by a slightly delayed decrease of mRNA (Fig. 2B and C). Immunohistochemistry localized Dystrophins immunoreactivity as expected by previous reports [26, 27] mainly around blood vessels (Fig. 2D and E arrow) and at the endfeet of MGC in the inner limitant membrane (ILM) (Fig. 2E, arrowhead) of control retinas. 72h after lens surgery, Dystrophin staining decreased strongly by 50% (Fig. 2F and G).

Changes in AQP4 expression and in Kir4.1 localization in MGC

Western Blot identified a downregulation of AQP4 protein after 72h in mice with lens surgery (Fig. 3J). Moreover, the semi-quantitative analysis of AQP4 staining intensity decreased by 30% after lens surgery in ILM and 15% around the vessels (Fig. 3F and H) compared to control (Fig. 3 E and H). AQP4 was localized at the endfeet of Müller cells in the control retinas (Figure 3E). When AQP4 in eyes with lens surgery was quantitatively decreased, its preferential localization around vessels and at the endfeet of MGC did not seem to change.

Kir 4.1 protein total expression was assessed in control mice and in mice with lens surgery. In Western Blot, Kir4.1 protein level did not changed (Fig. 3I and and K) between control and mice with lens surgery. However, Kir4.1 was distributed all along the Müller cells fibers (Fig 3D) in mice with lens surgery. The semi-quantitative Kir4.1 expression was higher in the inner plexiform layer (IPL) in mice with lens surgery (Fig. 3G) compared to controls. Kir4.1 was localized in the enfeet of Müller cells in the ILM and around blood vessels of control retinas (Fig. 3C) as previously described [5, 6]. Those results suggest a delocalization of Kir4.1 channels from the endfeet of MGC to the MGC fibers after partial lens surgery.

Dexamethasone injection prevented Dp71 from down-regulation

72h after surgery, we observed a decrease of Dp71 protein expression (Fig. 2C) in mice with lens surgery followed or not by vehicle intravitreal injection (Fig. 4B). However, 72 hours after surgery in mice with lens surgery, followed by DEX intravitreal injection, Dp71 expression did not decrease in the retina (Fig. 4A et 4B).

Similarly, we showed a decrease in Dystrophin staining semi-quantification in ILM and around vessels in mice with lens surgery followed or not by intravitreal vehicle injection (Fig. 5B). When there was no decrease in DP71 expression at ILM level in mice with lens surgery followed by DEX intravitreal injection (Fig 5C).

DEX injection prevented downregulation of AQP4 and delocalization of Kir4.1

72h after surgery, we observed a decrease of AQP4 protein expression (Fig. 3F) in mice with lens surgery followed or not by vehicle intravitreal injection (Fig. 5J). However, 72 hours after surgery in mice with lens surgery followed by DEX intravitreal injection, AQP4 expression did not decrease in the retina (Fig. 5K) particularly in the ILM (Fig. 5L). These results confirmed that DEX prevented also AQP4 from downregulation 72h after lens surgery. 72h after lens surgery we observed that Kir4.1 was predominantly localized in the IPL in mice with lens surgery followed or not by vehicle intravitreal injection (Fig.3C). On the contrary, 72h after lens surgery in mice with lens surgery followed by DEX intravitreal injection (Fig.5G), and in the control mice (Fig.3B), the staining of Kir4.1 was widely lower in the IPL. These results confirmed that DEX prevented delocalization of Kir4.1 to the IPL, 72h after lens surgery.

Clinical case of a patient suffering from an Irvine Gass syndrome

To illustrate the weak correlation between macular edema and visual acuity, we added the case of a patient suffering from an Irvine Gass syndrome, which is a retinal edema, following a cataract surgery on his left eye. We added the OCT of this eye who was seen first with a retinal edema and a visual acuity at 20/32 (Fig. S1.A). We can note in our case that the visual acuity remained stable despite an increase in central retinal thickness over the months (Fig. S1B and C), meaning this thickening was weakly correlated to visual acuity. Then a few weeks later, when our patient was suffering from the same amount of edema, a major loss of vision occurred at 20/63 (Fig. S1.D). After injection of DEX in our patient, the fluid has completely gone, but we did not restore the previous visual acuity. This case illustrates that BRB breakdown, and even retinal edema is not sufficient to lower vision, and there is often a

delay between, central retinal thickness and vision loss. This case underlines a temporal dissociation between retinal edema and loss of vision.

DISCUSSION

BRB breakdown can lead to formation of retinal edema, which could contribute to a decrease of vision, and which is diagnosed in clinical practice with an Optical Coherence Tomography (OCT).

The diagnosis is made on OCT, when we observe a thickening of central retina, with fluid appearing hypo reflective on retinal scans. Nevertheless, we know that the loss of vision in patients suffering from retinal edema is weakly correlated to BRB breakdown, and to foveal thickness. This has been already suggested in the literature (Restore study 2 years/ rise and ride 3). We suggest that BRB breakdown, and retinal thickening do not explain completely the loss of vision in retinal edema, and that MGC play a crucial role in these dissociations, as it was suggested before. In order to better understand these phenomenons in humans, we studied a mice model of BRB breakdown and applied DEX on it to study these dissociations.

We have adapted a model of BRB breakdown [22], by partial lens surgery and we have confirmed increase in retinal vascular permeability with Evans Blue method [23]. BRB breakdown happening after partial lens surgery seems consistent with what we observe in humans, called Irvine Gass syndrome, which is a rare situation of BRB breakdown and retinal edema after cataract surgery due to post operative inflammation [28].

In this model in mice, we sought to explore changes in Kir4.1 localization, and in AQP4 quantification, which are two channels responsible for the maintenance of osmotic homeostasis in the retina [29, 30]. The localization and proper clustering of these two channels seem to be crucial to control hydratation of the retina [8, 31]. In healthy retina, Kir4.1 and AQP4 proteins are strongly expressed by MGC and particularly localized at the endfeet of MGC or in the processes surrounding blood retinal vessels [32, 33]. In this model, we found AQP4 decreased and Kir4.1 not particularly localized at the endfeet or in the perivascular processes of MGC, but all along the membrane of MGC without polarization. To

further understand the different pathways involved in this model and leading to these channels changes, we studied the implication of Dystrophin Dp71 in MGC, because this protein was suggested to play a crucial role in MGC functions such as retinal water homeostasis and BRB maintenance [11]. Dp71 is a particularly interesting protein to explore because it is a part of a complex responsible for anchoring and proper clustering of ionic channels AQP4 and Kir4.1 in MGC.

In our model, Dp71 decreased in RNA expression chronologically followed by protein expression, 72h after partial lens surgery. This decrease of Dp71 associated with channels changes in MGC, is coherent. Indeed the function of Dp71, as it was suggested previously, is most likely to stabilize Kir4.1 and AQP4 channel molecules in specific membrane domain of MGC [7, 13, 26].

It has been already shown in our laboratory that the lack of Dp71 in Dp71-null mice decreased AQP4, changed the localization of Kir4.1 and increased BRB permeability, which led to a BRB breakdown [7, 13, 27]. The pathway leading from partial lens surgery to BRB breakdown on one hand, and Dp71 decrease, on the other hand is still unclear, but we have shown in this model, that partial lens surgery and /or BRB breakdown led to decrease in Dp71, which was responsible for changes in AQP4 and Kir4.1 in MGC [11]. However the accurate mechanisms involved in between are still unclear, even if it appears that glial cells were activated in our model (figure 3). There was indeed GFAP expression after lens surgery in MGC localization identically to what was observed previously in a retinal detachment model in mice with the same channels changes in MGC [11].

We chose to inject intravitreally DEX in eyes of our mice in this model. We chose this molecule because DEX has already proven efficiency in the treatment of retinal edema in humans, and its anti inflammatory effect was higher than other corticosteroids. The injection of DEX in this model was very useful to partially understand these mechanisms. Previous

works have demonstrated that intravitreal DEX restored an effective BRB in diabetic rats [21, 36], and inhibited VEGF-induced vascular leakage in rabbits [37]. At a high dose (1 μ M), in vivo, it has been already shown that DEX increased the Kir4.1 level in a normal rat retina, but a low dose (100nM) had no effect [19]. However, in a pathological model of endotoxin induced uveitis (EIU), at low dose (100nM), DEX regulated Kir4.1[19]. To the best of our knowledge, intravitreal DEX injections in mice were never used for restoring BRB permeability neither in restoring AQP4/Kir4.1 changes occurring in MGC during a BRB breakdown. We chose to reproduce the known effect of DEX on BRB, as it was previously shown in rats, and we adapted the dose of intravitreal injection (50 μ g) in rats to the weight of our mice, and we injected intravitreally 10 μ g to our mice. At this very low dose of DEX (23nM), in our model, we observed no action on BRB permeability, when, we observed an effect, in preventing Dp71, and AQP4 to decrease, and Kir4.1 to delocalize. Those results would suggest that DEX would have a direct effect on Dp71 and AQP4/Kir4.1, independently to its effect on BRB. By injecting a DEX dose with no effect on BRB, we created dissociation between BRB breakdown, on the one hand, and ionic channels (Kir4.1/AQP4) changes in MGC on the other hand. The effect of DEX on Dp71, allow us to complete the pathway of DEX action on MGC, first describe by Zhao et al. [19] and to characterize one previous step (figure 7). Zhao et al. described an effect of DEX on ionic channels AQP4 and Kir4.1 in MGC, we hypothesize, that DEX regulates first Dp71, and Dp71 regulates then AQP4 and Kir4.1. And these protein changes independent to BRB breakdown could be one part of explanation of the dissociation observed in clinical practice. The regulation of these ionic changes in MGC, partially independent from BRB breakdown could be responsible for vision loss, or at least could worsen the visual acuity during macular edema. These mechanisms are important to be understood, because, we now know in clinical practice how to eliminate fluid in the retina most of the time, but we do not know yet how to protect the retina during the

blood retinal breakdown and to restore a normal MGC in order to eliminate neurotransmitters from extracellular space which could be toxic for neurones during BRB breakdown. This retinal protection could imply the inhibition of these ionic changes in MGC.

CONCLUSION

We first showed in this study an increase in BRB permeability after partial lens extraction, using Evans Blue method, which lowered Dystrophin Dp71 and AQP4 expression and delocalized of Kir4.1. A single injection of DEX prevented these molecular changes to occur by canceling the inhibitory effect of BRB breakdown on Dp71 expression. To summarize, we suggest a pathway of the probable mechanisms involved in BRB breakdown in our model (Fig. 7). Despite these interesting findings a lot of knowledge are missing, and principally why these homeostatic changes are important and probably involved in loss of vision in humans, and what is the impact of these changes on retinal neurons and MGC.

REFERENCE

1. Bringmann A, Reichenbach A, Wiedemann P: **Pathomechanisms of cystoid macular edema.** *Ophthalmic research* 2004, **36**(5):241-249.
2. Reichenbach A, Wurm A, Pannicke T, Iandiev I, Wiedemann P, Bringmann A: **Muller cells as players in retinal degeneration and edema.** *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 2007, **245**(5):627-636.
3. Tretiach M, Madigan MC, Wen L, Gillies MC: **Effect of Muller cell co-culture on in vitro permeability of bovine retinal vascular endothelium in normoxic and hypoxic conditions.** *Neuroscience letters* 2005, **378**(3):160-165.
4. Tout S, Chan-Ling T, Hollander H, Stone J: **The role of Muller cells in the formation of the blood-retinal barrier.** *Neuroscience* 1993, **55**(1):291-301.
5. Nagelhus EA, Horio Y, Inanobe A, Fujita A, Haug FM, Nielsen S, Kurachi Y, Ottersen OP: **Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains.** *Glia* 1999, **26**(1):47-54.
6. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A: **Muller cells in the healthy and diseased retina.** *Progress in retinal and eye research* 2006, **25**(4):397-424.
7. Dalloz C, Sarig R, Fort P, Yaffe D, Bordais A, Pannicke T, Grosche J, Mornet D, Reichenbach A, Sahel J *et al*: **Targeted inactivation of dystrophin gene product Dp71: phenotypic impact in mouse retina.** *Human molecular genetics* 2003, **12**(13):1543-1554.
8. Rehak M, Hollborn M, Iandiev I, Pannicke T, Karl A, Wurm A, Kohen L, Reichenbach A, Wiedemann P, Bringmann A: **Retinal gene expression and Muller cell responses after branch retinal vein occlusion in the rat.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2009, **50**(5):2359-2367.
9. Pannicke T, Iandiev I, Uckermann O, Biedermann B, Kutzera F, Wiedemann P, Wolburg H, Reichenbach A, Bringmann A: **A potassium channel-linked mechanism of glial cell swelling in the postischemic retina.** *Molecular and cellular neurosciences* 2004, **26**(4):493-502.
10. Pannicke T, Iandiev I, Wurm A, Uckermann O, vom Hagen F, Reichenbach A, Wiedemann P, Hammes HP, Bringmann A: **Diabetes alters osmotic swelling characteristics and membrane conductance of glial cells in rat retina.** *Diabetes* 2006, **55**(3):633-639.
11. Sene A, Tadayoni R, Pannicke T, Wurm A, El Mathari B, Benard R, Roux MJ, Yaffe D, Mornet D, Reichenbach A *et al*: **Functional implication of Dp71 in osmoregulation and vascular permeability of the retina.** *PloS one* 2009, **4**(10):e7329.
12. Sarig R, Mezger-Lallemand V, Gitelman I, Davis C, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U: **Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: differential activity of the Dp71 promoter during development.** *Human molecular genetics* 1999, **8**(1):1-10.
13. Fort PE, Sene A, Pannicke T, Roux MJ, Forster V, Mornet D, Nudel U, Yaffe D, Reichenbach A, Sahel JA *et al*: **Kir4.1 and AQP4 associate with Dp71- and utrophin-DAPs complexes in specific and defined microdomains of Muller retinal glial cell membrane.** *Glia* 2008, **56**(6):597-610.
14. Sigesmund DA, Weleber RG, Pillers DA, Westall CA, Panton CM, Powell BR, Heon E, Murphey WH, Musarella MA, Ray PN: **Characterization of the ocular**

- phenotype of Duchenne and Becker muscular dystrophy.** *Ophthalmology* 1994, **101**(5):856-865.
15. Tadayoni R, Rendon A, Soria-Jasso LE, Cisneros B: **Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene.** *Molecular neurobiology* 2012, **45**(1):43-60.
 16. French LA, Galicich JH: **The Use of Steroids for Control of Cerebral Edema.** *Clinical neurosurgery* 1964, **10**:212-223.
 17. Ruderman NB, Hall TC: **Use of Glucocorticoids in the Palliative Treatment of Metastatic Brain Tumors.** *Cancer* 1965, **18**:298-306.
 18. Gu YT, Qin LJ, Qin X, Xu F: **The molecular mechanism of dexamethasone-mediated effect on the blood-brain tumor barrier permeability in a rat brain tumor model.** *Neuroscience letters* 2009, **452**(2):114-118.
 19. Zhao M, Bousquet E, Valamanesh F, Farman N, Jeanny JC, Jaisser F, Behar-Cohen FF: **Differential regulations of AQP4 and Kir4.1 by triamcinolone acetonide and dexamethasone in the healthy and inflamed retina.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2011, **52**(9):6340-6347.
 20. Stahl JH, Miller DB, Conway BP, Campochiaro PA: **Dexamethasone and indomethacin attenuate cryopexy. Induced breakdown of the blood-retinal barrier.** *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 1987, **225**(6):418-420.
 21. Wang K, Wang Y, Gao L, Li X, Li M, Guo J: **Dexamethasone inhibits leukocyte accumulation and vascular permeability in retina of streptozotocin-induced diabetic rats via reducing vascular endothelial growth factor and intercellular adhesion molecule-1 expression.** *Biological & pharmaceutical bulletin* 2008, **31**(8):1541-1546.
 22. Liu H, Demetriades AM, Xiao WH, Campochiaro PA, Viores SA: **Mouse model of post-surgical breakdown of the blood-retinal barrier.** *Current eye research* 2004, **28**(6):421-426.
 23. Xu Q, Qaum T, Adamis AP: **Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2001, **42**(3):789-794.
 24. Rozen S, Skaletsky H: **Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.** *Methods in molecular biology* 2000, **132**:365-386.
 25. Bordais A, Bolanos-Jimenez F, Fort P, Varela C, Sahel JA, Picaud S, Rendon A: **Molecular cloning and protein expression of Duchenne muscular dystrophy gene products in porcine retina.** *Neuromuscular disorders : NMD* 2005, **15**(7):476-487.
 26. Connors NC, Kofuji P: **Dystrophin Dp71 is critical for the clustered localization of potassium channels in retinal glial cells.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2002, **22**(11):4321-4327.
 27. Connors NC, Kofuji P: **Potassium channel Kir4.1 macromolecular complex in retinal glial cells.** *Glia* 2006, **53**(2):124-131.
 28. Motulsky E, Koch P, Janssens S, Lienart M, Vanbellinghen AM, Bolaky N, Chan CC, Caspers L, Martin-Martinez MD, Xu H *et al*: **Aquaporin expression in blood-retinal barrier cells during experimental autoimmune uveitis.** *Molecular vision* 2010, **16**:602-610.
 29. Goodyear MJ, Crewther SG, Junghans BM: **A role for aquaporin-4 in fluid regulation in the inner retina.** *Visual neuroscience* 2009, **26**(2):159-165.
 30. Verkman AS, Ruiz-Ederra J, Levin MH: **Functions of aquaporins in the eye.** *Progress in retinal and eye research* 2008, **27**(4):420-433.

31. Liu XQ, Kobayashi H, Jin ZB, Wada A, Nao IN: **Differential expression of Kir4.1 and aquaporin 4 in the retina from endotoxin-induced uveitis rat.** *Molecular vision* 2007, **13**:309-317.
32. Kofuji P, Ceelen P, Zahs KR, Surbeck LW, Lester HA, Newman EA: **Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2000, **20**(15):5733-5740.
33. Kofuji P, Biedermann B, Siddharthan V, Raap M, Iandiev I, Milenkovic I, Thomzig A, Veh RW, Bringmann A, Reichenbach A: **Kir potassium channel subunit expression in retinal glial cells: implications for spatial potassium buffering.** *Glia* 2002, **39**(3):292-303.
34. Klaassen I, Van Noorden CJ, Schlingemann RO: **Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions.** *Progress in retinal and eye research* 2013, **34**:19-48.
35. El-Harazi SM, Feldman RM: **Control of intra-ocular inflammation associated with cataract surgery.** *Current opinion in ophthalmology* 2001, **12**(1):4-8.
36. Tamura H, Miyamoto K, Kiryu J, Miyahara S, Katsuta H, Hirose F, Musashi K, Yoshimura N: **Intravitreal injection of corticosteroid attenuates leukostasis and vascular leakage in experimental diabetic retina.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2005, **46**(4):1440-1444.
37. Edelman JL, Lutz D, Castro MR: **Corticosteroids inhibit VEGF-induced vascular leakage in a rabbit model of blood-retinal and blood-aqueous barrier breakdown.** *Experimental eye research* 2005, **80**(2):249-258.

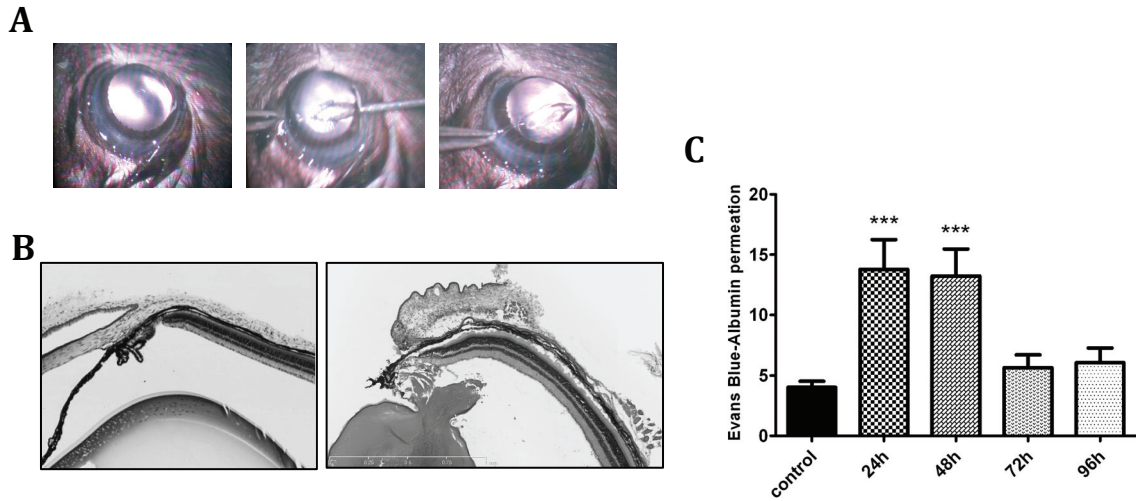


Figure 1. Partial lens extraction induces BRB breakdown during 48h. A partial lens surgery was performed on the left eye at day 0 on C57BL/6j mice and compared to control. **A:** Surgery: partial lens extraction. **B:** Hematoxylin Eosin staining of a control without surgery. **C:** Hematoxylin Eosin staining of the left eye of an animal after surgery: posterior capsular lens discontinuation (arrow). **D:** Quantification of BRB permeability at different time-points (expressed in microliter of Evans blue per gram of dry retina per hour). Vascular permeability increased significantly 24 and 48h after surgery, compared to control and came back to normal at 72 and 96h. Scale bar = 1 mm. Data are expressed as mean + SEM, n = 8. *** p<0,001 significant differences versus control.

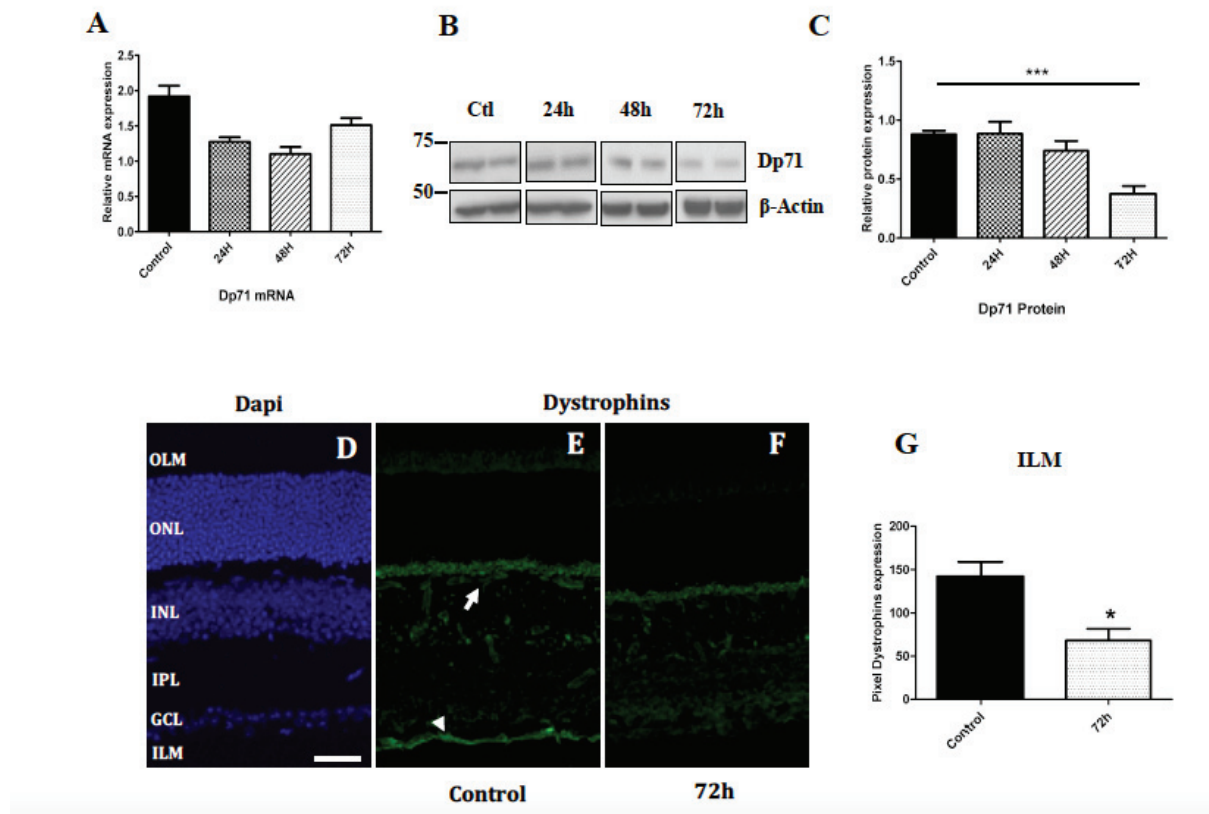


Figure 2. Reduction of Dystrophin Dp71 after lens surgery.

A: The mRNA expression of Dp71 was determined by real-time PCR in control retina (prior surgery) and in retina 24, 48, 72h after lens surgery, and was normalized to the levels of mRNA for β -actin. Dp71 mRNA decreased until 48h after surgery. **B:** Western Blot analysis of Dp71 and β -actin total protein levels in control retina (prior surgery) and in retina 24, 48, 72h after lens surgery. Approximate molecular masses (at the left side of the boxes) given in KiloDaltons **C:** Dp71 and β -actin expressions were quantified by densitometry analysis of Western Blots bands using BIO-1D software. Dp71 protein expression was strongly reduced 72h after lens surgery. **D:** Dapi (nuclei, blue) on control retina section ILM = Inner limitant membrane, GCL = Ganglion Cell Layer, INL = Inner Nuclear Layer, ONL = Outer Nuclear Layer, IPL=Inner Plexiform Layer, OLM= Outer Limitant Layer. **E, F:** Immunostaining on retinal sections for control and post surgical eyes with a pan specific antibody against all forms of dystrophins (green). Dystrophin-Dp71 staining is localized at the ILM (arrowhead) and around blood vessels (arrow), as previously reported [22]. Same sections of the retina were used for control and post surgical analysis. **G:** Semi-quantification of Dp71 (green) in the ILM of retinal sections with ImageJ Software expressed in arbitrary unit. Decrease of Dystrophins expression in the ILM, after lens surgery. Scale bars = 30 μ m. Data were expressed as mean + SEM, n = 6. * p<0,05; *** p<0,001 significant differences versus control.

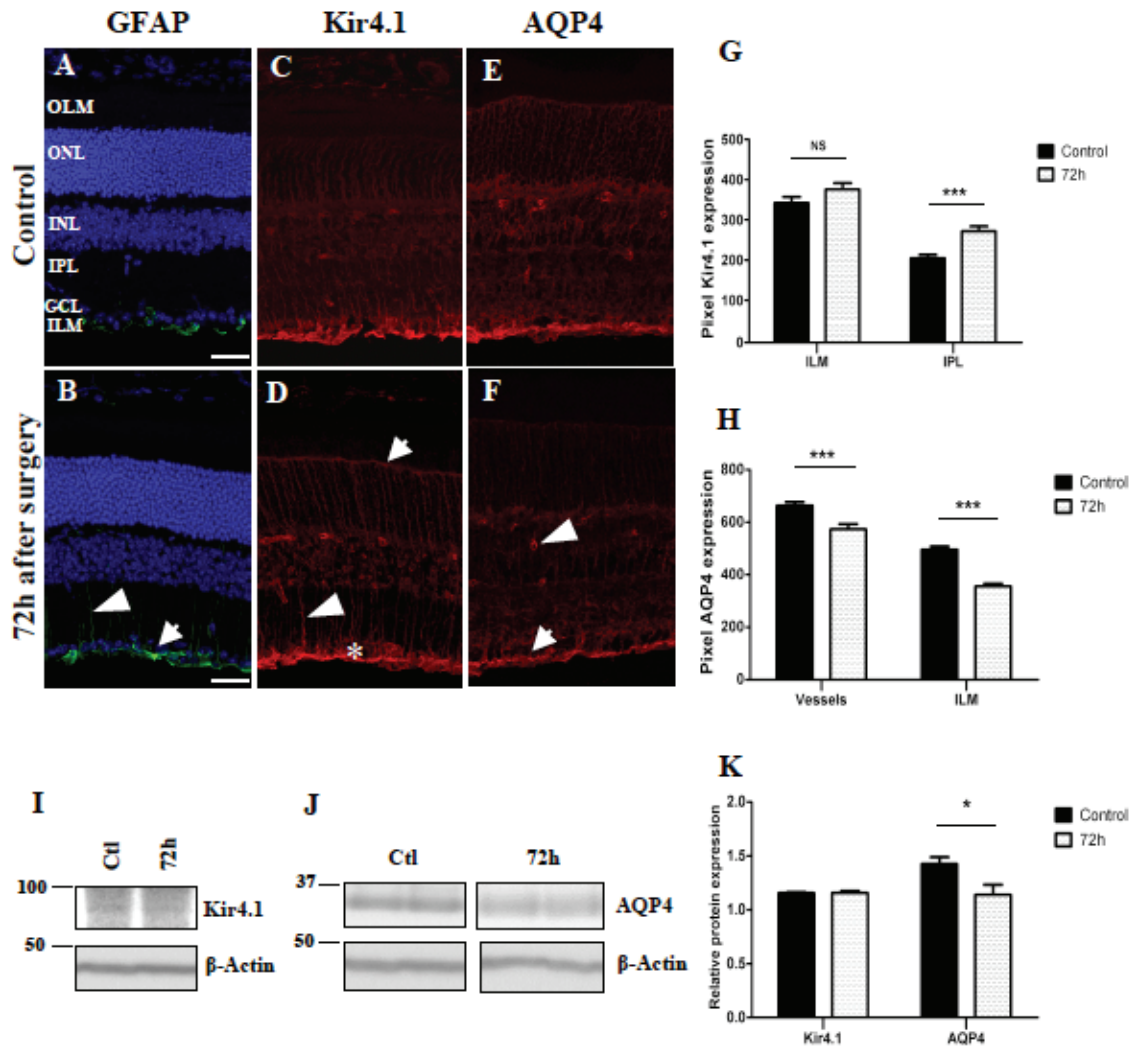


Figure 3. Delocalization of Kir4.1 and decrease of AQP4 channels expression in the retina after lens surgery. **A, D:** Immunostaining of GFAP (green), Dapi (blue) on retinal sections in control and after surgery. Lens surgery induced an up-regulation of GFAP in the ILM (arrow) and along Müller cells (arrowhead). **C, D.** Immunostaining of Kir4.1 (red). BRB breakdown induced a mislocation of Kir4.1 along Müller cells (arrowhead) and at ONL (arrow) while the staining in the ILM (star) remained unchanged. **E, F.** AQP4 staining in the ILM (arrow) and around blood vessels (arrowhead) decreased after surgery. **B.** Pixel quantification of Kir4.1 (red) in the ILM and IPL of retinal sections with ImageJ software. Kir4.1 expression remained the same in the ILM but increased along Müller cells (IPL region). **C.** Pixel quantification of AQP4 (red) in the ILM and around blood vessels. AQP4 decreased in these localizations. **D, G, H.** Western blot of Kir4.1 and AQP4 versus β -actin in control and 72h after partial lens extraction. Molecular masses given in KiloDaltons. **E.** Kir4.1 and AQP4 protein quantification by densitometry analysis of Western Blot bands using Bio1-D software: no change in Kir4.1 expression, while AQP4 decreased 72h after lens surgery. Scale bars = 30 μ m. Data expressed as mean + SEM, n = 4. * p<0,05; *** p<0,001 significant differences versus control.

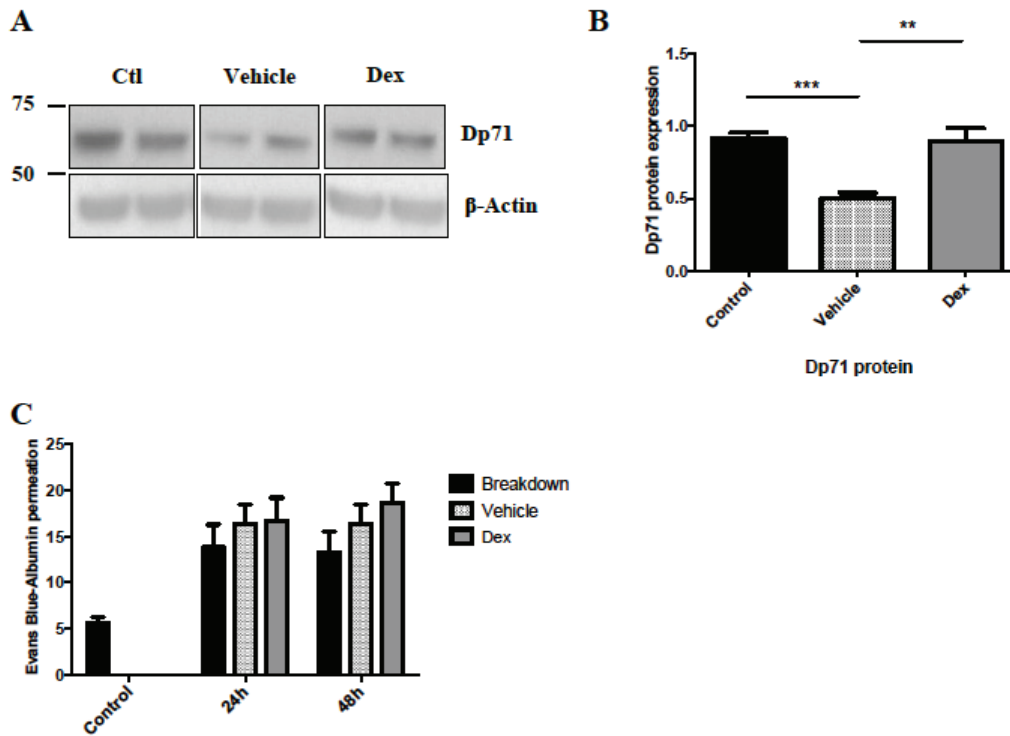


Figure 4. DEX prevented Dp71 downregulation, but did not restore permeability after partial lens surgery. **A.** Western Blot of Dp71 and β -actin total protein levels in control, vehicle and dex, 48h after intravitreal injection. Molecular masses are given in KiloDaltons. **B.** Dp71 and β -actin quantification by densitometry analysis of Western Blot bands using BIO-1D software. 48h after dex injection, Dp71 had the same rate than control, while after vehicle injection, Dp71 decreased by 50%. **C.** After 24h and 48h, dex injections did not restore a healthy BRB compared to control. Data are expressed as mean + SEM, n = 10. ** p<0,01; *** p<0,001 significant differences versus control.

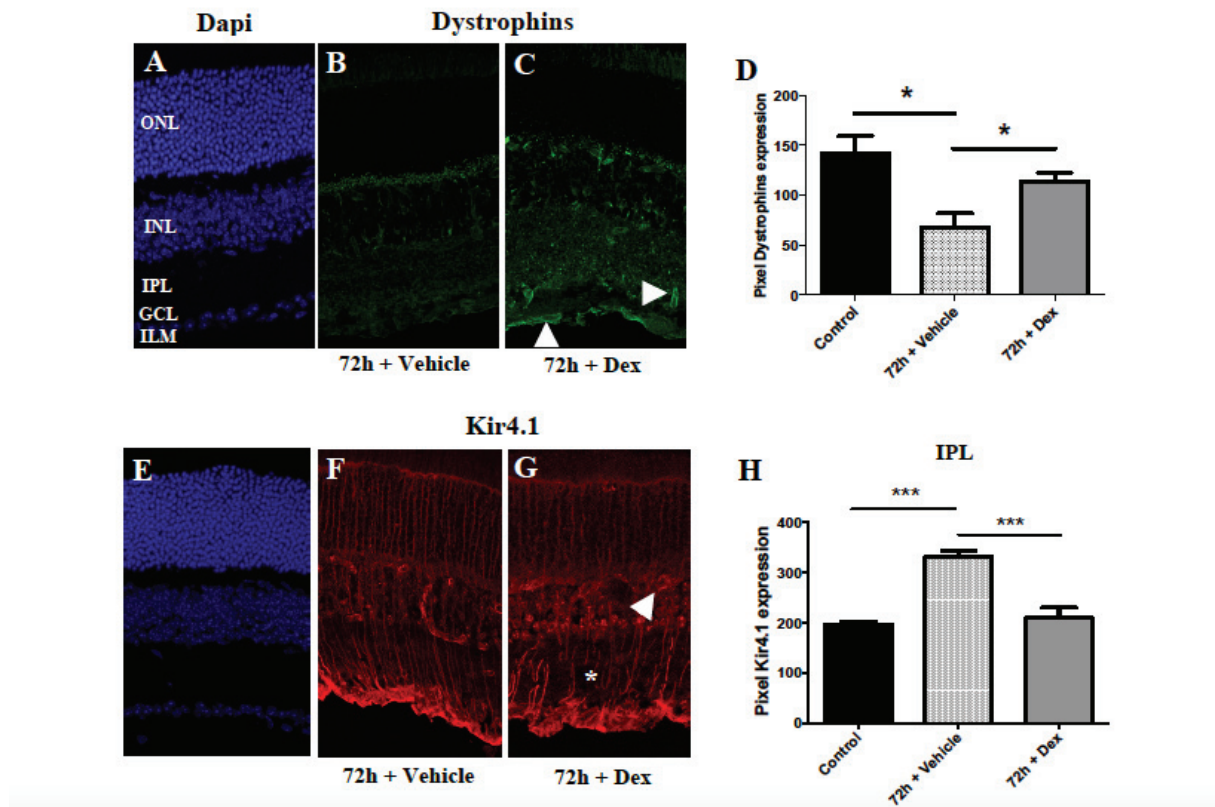


Figure 5. Dp71 protection by DEX prevented alterations of Kir4.1 and AQP4 channel. Immunolocalization of Dystrophins, Kir4.1 and AQP4 channels on retinal sections. **A, B, C.** After DEX injection, there was no downregulation of Dystrophin Dp71 compared to eyes injected with vehicle, in ILM and around vessels (arrow and arrowhead). **D.** Pixels quantification of Dp71 (green) in the ILM of retinal sections with ImageJ Software. **E, F, G.** DEX prevented Kir4.1 from delocalization. 72h after lens surgery in vehicle treated eyes, Kir4.1 was along MGC fibers, while it was in IPL (Star) and decreased around vessels (arrow) after dex injection. **H.** Pixels quantification of Kir4.1 (red) in the ILM of retinal sections with ImageJ Software. **I, J, K.** AQP4 staining remained the same after DEX injection in the ILM (arrowhead) and around blood vessels (arrow) compared to vehicle injection. **L.** Pixels quantification of AQP4 (red) in ILM of retinal sections with ImageJ Software. Dex prevented AQP4 from downregulation in the ILM. Data are expressed as mean + SEM, n = 3. * p<0,05; *** p<0,001 significant differences versus control.

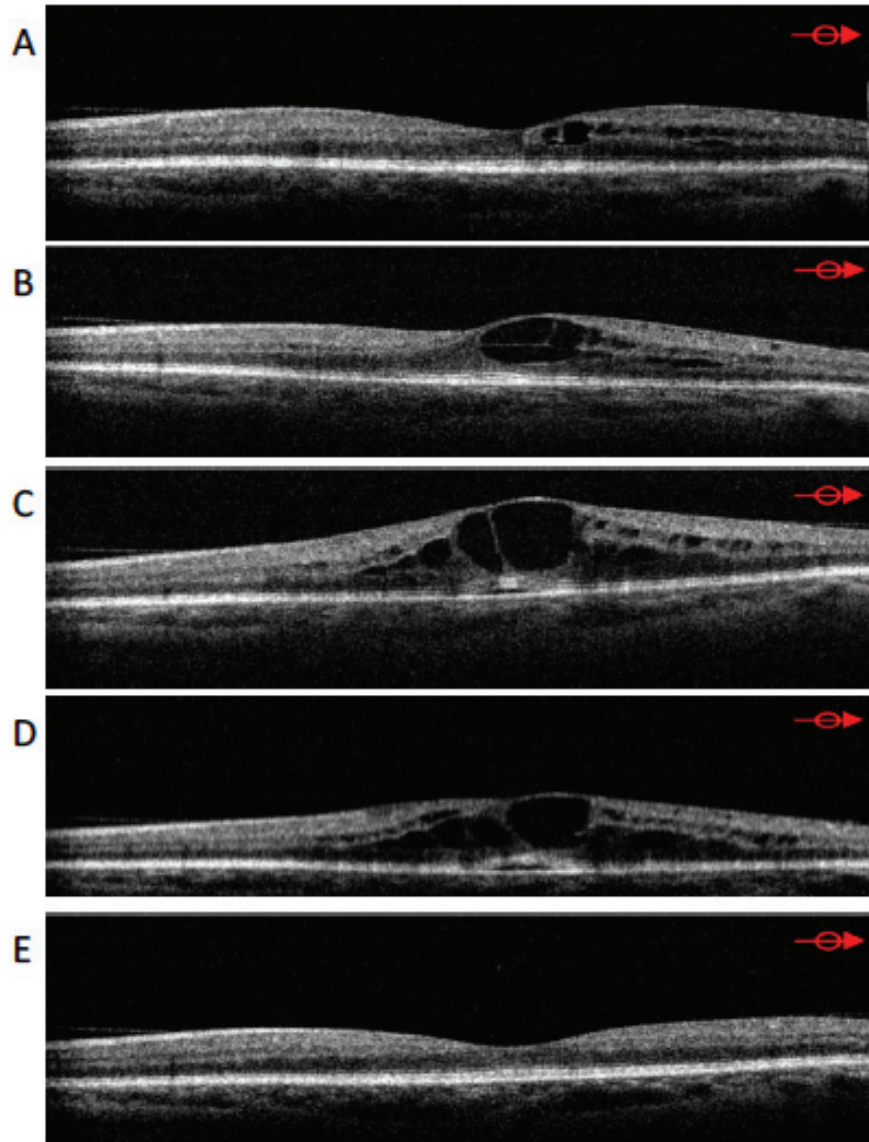


Figure S1. Optical coherence tomography of a patient suffering from a post-surgical BRB breakdown (left eye, OS) which illustrates the lack of direct correlation between visual acuity, BRB breakdown and macular edema and more precisely central foveal thickness (CFT). OCT is an optical signal acquisition and processing method. It captures micrometer resolution, three-dimensional images from the retina and facilitates the diagnosis of retinal edema showing an increase in central foveal thickness and an inner retinal hyporeflectivity matching with the edema.

A. December 2012, visual acuity: 20/32. CFT was 237 μ m.

B. January 2013, visual acuity: 20/32. CFT was 349 μ m.

C. April 2013, visual acuity: 20/32. CFT was 626 μ m.

D. May 2013, visual acuity decreased at 20/63. CFT was 610 μ m.

E. The patient was treated by intravitreal implant injection of dex (Ozurdex) OS in May 2013. OCT performed in June 2013, one month later. Visual acuity: 20/40. CFT was 204 μ m.

3. PARTIE 3

Résultats complémentaires

3-1 Situation du projet

Les travaux sur les astrocytes (1^e article) et sur la BHR (2^e article) ont été mené en parallèle et ont généré un certain nombre de questions auxquelles nous tentons d'apporter des éléments de réponse dans cette 3^e partie. Les questions qui nous interpellent particulièrement sont: quel mécanisme pourrait être à l'origine dans ce modèle de rupture de la BHR après chirurgie partielle du cristallin, d'une diminution de l'expression de la dystrophine Dp71 ? La rupture de BHR est-elle à l'origine du changement d'expression de Dp71 ou en est-elle la conséquence ?

Plusieurs hypothèses ont alors émergé :

1- **Rôle de l'inflammation rétinienne** : la rupture de BHR est-elle liée à une production anormalement élevée de protéines inflammatoires rétiniennes ?

2- **Rôle des astrocytes** : la Dp71 étant également exprimée dans les astrocytes rétiniens, existe-t il également une modification de morphologie ou de densité astrocytaire dans ce modèle ?

3- **Rôle de l'homéostasie rétinienne** : les modifications de l'homéostasie rétinienne peuvent-elles être à l'origine de la diminution d'expression de Dp71?

Ci-dessous sont présentés les méthodes mises au point ainsi que les résultats obtenus en essayant de répondre à ces 3 hypothèses

3.2 Méthodes et résultats complémentaires

3-2.1 Rôle de l'inflammation rétinienne

Méthodes : Afin de répondre à la question de l'implication des facteurs inflammatoires rétiniens dans ce modèle, nous avons quantifié l'expression (ARNm) de facteurs inflammatoires multiples par PCR quantitative dans le tissu rétinien.

L'ARN total était extrait des rétines de souris C57BL6/J (groupe contrôle) et de souris de même espèce après chirurgie partielle du cristallin (décrite dans l'article 2) en utilisant le kit d'extraction RNeasy Mini Kits (Qiagen). Une purification automatisée utilisant le système QIAcube (Qiagen) était utilisée pour compléter l'isolation de l'ARN. Après isolation, la concentration et l'intégrité de l'ARN total étaient analysées en utilisant l'Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). L'ADNc était synthétisé à partir de 5 µg d'ARN total avec des primers oligo-dT en utilisant la reverse transcriptase (Super Script III) à 42°C pendant 1 heure. La PCR quantitative était réalisée par utilisation d'une sonde TaqMan (Applied Biosystems). Les sondes sont résumées dans le tableau 2. Pour les comparaisons relatives, les valeurs Ct des résultats de PCR ont été analysées par la méthode des Δ Ct selon les instructions du vendeur. Chaque valeur a été normalisée à celle de la β -actine.

Tableau 2 : Noms, séquences et longueurs des sondes utilisées en QPCR

Nom de la sonde	Séquence (5'-3')	Longueur
IL1B_F	CATGGAATCCGTGTCTTCCT	20
IL1B_R	GAGCTGTCTGCTCATTACAG	20
VEGF_F	GTGAGCCAGGCTGCAGGAAG	20
VEGF_R	GAATGCGTCTGCCGGAGTCT	20
VEGF_A_F	CAAACCTCACCAAAGCCAGC	20
VEGF_A_R	GCGCTTTCGTTTTTGACCCT	20
VEGF_B_F	GCCAGACAGGGTTGCCATAC	20
VEGF_B_R	GGAGTGGGATGGATGATGTCAG	22
COX2_F	TGCTACCATCTGGCTTCGGGAG	22
COX2_R	ACCCCTCAGGTGTTGCACGT	20
ICAM1_F	GTGATGCTCAGGTATCCATCCA	22
ICAM1_R	CACAGTTCTCAAAGCACAGCG	21
PGF_F	TCTGCTGGGAACAACACTCAACA	21
PGF_R	GTGAGACACCTCATCAGGGTAT	22
nNOS_F	CTGGTGAAGGAACGGGTCAG	20
nNOS_R	CCGATCATTGACGGCGAGAAT	21
iNOS_F	GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA	23
iNOS_R	GTGGACGGGTCGATGTCAC	19

Résultats : Les différentes protéines inflammatoires suivantes n'étaient pas surexprimées dans le tissu rétinien après chirurgie partielle du cristallin comparativement aux souris non opérées : VEGF-A (Figure 1), ICAM1 (Figure 2), VEGF-B, PGF, COX2, iNOS, nNOS (résultats non montrés). Nous n'avons mis en évidence aucune élévation de marqueur

inflammatoire dans la rétine des souris ayant eu une chirurgie cristallinienne versus les souris non opérées.

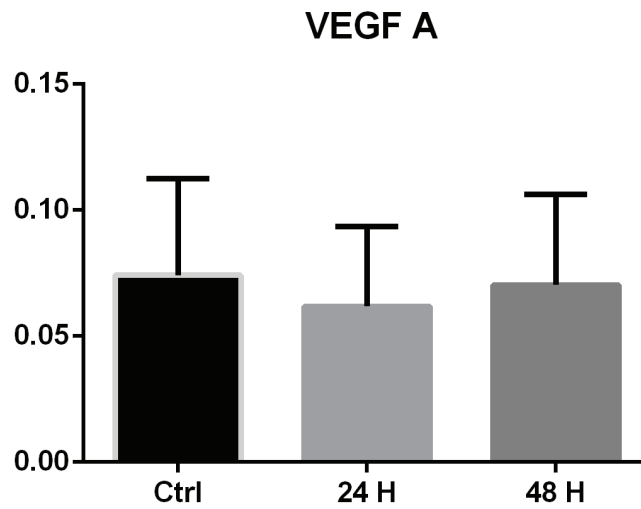


Figure 1: Expression du VEGF-A chez la souris contrôle non opérée (ctrl), 24 et 48 heures après chirurgie du cristallin, ne montrant pas de variation de cette protéine après chirurgie.

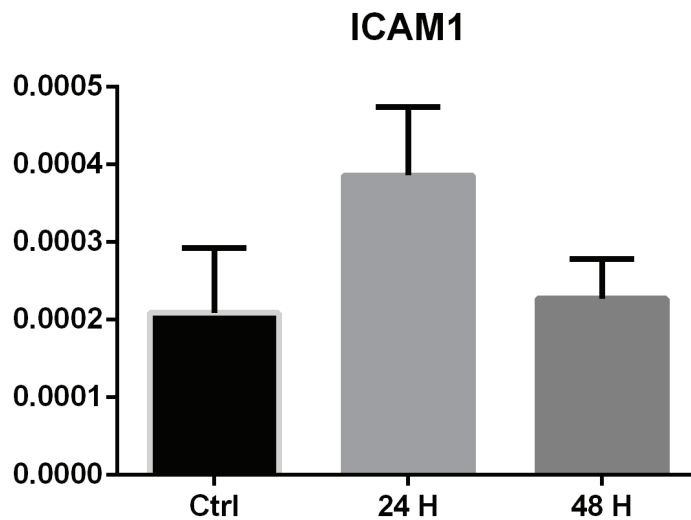


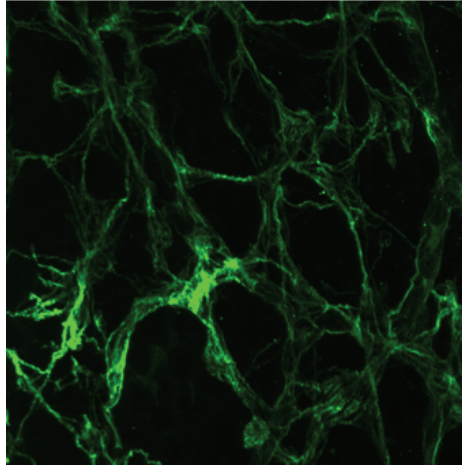
Figure 2 : Expression du ICAM1 dans le rétine de souris contrôle non opérée (ctrl), 24 et 48 heures après chirurgie du cristallin, ne montrant pas de variation de cette protéine après chirurgie.

3-2.2 Rôle des astrocytes

Méthodes : Afin de répondre à l'implication des astrocytes dans ce modèle nous avons réalisé des rétines à plat marquée par GFAP, afin d'observer la morphologie astrocytaire en microscopie confocale (TCS SP2, Leica) chez les souris contrôles et après chirurgie du cristallin. Afin de quantifier la morphologie astrocytaire le logiciel Fiji a été utilisé. Une représentation squelettisée des astrocytes (Arganda-Carreras et al. 2010), a été obtenue permettant ainsi le comptage des jonctions, des branches, ainsi que la mesure de la longueur moyenne de ces cellules. Nous avons utilisé le même procédé que dans l'article 1.

Résultats : Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative de morphologie (Figure 3) des astrocytes après chirurgie du cristallin partielle à 24 et 48 heures après chirurgie par rapport au contrôle. Notamment pas de différences quantitatives du nombre de procès (Figure 4), d'intersections ni de longueur totale des procès (Figures non montrées).

Astrocytes (GFAP), rétine contrôle



Astrocytes (GFAP) 24 heures après chirurgie

Astrocytes (GFAP) 48 heures après chirurgie

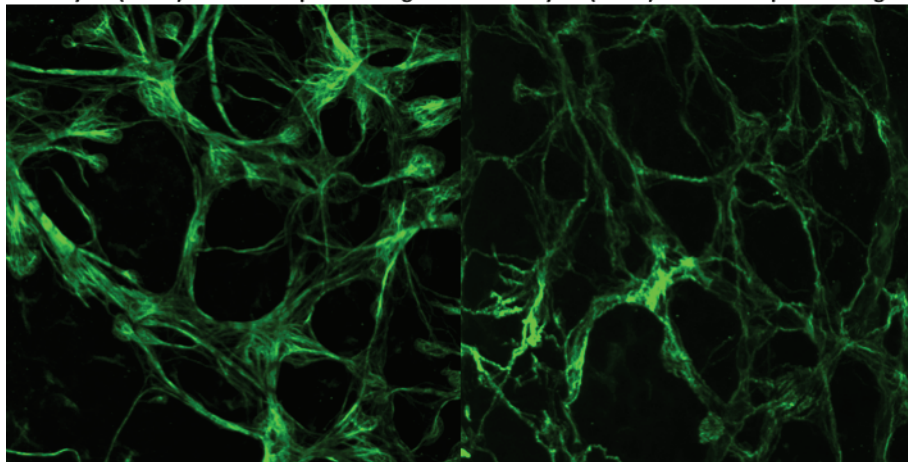


Figure 3: aspect des astrocytes marqués par GFAP sur des rétines à plat 24 et 48 heures après chirurgie partielle du cristallin

Astrocytes Processes

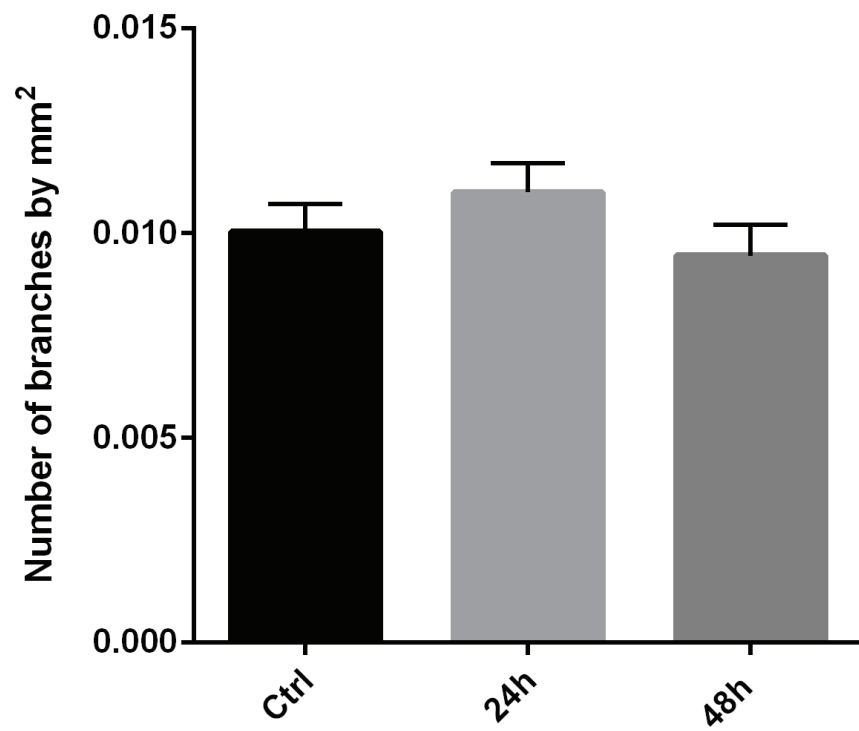


Figure 4: Quantification du nombre de procès astrocytaires chez la souris non opérée (Ctrl), ainsi que 24 et 48 heures après chirurgie partielle du cristallin

3-2.3 Rôle de l'homéostasie rétinienne

Méthodes : Afin de répondre à l'hypothèse 3, sur le rôle des perturbations de l'environnement extracellulaire dans la diminution d'expression de la Dp71, nous avons réalisé des explants rétiniens auxquels nous avons appliqué différentes solutions et/ou des ions Barium, bloqueurs des canaux Kir4.1. Le modèle des explants rétiniens permet de modifier in vitro les conditions environnementales autour des cellules de la rétine. Les rétines de souris sauvages C57BL6/J ont été prélevées. Les puits sont tout d'abord remplis de la solution à tester, puis une membrane de polycarbonate est disposée dans le fond du puits. Le niveau de solution est alors complété afin que la membrane soit en immersion, puis les rétines sont disposées, photorécepteurs vers la membrane. Après 8 heures, les explants sont sortis délicatement et des PCR quantitatives sont réalisées (ARNm de Dp71, de Kir4.1 et HSF1).

Résultats : Il existe une diminution de l'expression de la Dp71 en présence d'ions Barium quelque soit la solution utilisée comparativement au contrôle. Cette diminution d'expression est prévenue par l'addition de Dexaméthasone (Figure 5). Par ailleurs, il existe également une diminution de l'expression de Kir4.1 en présence d'ions Barium quelque soit la solution utilisée comparativement au contrôle. Cette diminution d'expression est prévenue par l'addition de Dexaméthasone (Figure 6). L'expression d'ARNm de HSF1 dans différentes conditions environnementales extracellulaires n'est pas modifiée par la présence d'ions Barium. L'ajout de Dexaméthasone augmente l'expression de HSF1 (Figure 7).

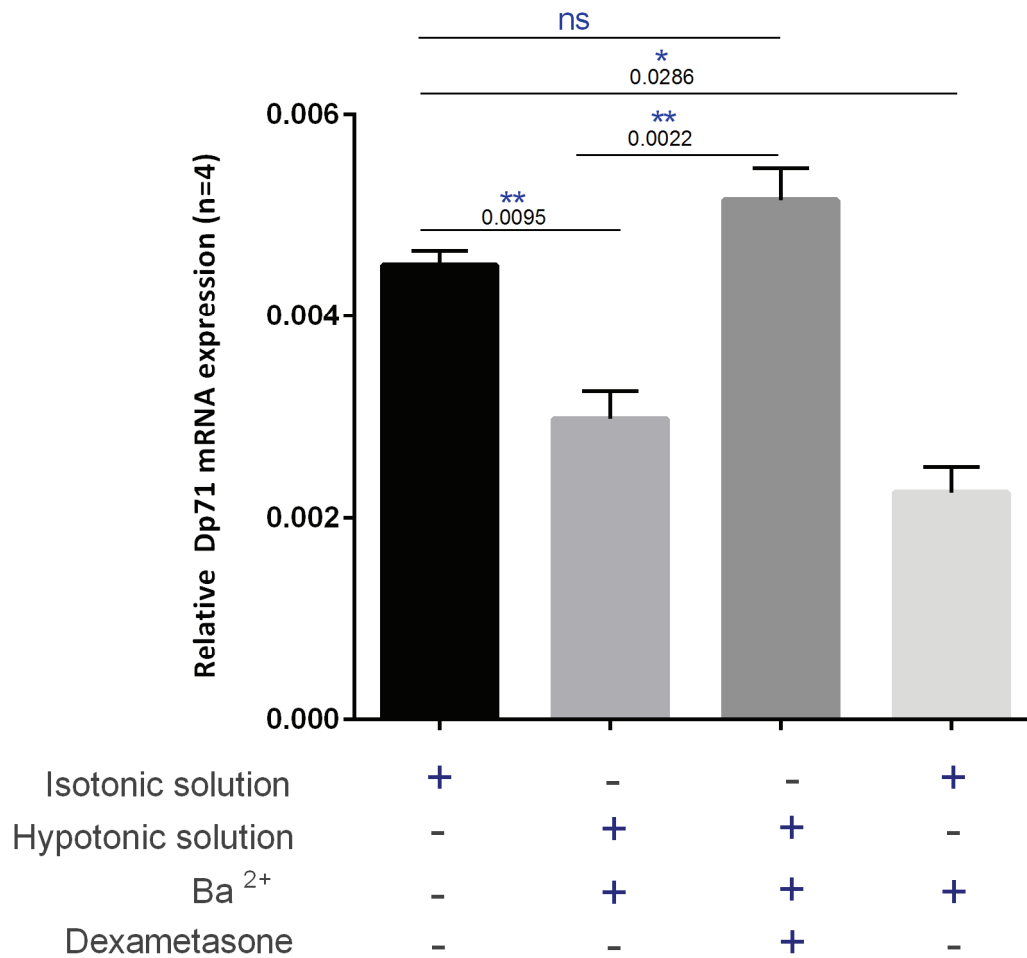


Figure 5 : Expression d'ARNm de Dp71 dans différentes conditions environnementales extracellulaires. Modification d'expression de la Dp71 en présence d'ions Barium quel que soit la solution utilisée. Cette diminution d'expression est prévenue par l'addition de Dexaméthasone

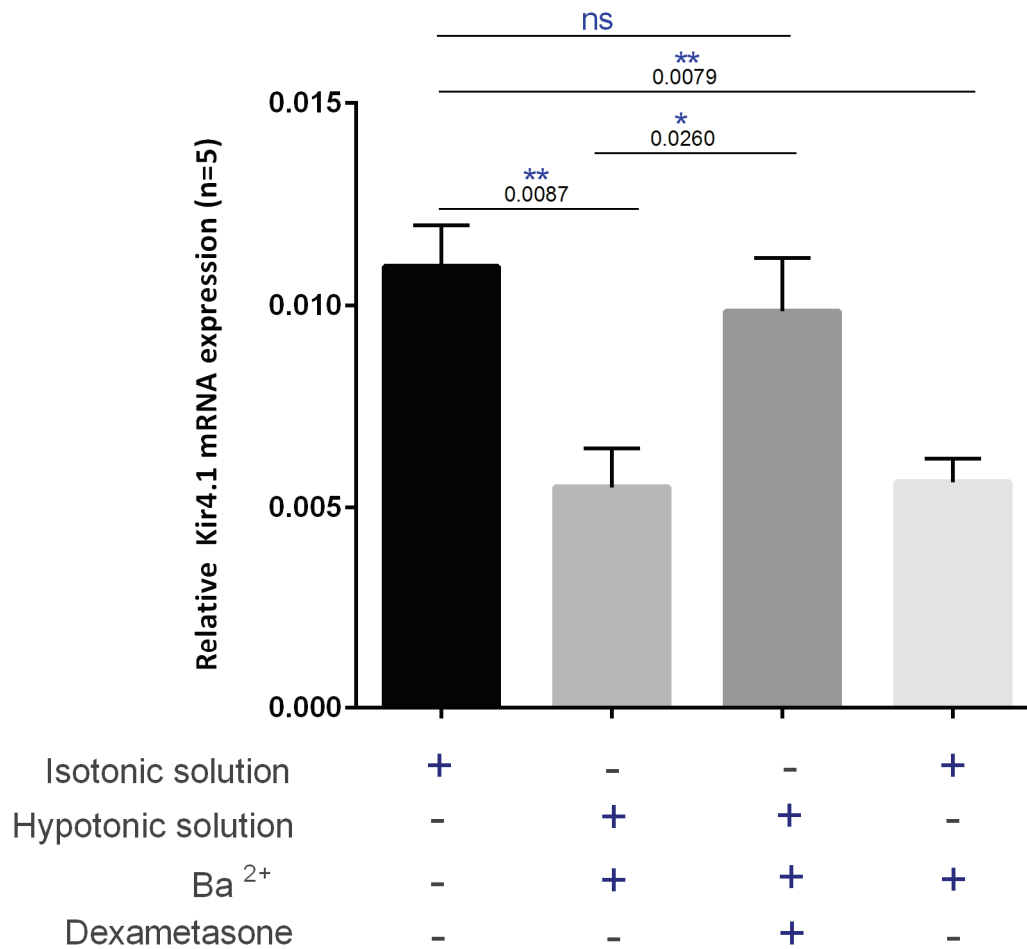


Figure 6 : Expression d'ARNm des canaux Kir4.1 dans différentes conditions environnementales extracellulaires. Modification d'expression de Kir4.1 en présence d'ions Barium quelquesoit la solution utilisée. Cette diminution d'expression est prévenue par l'addition de Dexaméthasone

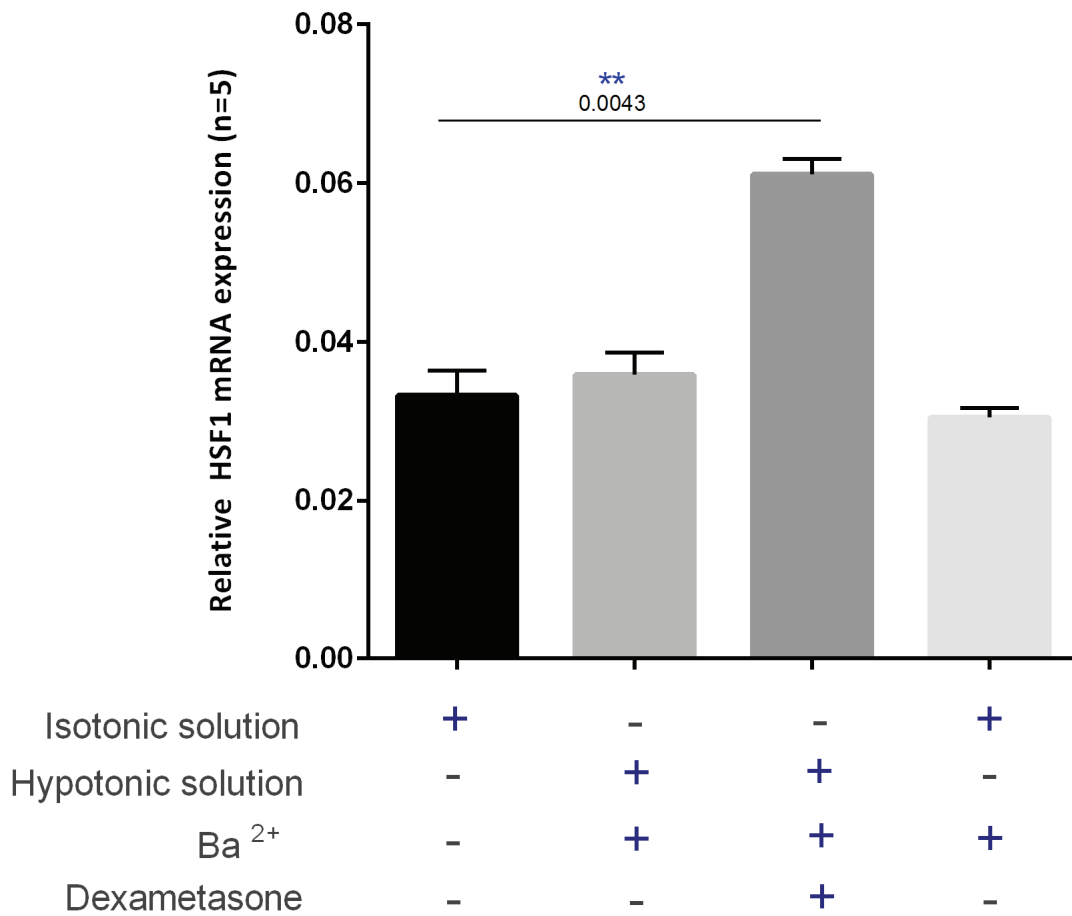


Figure 7: Expression d'ARNm de HSF1 dans différentes conditions environnementales extracellulaires. L'expression de HSF1 n'est pas modifiée par la présence d'ions Barium ou quelque soit la solution utilisée. L'ajout de Dexaméthasone augmente l'expression de HSF1

*IV/ Discussion
générale &
perspectives*

1- Discussion générale

Comprendre le développement vasculaire, le maintien de la BHR ainsi que les phénomènes homéostatiques de la rétine est indispensable afin de mieux comprendre et traiter la plupart des pathologies rétiniennes qui constituent les principales causes de cécité dans le monde.

Dans cet objectif, la mise en commun des connaissances cliniques ophtalmologiques et scientifiques apporte probablement une vision originale des différents mécanismes physiopathologiques. En tant que spécialiste de la rétine, particulièrement impliquée dans les pathologies vasculaires et oedémateuses de la rétine, ce travail complète mes connaissances théoriques et comble certains espaces encore obscurs de nos connaissances des mécanismes en cause dans le développement vasculaire de la rétine et dans les phénomènes de maintien de l'homéostasie rétinienne et de la BHR interne, qui permettent d'assurer une bonne fonction visuelle. Même si au cours de ces dernières années de larges progrès ont été accomplis en matière de thérapie dans le domaine des pathologies rétiniennes (nous savons dans la plupart des cas assécher un œdème maculaire, nous savons stopper l'exsudation d'un néovaisseau choroïdien, nous savons également faire régresser les néovaisseaux pré-rétiniens), grâce notamment à l'avènement des traitements antiVEGF, et corticoïdes administrés par voie intravitréenne, nous ne savons toujours pas protéger les cellules neuronales en période de stress rétinien (œdème maculaire, néovascularisation, décollement de rétine). Tout l'enjeu d'une meilleure compréhension de ces mécanismes est de trouver des cibles thérapeutiques qui nous permettrons demain de réduire encore l'évolution vers la malvoyance et la cécité dans le monde, tout comme l'a permis l'utilisation des antiVEGF (Varma et al. 2015).

Le groupe de recherche que j'ai intégré depuis 3 ans au sein de l'institut de la vision s'intéresse particulièrement à l'un des produits du gène DMD (Dystrophie Musculaire de Duchenne), qui est l'un des plus petits produits du gène et est appelé dystrophine Dp71 en raison de son poids moléculaire. Cette protéine est largement exprimée au niveau du système

nerveux central dans lequel régulièrement de nouvelles fonctions lui sont attribuées. Au sein de la rétine, cette dystrophine est connue pour jouer un rôle central dans les propriétés d'homéostasie rétinienne de la cellule gliale de Müller. En son absence, les canaux aqueux et potassiques des CGM sont modifiés (Fort et al. 2008). Par ailleurs, en son absence également la BHR interne est rompue et devient donc beaucoup plus perméable (Sene et al. 2009), il existe de plus chez les souris mutées pour la Dp71, une membrane limitante interne (couche la plus interne de la rétine) beaucoup plus perméable et qui a notamment la propriété de laisser diffuser les AAV vers la rétine, ce qui n'est pas vrai chez la souris sauvage, conférant à la souche de souris mutée pour la Dp71 un avantage en matière de thérapie génique (Vacca et al. 2014). Enfin les rétines de ces souris présentent un état pro-inflammatoire, qui en font un modèle de choix pour l'étude de nombreuses pathologies rétinienne telles que la rétinopathie diabétique (Mathari et al. 2015).

Nous avons, au cours de ce travail, montré pour la première fois qu'au sein de la rétine, la Dystrophine Dp71, est localisée, non seulement dans les CGM mais également au sein des astrocytes rétiniens. Nous avons également montré pour la première fois que la souris KoDp71 constituait un modèle d'altération astrocytaire, permettant toutefois un développement vasculaire. En effet, la densité des astrocytes rétiniens en l'absence de dystrophine Dp71 est moindre par rapport à celle observée chez la souris sauvage, et leur morphologie est également différente, avec un nombre de procès limité en l'absence de Dp71. Toutefois, partant des résultats précédemment obtenus par notre équipe, montrant l'existence d'une implication de la dystrophine Dp71 dans le maintien de l'homéostasie rétinienne (Sene et al. 2009), et compte-tenu de la localisation préférentielle du complexe des protéines associées aux dystrophine, DAPs, autour des vaisseaux rétiniens, et étant donné le rôle crucial des astrocytes dans le guidage et le développement vasculaire rétinien (Dorrell, Aguilar, et Friedlander 2002; Marcus Fruttiger 2002), nous avons émis l'hypothèse, d'un

développement vasculaire défectueux chez ces souris. Afin d'explorer le développement vasculaire rétinien nous avons étudié la vascularisation rétinienne sur des rétines à plat dont les vaisseaux étaient marqués par de l'Isolectine, à différents stades de développement. Nous avons mis en évidence l'existence d'un retard de développement du réseau vasculaire rétinien, dont l'architecture également était modifiée, avec une densité et une morphologie modifiée également par rapport aux souris sauvages. Nos résultats sont parfaitement en accord avec la littérature (Dorrell, Aguilar, et Friedlander 2002) et retrouvent une colonisation de la rétine jusqu'à la périphérie rétinienne dès la naissance, par le réseau astrocytaire constituant un patron sur lequel les vaisseaux rétiniens en développement vont migrer, et atteindre progressivement la périphérie rétinienne également.

Dans le cerveau également, l'inhibition de l'astroglionèse résulte en une diminution de la couverture astrocytaire et en conséquence à une diminution du développement des vaisseaux et de leurs ramifications pendant la période post-natale. Les auteurs suggéraient un rôle potentiellement direct des astrocytes dans la promotion de l'angiogénèse, en raison de leur proche interaction avec les cellules endothéliales (Ma et al. 2012).

De la même façon, dans la rétine, plusieurs études ont montré que la formation du plexus vasculaire superficiel était dépendante du réseau astrocytaire sous-jacent qui émerge de la tête du nerf optique (Huxlin et al. 1992; Watanabe and Raff, 1988). En concordance avec cette hypothèse, une étude conduite par Fruttiger et al. (Fruttiger et al. 1996) a montré que l'extension du réseau astrocytaire obtenu par hyper expression du PDGF, un agent mitogène pour les astrocytes rétiniens (Fruttiger et al. 2000) a conduit à l'augmentation de la vasculogénèse. A l'inverse la perte de la migration astrocytaire chez des souris Ko pour le gène *Tlx* était accompagné d'une perte de la vascularisation rétinienne (Miyawaki et al. 2004).

Dans ce travail, nous avons analysé la densité astrocytaire chez des souris Ko pour le gène de

la Dp71 juste après la naissance et jusqu'à l'âge adulte et nous avons noté une densité astrocytaire plus faible en absence de Dp71 comparativement à la souris sauvage, après la naissance. De plus la densité astrocytaire des souris KoDp71 reste stable jusqu'à l'âge adulte alors qu'elle augmente à l'âge adulte chez la souris normale.

Chez les souris KoDp71, la faible densité d'astrocytes comparativement aux souris sauvages pourrait être liée à un taux élevé d'apoptose (Chan-Ling et al. 2009). A ce jour, des preuves suggèrent le rôle des membres de la superfamille des Bcl-2 et la classique voie mitochondriale caspase dépendante dans l'apoptose rétinienne durant le développement (Donovan, Doonan, et Cotter 2006). Nous avons récemment montré que l'expression de Bcl-2 était augmentée chez la souris KoDp71 versus souris sauvage. A l'opposé, l'expression de la caspase-3 ne diffère pas entre les 2 espèces de souris (El Mathari et al. 2015). D'après ces résultats, nous pouvons supposer, que la délétion du gène codant pour la Dp71 pourrait conduire à des phénomènes compensatoires permettant d'éviter une perte totale astrocytaire. A notre connaissance, il s'agit de la première démonstration de l'impact sur la densité et la morphologie des astrocytes rétiniens de l'absence de la dystrophine Dp71. Dans le cerveau de souris *mdx*, dans lequel l'expression de l'ensemble des dystrophines est diminuée y compris la Dp71, Nico et al. (B. Nico et al. 2004) ont rapporté un déficit de la biogénèse des jonctions serrées en rapport avec le gonflement et/ou la dégénérescence des pieds péri-vasculaires des astrocytes durant la vie périnatale. Ces anomalies astrocytaires cérébrales sont concordantes avec les résultats de notre étude.

Dans la rétine, alors que la migration du plexus vasculaire superficiel semble sous la dépendance d'un réseau architectural astrocytaire, le plexus profond semble davantage associé aux CGM du fait de leur disposition, et les changements morphologiques des CGM observés chez la KoDp71 expliquent probablement le retard de développement du plexus vasculaire profond chez les souris KoDp71.

La laminine est également un composant clé de la membrane limitante interne tout au long du développement et suspect de jouer un rôle durant cette phase. Les souris qui présentent une délétion à la fois des gènes codant pour les laminines $\beta 2$ et de $\gamma 3$ montrent une rupture de la membrane limitante interne (Pinzón-Duarte et al. 2010). En accord avec ces découvertes, nous avons montré précédemment que l'absence de Dp71 affecte l'expression des laminines et altère significativement l'organisation de la MLI (Vacca et al. 2014). Les Laminines s'associent à de nombreux récepteurs à la surface des cellules tels que les intégrines, les dystroglycanes, les syndecanes et certaines glycoprotéines (Durbeej 2010). Etant donné la diminution d'expression des dystroglycanes dans les CGM des souris Ko Dp71 (Daloz et al., 2003), il n'est pas surprenant qu'en l'absence de Dp71 les laminines soient désorganisées à la fois au niveau de la MLI et au sein de la MEC (Vacca et al., 2014). L'ancrage des Laminines est également essentiel pour le développement normal du réseau vasculaire rétinien. En effet dans des modèles mutés pour la laminine (Edwards et Lefebvre 2013), il a été constaté un nombre très réduit d'astrocytes, avec des vaisseaux rétiniens uniquement présent dans la région péri-papillaire (Gnanaguru et al. 2013). En se basant sur ces observations, nous pouvons présumer que la désorganisation de la MLI liée à la laminine pourrait contribuer aux mécanismes conduisant à l'existence d'un réseau astrocytaire déficient et morphologiquement anormal et induire un retard de développement vasculaire rétinien des réseaux superficiels et profonds chez la souris KoDp71.

Le VEGF est impliqué dans l'angiogénèse pour la promotion de la migration, de la prolifération et de la survie des cellules endothéliales. Il est cependant également connu comme facteur favorisant la perméabilité vasculaire (Feng et al. 1999). Ici, nous montrons que la délétion du gène de la Dp71 était associé à une augmentation de l'expression rétinienne de VEGF-A au 3^e jour post natal chez la souris KoDp71 comparativement à la souris sauvage, ce qui suggère que le VEGF n'est pas directement impliqué dans le retard de développement

vasculaire rétinien observé chez la KoDp71. De plus, l'étude d'une molécule d'adhésion connue pour être impliquée dans le guidage neuronal, la R-cadhérine, durant les phases précoces de développement vasculaire rétinien, montre que quand cette molécule est bloquée par un anticorps monoclonal anti R-Cadhérine, le patron astrocytaire n'est pas affecté, contrairement à la vascularisation rétinienne. Ceci suggère que l'anticorps anti-R-cadhérine prévient le signal de guidage requis par les cellules endothéliales pour suivre l'échafaudage pré-établi formé par les astrocytes rétiniens (Dorrell et al. 2002).

En accord avec cette observation, nous avons montré que l'expression de la R-Cadhérine était diminuée en l'absence de Dp71. Ceci pourrait être lié à la densité astrocytaire et vasculaire plus faible étant donné le rôle de la R-cadhérine dans la connexion des expansions vasculaires avec les astrocytes.

Après avoir mis en évidence le rôle majeur de la dystrophine Dp71 dans le maintien d'une densité et morphologie astrocytaire normale indispensable au développement vasculaire rétinien normal, nous nous sommes attachés à caractériser le rôle de cette protéine dans le maintien de l'homéostasie rétinienne et au sein de la BHR interne.

Nous avons précédemment montré en l'absence de Dp71, une diminution de l'expression d'AQP4, principal canal aqueux et une redistribution de Kir4.1 tout au long des CGM, alors qu'initialement limité aux pieds des CGM et autour des vaisseaux rétiniens (Daloz et al., 2003; Fort et al., 2008). De plus, en absence de Dp71, une baisse de l'expression de β -dystroglycane autour des vaisseaux rétiniens a également été mise en évidence (Daloz et al., 2003). Il a été également démontré que l'absence de Dp71 résulte en une augmentation de la perméabilité vasculaire rétinienne, correspondant à une BHR interne rompue (Sene et al. 2009). La BHR interne est formée par les cellules endothéliales unies entre elles par des

jonctions serrées, entourées par des péricytes ainsi que les pieds des astrocytes et des CGM. Nos observations suggèrent ici que la dystrophine Dp71, pourrait être le point central des interactions entre CGM, astrocytes et cellules endothéliales, et préserver l'intégrité de la BHR interne (Shen et al. 2010). Il a été démontré que les astrocytes sont directement responsable de la régulation des jonctions serrées entre les cellules endothéliales permettant ainsi de réguler la perméabilité de la BHR interne (Gardner et al. 1997)

Les anomalies des CGM précédemment observées ainsi que les altérations morphologiques astrocytaires en absence de Dp71 fragilisant au moins 2 composants de la BHR interne, nous ont conduit à nous intéresser au dysfonctionnement de cette barrière que nous savons impliquée au sein de la pathogénèse ophtalmologique dans la majorité des maladies rétiniennes cécitantes. Considérant la place centrale de la protéine Dp71 dans le maintien de la BHR, nous nous sommes ainsi intéressés à l'expression de la Dp71 dans un modèle de rupture de la BHR, ne comportant ni injections d'anti-VEGF, ni phénomènes ischémiques. Pour cela nous avons adapté un modèle de rupture de la BHR (H. Liu et al. 2004), par chirurgie partielle du cristallin et nous avons confirmé l'existence d'une augmentation de la perméabilité vasculaire rétinienne par la méthode du Bleu Evans (Xu, Qaum, et Adamis 2001). La rupture de BHR observée dans ce modèle animal après chirurgie partielle du cristallin est concordante avec ce qui est observé chez l'homme, et appelé syndrome d'Irvine Gass, situation rare correspondant à une rupture de la BHR associée à la formation d'un oedème maculaire chez l'homme et survenant après une chirurgie de la cataracte. Cette pathologie est le plus souvent admise comme étant liée à l'inflammation péri-opératoire (Motulsky et al. 2010).

La Dp71 est une protéine particulièrement intéressante à explorer car elle fait partie d'un complexe responsable de l'ancrage et du positionnement correct des canaux aqueux AQP4 et potassiques Kir4.1. Dans ce modèle, chez la souris, nous avons exploré l'expression de la

Dp71, dont l'ARNm diminue suivi chronologiquement par une diminution de son expression protéique 72h après la chirurgie partielle du cristallin. Cette diminution d'expression s'associe également à une diminution d'expression du canal aqueux AQP4 et une délocalisation du canal potassique Kir4.1, 2 canaux responsables du maintien de l'homéostasie rétinienne faisant partie du complexe DAPs. Le positionnement correct de ces 2 canaux semble crucial dans le contrôle de l'hydratation de la rétine (Bringmann et al. 2006; X.-Q. Liu et al. 2007). Dans la rétine saine, Kir4.1 and AQP4 sont particulièrement exprimés par les CGM et localisés au niveau de leurs pieds et procès entourant les vaisseaux rétiniens (P. Kofuji et al. 2000; Paulo Kofuji et al. 2002).

Ces résultats sont cohérents avec les connaissances antérieures relatives à la Dp71, qui a pour rôle la stabilisation des canaux aqueux et potassiques dans un domaine membranaire spécifique des CGM (Daloz et al. 2003; Fort et al. 2008; Connors et Kofuji 2002). Nous avons déjà montré dans notre laboratoire que l'absence de Dp71 entraîne une diminution d'expression d'AQP4, et une délocalisation de Kir4.1, associée à une rupture de la BHR (Daloz et al. 2003; Fort et al. 2008; Connors et Kofuji 2006). Nous avons également précédemment montré l'existence d'une diminution d'expression de la protéine Dp71, dans un modèle de décollement de rétine chez la souris, associée aux mêmes anomalies d'expression des canaux AQP4, et de délocalisation de Kir4.1 (Sene et al. 2009), ce qui conforte le rôle important de la Dp71 dans le positionnement de ces canaux.

Dans le présent travail, nous avons choisi d'injecter par voie intravitréenne de la Dexaméthasone (DEX) dans les yeux de souris après chirurgie partielle du cristallin, car cette molécule a déjà prouvé son efficacité en pratique clinique dans le traitement des oedèmes rétiniens chez l'homme.

Des travaux précédents ont montré qu'une injection intravitréenne de DEX permettait de restaurer une BHR efficace chez des rats diabétiques (K. Wang et al. 2008)(Tamura et al.

2005), et inhibait la fuite para-cellulaire induite par le VEGF chez le lapin (Edelman, Lutz, et Castro 2005). A de fortes doses in vivo (1 μ M), il a été précédemment montré une augmentation de l'expression de Kir4.1 dans une rétine saine de rat alors qu'une faible dose (100nM) n'avait pas d'effet (Zhao et al. 2011). Cependant, dans un modèle de pathologie (uvéïte induite par endotoxine), à faible dose (100nM), la DEX régule les canaux Kir4.1 (Zhao et al. 2011). A notre connaissance l'injection de DEX n'avait jamais été utilisée chez la souris dans le but de restaurer la BHR, ni même dans le but d'agir sur l'expression des canaux AQP4 et Kir4.1. Nous avons montré qu'une dose unique de DEX permet de prévenir à la fois la diminution d'expression de Dp71 et la modification d'expression et de localisation des canaux AQP4 et Kir4.1. Nous avons ainsi choisi d'adapter la dose de DEX utilisée chez le rat au poids de la souris. Nous avons donc injecté 10 μ g de DEX. A cette faible dose (23nM), dans notre modèle, nous observons un effet dans la prévention de la baisse d'expression de Dp71, AQP4 et de la délocalisation de Kir4.1 sans effet toutefois sur la BHR. Ceci suggère, l'existence d'un effet de la DEX directement sur le promoteur du gène de la Dp71, et ayant pour conséquence une inhibition de la baisse de Dp71 maintenant ainsi les canaux en position utile. Ces éléments nous permettent d'implémenter les mécanismes d'action de la DEX sur la CGM proposés par Zhao et al. (Zhao et al. 2011) en caractérisant une étape d'amont, c'est à dire le rôle de la Dp71 dans la réponse des canaux AQP4 et Kir4.1 à la DEX.

Les mécanismes conduisant de la chirurgie partielle du cristallin à la diminution de la Dp71 sont encore incomplètement élucidés, mais nous avons montré ici que la chirurgie partielle du cristallin et/ou la rupture de BHR conduit à une diminution d'expression de Dp71, elle-même responsable d'une diminution d'expression d'AQP4 et d'un changement de localisation de Kir4.1 dans les CMG (Sene et al. 2009).

L'inflammation rétinienne n'est pas en cause dans ce modèle et n'est pas responsable de la rupture de BHR, ni des modifications des canaux ioniques de la CGM. Cependant nous ne

pouvons complètement écarter un mécanisme inflammatoire à l'origine de la rupture de BHR, car il nous faudrait également écarter une inflammation du vitré.

Nous n'avons également pas montré de différence significative concernant la morphologie astrocytaire, 24 et 48 heures après chirurgie partielle du cristallin comparativement aux contrôles.

En effet, Hirrlinger et al (J. Hirrlinger, Hülsmann, et Kirchhoff 2004) ont montré que dans le cerveau des modifications morphologiques astrocytaires surviennent en quelques minutes. Les astrocytes ont une plasticité dynamique dans leurs procès distaux en réponses aux modifications de leur environnement extra-cellulaire (J.-C. Lee et al. 2013; Renner et al. 2013; Snook et al. 2014; Theodosis, Poulain, et Oliet 2008). Malgré une plasticité astrocytaire cérébrale rapide, les déplacements sont tout de même minimes. Dans ce présent travail, nous pouvons évoquer soit une insuffisance de notre méthode à mettre en évidence ces modifications minimes, soit écarter le rôle du changement de morphologie astrocytaire dans la survenue de la rupture de BHR dans ce modèle.

Enfin, quelque soit la solution appliquée à des explants rétiniens (hypo ou iso osmotique) c'est le blocage des canaux potassiques Kir4.1 par des ions Barium qui est associé à une diminution de Dp71, et là encore la DEX permet de prévenir la baisse de Dp71. Il avait déjà été montré auparavant que l'addition d'une solution hypotonique et de barium (agent bloqueur des canaux potassiques) entraîne un gonflement des CGM (Bringmann et al. 2006). Ces conditions utilisées dans le modèle des explants rétiniens reproduisent les conditions environnementales utilisées par Bringmann et al. (l'utilisation d'une solution hypotonique et le blocage des canaux potassiques Kir4.1, imitent le gradient osmotique entre le tissu rétinien hyperosmolaire –accumulation de K^{+} – et le sang et le vitré). Dans ces mêmes conditions, nous avons montré qu'il existait une diminution de l'expression de Dp71. Ce phénomène persiste également si la solution est isotonique toujours en présence d'ions barium. C'est donc

probablement le blocage des canaux potassiques qui est ici responsable de la diminution d'expression de Dp71. De plus dans ce modèle, si nous ajoutons de la DEX, nous évitons la diminution d'expression de la Dp71.

Il semble donc que dans ce modèle, que la perturbation des canaux potassiques, Kir4.1 soit à l'origine d'une diminution d'expression de la Dp71 et que ce phénomène peut être prévenu par de la DEX. Les mécanismes aboutissant à la prévention de la diminution de l'expression de Dp71 semblent liés à une surexpression du gène HSF1 qui a été montré récemment comme étant un des facteurs régulateurs de l'expression de la Dp71 (Tan et al. 2015). La DEX semble donc surexprimer HSF1, qui augmente l'expression de Dp71 et qui aboutit à une correction des canaux Kir4.1.

2- Perspectives

Implication des astrocytes dans l'angiogénèse

A l'issue de ce travail de nombreuses perspectives s'offrent à nous, tout d'abord, l'application directe de la mise en évidence d'un réseau astrocytaire défectueux chez la souris KoDp71, permettrait d'utiliser ce modèle dans l'exploration des pathologies néovasculaires rétinienne. En effet, les vaisseaux nécessitent un guidage par un réseau astrocytaire afin de proliférer. Il pourrait être intéressant de reproduire un modèle pathologique tel que la rétinopathie des prématurés chez les souris KoDp71, afin d'étudier précisément le rôle des astrocytes anormaux dans ce modèle. En effet, les travaux de thèse du Pr Tadayoni, avaient retrouvé un effet protecteur de l'absence de Dp71 chez la KoDp71 sur la prolifération néovasculaire. A la lumière de ces nouveaux résultats, l'existence d'un réseau astrocytaire anormal chez la souris KoDp71 paraît expliquer une plus faible prolifération néovasculaire pré-rétinienne dans cette souche par un moindre guidage astrocytaire. Il paraît donc intéressant de reproduire ces expérimentations afin d'évaluer l'effet du modèle d'hyperoxie sur la densité et la morphologie astrocytaire à la fois chez la souris sauvage ainsi que dans notre modèle de souris KoDp71.

Implication des astrocytes dans la rupture de BHR

Comme nous l'avons évoqué dans la discussion, l'absence de différence mise en évidence entre les souris ayant eu une chirurgie partielle du cristallin et les souris non opérées, pourrait être liée à un système de mesure insuffisant. D'autres méthodes de quantification pourraient être évaluées. En effet, dans le cerveau l'évaluation de la plasticité astrocytaire a été étudiée, et les résultats montrent que cette plasticité est rapide et que des modifications morphologiques astrocytaires surviennent en quelques minutes seulement. Cependant il s'agit

de modifications de taille infimes qui ont pu passer au travers de l'analyse macroscopique que nous avons réalisée.

Par ailleurs les astrocytes, comme les CGM sont également pourvus de canaux AQP4 et Kir4.1, qui pourraient également participer au maintien de l'homéostasie rétinienne. Des marquages sur ces canaux et les astrocytes permettraient une exploration des modifications survenant après chirurgie du cristallin

Rôle de la Dp71 dans la rupture de BHR

Nous avons précédemment montré dans l'équipe que l'absence de Dp71 chez la souris KoDp71, entraînait une rupture de la BHR. Ici, dans cette étude, nous montrons que dans un modèle de rupture de BHR très transitoire, l'expression de Dp71 diminue parallèlement à l'augmentation de la perméabilité vasculaire. Nous souhaitons désormais vérifier également cette hypothèse dans d'autres modèles comme par exemple celui de l'occlusion de branche veineuse rétinienne chez la souris. Modèle qui a des applications directes en ophtalmologie pratique puisqu'il reproduit une pathologie rétinienne fréquente (occlusion de branche veineuse rétinienne). La confirmation de la diminution de l'expression de la Dp71 dans 2 modèles distincts de ruptures de BHR conforterait nos résultats.

Rôle de l'inflammation dans la rupture de BHR après chirurgie partielle du cristallin

Nous avons montré au cours de ce travail qu'il n'y avait pas de surexpression des protéines de l'inflammation dans la rétine des souris ayant eu une chirurgie partielle du cristallin, par rapport aux souris contrôles. Cependant, le syndrome d'Irvine Gass, est tout de même une maladie considérée comme inflammatoire par les ophtalmologistes, et le contact entre le contenu cristallinien et le milieu endo-oculaire est source d'inflammation. Nous allons donc

nous attacher à rechercher cette inflammation dans le vitré des souris après chirurgie partielle du cristallin et tenter de rechercher si une modification de marqueurs inflammatoires dans le vitré peut être à l'origine d'une rupture de la BHR.

Explants rétiniens

Les explants rétiniens constituent un préalable à l'exploration in vivo, permettant de tester différentes voies de signalisation. Ici, nous avons montré qu'un blocage des canaux potassiques reproduisant ce que l'on peut voir en conditions pathologiques dans la rétine, entraîne une diminution de l'expression de la dystrophine Dp71. L'ajout de Dexaméthasone, dans les explants rétiniens prévient cette diminution. Nous avons également montré que la Dexaméthasone pouvait prévenir la diminution des canaux potassiques Kir4.1, même en présence d'ions Barium (bloqueurs de canaux potassiques). Nous émettons l'hypothèse que cette régulation des canaux Kir4.1 passe par une surexpression de la Dp71 par la Dexaméthasone. En effet, le facteur HSF1 (Tan J, et al. 2015), considéré comme un des régulateurs transcriptionnels de la Dp71, qui n'est pas modifié en présence d'ions barium, est surexprimé par la Dexaméthasone. L'étape suivante sera de déterminer dans ces explants rétiniens l'expression des autres protéines du complexe DAPs, ainsi que l'effet de la Dexaméthasone sur cette expression. De plus, nous pourrons également tester l'effet des différents traitements dans ces mêmes conditions : la Triamcinolone (afin de vérifier si l'effet de la Dexaméthasone est commun aux autres classes de corticoïdes) et l'effet d'antiVEGF.

Perspectives cliniques

La meilleure connaissance de ces phénomènes de maintien de l'homéostasie rétinienne d'une part et de régulation de la Dp71 par l'injection intravitréenne de Dexaméthasone d'autre part, via la surexpression de HSF1 ouvre de nouveaux axes de réflexion en

pratique clinique courante. En effet, la restauration rapide de ces phénomènes homéostasiques rétiniens, qui sont altérés au cours des pathologies rétiniennes pourrait permettre une protection des cellules neuronales rétiniennes soumises à des conditions pathologiques. En effet, le rétablissement d'un fonctionnement correct des CGM est requis afin d'éliminer des synapses les substances toxiques pour les cellules neuronales. L'injection préventive et précoce de Dexaméthasone pourrait dans certains cas de pathologies rétiniennes (à évaluer cliniquement) permettre la restauration de cette fonction.

V/ Conclusion

Nous apportons ici des preuves, que la protéine Dp71, protéine du cytosquelette associée à la membrane est exprimée au sein de la rétine, non seulement dans les CGM mais également dans les astrocytes, et est impliquée dans le maintien de la densité et de la morphologie astrocytaire servant de patron au développement vasculaire rétinien normal. Cette protéine est également associée au maintien de l'homéostasie rétinienne via des canaux aqueux et potassiques transmembranaires au niveau des cellules macrogliales rétiniennes. Nous montrons également, qu'en conditions pathologiques, la perte de cette dernière fonction peut être prévenue par l'utilisation de Dexaméthasone, probablement par surexpression d'un des facteurs transcriptionnels de la Dp71, HSF1. La poursuite de ces travaux a pour but la mise en évidence de cibles moléculaires qui pourraient permettre dans l'avenir une protection des cellules rétiniennes en conditions de stress, soit par l'utilisation de nouvelles molécules soit par adaptation de l'utilisation des traitements actuellement à notre disposition (corticoïdes, antiVEGF).

VI/ Bibliographie

Acosta, Rosalinda, Cecilia Montañez, Lizeth Fuentes-Mera, Everardo Gonzalez, Pablo Gómez, Leonor Quintero-Mora, Dominique Mornet, Luis M. Alvarez-Salas, et Bulmaro Cisneros. 2004. « Dystrophin Dp71 Is Required for Neurite Outgrowth in PC12 Cells. » *Experimental Cell Research* 296 (2): 265-275.

Ahn, A. H., et L. M. Kunkel. 1993. « The Structural and Functional Diversity of Dystrophin. » *Nature Genetics* 3 (4): 283-291.

Antonetti, D. A., A. J. Barber, S. Khin, E. Lieth, J. M. Tarbell, et T. W. Gardner. 1998. « Vascular Permeability in Experimental Diabetes Is Associated with Reduced Endothelial Occludin Content: Vascular Endothelial Growth Factor Decreases Occludin in Retinal Endothelial Cells. Penn State Retina Research Group. » *Diabetes* 47 (12): 1953-1959.

Antonetti, David A., Ellen B. Wolpert, Lucas DeMaio, Nicole S. Harhaj, et Russell C. Scaduto. 2002. « Hydrocortisone Decreases Retinal Endothelial Cell Water and Solute Flux Coincident with Increased Content and Decreased Phosphorylation of Occludin. » *Journal of Neurochemistry* 80 (4): 667-677.

Arganda-Carreras, Ignacio, Rodrigo Fernández-González, Arrate Muñoz-Barrutia, et Carlos Ortiz-De-Solorzano. 2010. « 3D Reconstruction of Histological Sections: Application to Mammary Gland Tissue. » *Microscopy Research and Technique* 73 (11): 1019-1029.

Aveleira, Célia A., Cheng-Mao Lin, Steven F. Abcouwer, António F. Ambrósio, et David A. Antonetti. 2010. « TNF- α Signals through PKC ζ /NF- κ B to Alter the Tight Junction Complex and Increase Retinal Endothelial Cell Permeability. » *Diabetes* 59 (11): 2872-2882.

Balda, M. S., L. Gonzalez-Mariscal, K. Matter, M. Cerejido, et J. M. Anderson. 1993. « Assembly of the Tight Junction: The Role of Diacylglycerol. » *The Journal of Cell Biology* 123 (2): 293-302.

Barber, Alistair J., et David A. Antonetti. 2003. « Mapping the Blood Vessels with Paracellular Permeability in the Retinas of Diabetic Rats. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44 (12): 5410-5416.

Barnett, N. L., et D. V. Pow. 2000. « Antisense Knockdown of GLAST, a Glial Glutamate Transporter, Compromises Retinal Function. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41 (2): 585-591.

Bar, S., E. Barnea, Z. Levy, S. Neuman, D. Yaffe, et U. Nudel. 1990. « A Novel Product of the Duchenne Muscular Dystrophy Gene Which Greatly Differs from the Known Isoforms in Its Structure and Tissue Distribution. » *The Biochemical Journal* 272 (2): 557-560.

Beutler, B., et A. Cerami. 1986. « Cachectin/tumor Necrosis Factor: An Endogenous Mediator of Shock and Inflammation. » *Immunologic Research* 5 (4): 281-293.

Blake, D. J., R. Hawkes, M. A. Benson, et P. W. Beesley. 1999. « Different Dystrophin-like Complexes Are Expressed in Neurons and Glia. » *The Journal of Cell Biology* 147 (3): 645-658.

Blake, D. J., D. R. Love, J. Tinsley, G. E. Morris, H. Turley, K. Gatter, G. Dickson, Y. H.

Edwards, et K. E. Davies. 1992. « Characterization of a 4.8kb Transcript from the Duchenne Muscular Dystrophy Locus Expressed in Schwannoma Cells. » *Human Molecular Genetics* 1 (2): 103-109.

Bonet-Kerrache, A., E. Fabbrizio, et D. Mornet. 1994. « N-Terminal Domain of Dystrophin. » *FEBS Letters* 355 (1): 49-53.

Bordais, Agnès, Francisco Bolaños-Jimenez, Patrice Fort, Carolina Varela, José-Alain Sahel, Serge Picaud, et Alvaro Rendon. 2005. « Molecular Cloning and Protein Expression of Duchenne Muscular Dystrophy Gene Products in Porcine Retina. » *Neuromuscular Disorders: NMD* 15 (7): 476-487. doi:10.1016/j.

Brem, H., I. Gresser, J. Grosfeld, et J. Folkman. 1993. « The Combination of Antiangiogenic Agents to Inhibit Primary Tumor Growth and Metastasis. » *Journal of Pediatric Surgery* 28 (10): 1253-1257.

Bresnick, G. H. 1983. « Diabetic Maculopathy. A Critical Review Highlighting Diffuse Macular Edema. » *Ophthalmology* 90 (11): 1301-1317.

Bringmann, Andreas, Thomas Pannicke, Jens Grosche, Mike Francke, Peter Wiedemann, Serguei N. Skatchkov, Neville N. Osborne, et Andreas Reichenbach. 2006. « Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina. » *Progress in Retinal and Eye Research* 25 (4): 397-424.

Bringmann, Andreas, Andreas Reichenbach, et Peter Wiedemann. 2004. « Pathomechanisms of Cystoid Macular Edema. » *Ophthalmic Research* 36 (5): 241-249.

Bulfield, G., W. G. Siller, P. A. Wight, et K. J. Moore. 1984. « X Chromosome-Linked Muscular Dystrophy (mdx) in the Mouse. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (4): 1189-1192.

Butt, Arthur M., et Amanpreet Kalsi. 2006. « Inwardly Rectifying Potassium Channels (Kir) in Central Nervous System Glia: A Special Role for Kir4.1 in Glial Functions. » *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 10 (1): 33-44.

Byers, T. J., H. G. Lidov, et L. M. Kunkel. 1993. « An Alternative Dystrophin Transcript Specific to Peripheral Nerve. » *Nature Genetics* 4 (1): 77-81.

Cahoy, John D., Ben Emery, Amit Kaushal, Lynette C. Foo, Jennifer L. Zamanian, Karen S. Christopherson, Yi Xing, et al. 2008. « A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function. » *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (1): 264-278.

Cataldo, A. M., et R. D. Broadwell. 1986. « Cytochemical Identification of Cerebral Glycogen and Glucose-6-Phosphatase Activity under Normal and Experimental Conditions. II. Choroid Plexus and Ependymal Epithelia, Endothelia and Pericytes. » *Journal of Neurocytology* 15 (4): 511-524.

Chan-Ling, Tailoi, Yi Chu, Louise Baxter, Michael Weible Ii, et Suzanne Hughes. 2009. « In Vivo Characterization of Astrocyte Precursor Cells (APCs) and Astrocytes in Developing Rat

Retinae: Differentiation, Proliferation, and Apoptosis. » *Glia* 57 (1): 39–53.

Chapouly, Candice, Azeb Tadesse Argaw, Sam Horng, Kamilah Castro, Jingya Zhang, Linnea Asp, Hannah Loo, et al. 2015. « Astrocytic TYMP and VEGFA Drive Blood-Brain Barrier Opening in Inflammatory Central Nervous System Lesions. » *Brain: A Journal of Neurology* 138 (Pt 6): 1548–67.

Choi, Yoon Kyung, et Kyu-Won Kim. 2008. « AKAP12 in Astrocytes Induces Barrier Functions in Human Endothelial Cells through Protein Kinase Czeta. » *The FEBS Journal* 275 (9): 2338–53.

Citi, S., H. Sabanay, R. Jakes, B. Geiger, et J. Kendrick-Jones. 1988. « Cingulin, a New Peripheral Component of Tight Junctions. » *Nature* 333 (6170): 272–76.

Claudepierre, T., C. Dalloz, D. Mornet, K. Matsumura, J. Sahel, et A. Rendon. 2000. « Characterization of the Intermolecular Associations of the Dystrophin-Associated Glycoprotein Complex in Retinal Müller Glial Cells. » *Journal of Cell Science* 113 Pt 19 (octobre): 3409–17.

Claudepierre, T., D. Mornet, T. Pannicke, V. Forster, C. Dalloz, F. Bolaños, J. Sahel, A. Reichenbach, et A. Rendon. 2000. « Expression of Dp71 in Müller Glial Cells: A Comparison with Utrophin- and Dystrophin-Associated Proteins. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41 (1): 294–304.

Connors, Nathan C., Marvin E. Adams, Stanley C. Froehner, et Paulo Kofuji. 2004. « The Potassium Channel Kir4.1 Associates with the Dystrophin-Glycoprotein Complex via Alpha-Syntrophin in Glia. » *The Journal of Biological Chemistry* 279 (27): 28387–92.

Connors, Nathan C., et Paulo Kofuji. 2002. « Dystrophin Dp71 Is Critical for the Clustered Localization of Potassium Channels in Retinal Glial Cells. » *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22 (11): 4321–27.

Connors, Nathan C., et Paulo Kofuji. 2006. « Potassium Channel Kir4.1 Macromolecular Complex in Retinal Glial Cells. » *Glia* 53 (2): 124–31.

Copin, J. C., M. Ledig, et G. Tholey. 1992. « Free Radical Scavenging Systems of Rat Astroglial Cells in Primary Culture: Effects of Anoxia and Drug Treatment. » *Neurochemical Research* 17 (7): 677–82.

Dalloz, Cécile, Rachel Sarig, Patrice Fort, David Yaffe, Agnès Bordais, Thomas Pannicke, Jens Grosche, et al. 2003. « Targeted Inactivation of Dystrophin Gene Product Dp71: Phenotypic Impact in Mouse Retina. » *Human Molecular Genetics* 12 (13): 1543–54.

Daoud, Fatma, Nathalie Angeard, Bénédicte Demerre, Itxaso Martie, Rabah Benyaou, France Leturcq, Mireille Cossée, et al. 2009. « Analysis of Dp71 Contribution in the Severity of Mental Retardation through Comparison of Duchenne and Becker Patients Differing by Mutation Consequences on Dp71 Expression. » *Human Molecular Genetics* 18 (20): 3779–94.

Derynck, R. 1990. « Transforming Growth Factor-Alpha. » *Molecular Reproduction and*

Development 27 (1): 3□9.

Di Giorgio, Francesco Paolo, Monica A. Carrasco, Michelle C. Siao, Tom Maniatis, et Kevin Eggan. 2007. « Non-Cell Autonomous Effect of Glia on Motor Neurons in an Embryonic Stem Cell-Based ALS Model. » *Nature Neuroscience* 10 (5): 608□14.

Donovan, Maryanne, Francesca Doonan, et Thomas G. Cotter. 2006. « Decreased Expression of pro-Apoptotic Bcl-2 Family Members during Retinal Development and Differential Sensitivity to Cell Death. » *Developmental Biology* 291 (1): 154□69.

Dorrell, Michael I., Edith Aguilar, et Martin Friedlander. 2002. « Retinal Vascular Development Is Mediated by Endothelial Filopodia, a Preexisting Astrocytic Template and Specific R-Cadherin Adhesion. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 43 (11): 3500□3510.

D'Souza, V. N., T. M. Nguyen, G. E. Morris, W. Karges, D. A. Pillers, et P. N. Ray. 1995. « A Novel Dystrophin Isoform Is Required for Normal Retinal Electrophysiology. » *Human Molecular Genetics* 4 (5): 837□42.

Durbeej, Madeleine. 2010. « Laminins. » *Cell and Tissue Research* 339 (1): 259□68.

Edelman, Jeffrey L., David Lutz, et Marisol R. Castro. 2005. « Corticosteroids Inhibit VEGF-Induced Vascular Leakage in a Rabbit Model of Blood-Retinal and Blood-Aqueous Barrier Breakdown. » *Experimental Eye Research* 80 (2): 249□58.

Edwards, Malia M., et Olivier Lefebvre. 2013. « Laminins and Retinal Vascular Development. » *Cell Adhesion & Migration* 7 (1): 82□89.

Ehmsen, Jeffrey, Ellen Poon, et Kay Davies. 2002. « The Dystrophin-Associated Protein Complex. » *Journal of Cell Science* 115 (Pt 14): 2801□3.

Emery, A. E. 1991. « Population Frequencies of Inherited Neuromuscular Diseases--a World Survey. » *Neuromuscular Disorders: NMD* 1 (1): 19□29.

Emery, A. E., et M. L. Emery. 1993. « Edward Meryon (1809-1880) and Muscular Dystrophy. » *Journal of Medical Genetics* 30 (6): 506□11.

Enríquez-Aragón, Jose Arturo, Joel Cerna-Cortés, Mario Bermúdez de León, Francisco García-Sierra, Everardo González, Dominique Mornet, et Bulmaro Cisneros. 2005. « Dystrophin Dp71 in PC12 Cell Adhesion. » *Neuroreport* 16 (3): 235□38.

Fabbrizio, E., U. Nudel, G. Hugon, A. Robert, F. Pons, et D. Mornet. 1994. « Characterization and Localization of a 77 kDa Protein Related to the Dystrophin Gene Family. » *The Biochemical Journal* 299 (Pt 2) (avril): 359□65.

Fagan, Xavier J., Jaime Levy, Salmaan Al-Qureshi, et C. Alex Harper. 2012. « Proliferative Retinopathy in Duchenne Muscular Dystrophy and Its Response to Bevacizumab. » *Clinical & Experimental Ophthalmology* 40 (9): 906□7.

Fanning, A. S., B. J. Jameson, L. A. Jesaitis, et J. M. Anderson. 1998. « The Tight Junction Protein ZO-1 Establishes a Link between the Transmembrane Protein Occludin and the Actin

- Cytoskeleton. » *The Journal of Biological Chemistry* 273 (45): 29745-29753.
- Felinski, Edward A., Amy E. Cox, Brett E. Phillips, et David A. Antonetti. 2008. « Glucocorticoids Induce Transactivation of Tight Junction Genes Occludin and Claudin-5 in Retinal Endothelial Cells via a Novel Cis-Element. » *Experimental Eye Research* 86 (6): 867-878.
- Feng, Y., V. J. Venema, R. C. Venema, N. Tsai, M. A. Behzadian, et R. B. Caldwell. 1999. « VEGF-Induced Permeability Increase Is Mediated by Caveolae. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40 (1): 157-167.
- Ferrara, N., K. Houck, L. Jakeman, et D. W. Leung. 1992. « Molecular and Biological Properties of the Vascular Endothelial Growth Factor Family of Proteins. » *Endocrine Reviews* 13 (1): 18-32.
- Fett, J. W., D. J. Strydom, R. R. Lobb, E. M. Alderman, J. L. Bethune, J. F. Riordan, et B. L. Vallee. 1985. « Isolation and Characterization of Angiogenin, an Angiogenic Protein from Human Carcinoma Cells. » *Biochemistry* 24 (20): 5480-5486.
- Fine, B. S., et A. J. Brucker. 1981. « Macular Edema and Cystoid Macular Edema. » *American Journal of Ophthalmology* 92 (4): 466-481.
- Folkman, J., et Y. Shing. 1992. « Angiogenesis. » *The Journal of Biological Chemistry* 267 (16): 10931-10934.
- Förster, Carola, Christine Silwedel, Nikola Golenhofen, Malgorzata Burek, Silke Kietz, Joachim Mankertz, et Detlev Drenckhahn. 2005. « Occludin as Direct Target for Glucocorticoid-Induced Improvement of Blood-Brain Barrier Properties in a Murine in Vitro System. » *The Journal of Physiology* 565 (Pt 2): 475-486.
- Fort, Patrice E., Abdoulaye Sene, Thomas Pannicke, Michel J. Roux, Valerie Forster, Dominique Mornet, Uri Nudel, et al. 2008. « Kir4.1 and AQP4 Associate with Dp71- and Utrophin-DAPs Complexes in Specific and Defined Microdomains of Müller Retinal Glial Cell Membrane. » *Glia* 56 (6): 597-610.
- Fruttiger, Marcus. 2002. « Development of the Mouse Retinal Vasculature: Angiogenesis versus Vasculogenesis. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 43 (2): 522-527.
- Fruttiger, Marcus. 2007. « Development of the Retinal Vasculature. » *Angiogenesis* 10 (2): 77-88.
- Fruttiger, M., A. R. Calver, W. H. Krüger, H. S. Mudhar, D. Michalovich, N. Takakura, S. Nishikawa, et W. D. Richardson. 1996. « PDGF Mediates a Neuron-Astrocyte Interaction in the Developing Retina. » *Neuron* 17 (6): 1117-1131.
- Fruttiger, M., A. R. Calver, et W. D. Richardson. 2000. « Platelet-Derived Growth Factor Is Constitutively Secreted from Neuronal Cell Bodies but Not from Axons. » *Current Biology: CB* 10 (20): 1283-1286.
- Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita, et S. Tsukita. 1993. « Occludin: A Novel Integral Membrane Protein Localizing at Tight Junctions. » *The Journal*

of Cell Biology 123 (6 Pt 2): 1777-1788.

Gardner, T. W. 1995. « Histamine, ZO-1 and Increased Blood-Retinal Barrier Permeability in Diabetic Retinopathy. » *Transactions of the American Ophthalmological Society* 93: 583-621.

Gardner, T. W., E. Lieth, S. A. Khin, A. J. Barber, D. J. Bonsall, T. Leshner, K. Rice, et W. A. Brennan. 1997. « Astrocytes Increase Barrier Properties and ZO-1 Expression in Retinal Vascular Endothelial Cells. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 38 (11): 2423-2427.

Gariano, Ray F., et Thomas W. Gardner. 2005. « Retinal Angiogenesis in Development and Disease. » *Nature* 438 (7070): 960-966.

Gnanaguru, Gopalan, Galina Bachay, Saptarshi Biswas, Germán Pinzón-Duarte, Dale D. Hunter, et William J. Brunken. 2013. « Laminins Containing the β 2 and γ 3 Chains Regulate Astrocyte Migration and Angiogenesis in the Retina. » *Development (Cambridge, England)* 140 (9): 2050-2060.

Górecki, D. C., et E. A. Barnard. 1995. « Specific Expression of G-Dystrophin (Dp71) in the Brain. » *Neuroreport* 6 (6): 893-896.

Hahn, Paul, Phoebe Lin, et Sharon Fekrat. 2013. « Ultra-Widefield Imaging of Duchenne Muscular Dystrophy-Associated Proliferative Retinal Vasculopathy Improved with Panretinal Laser Photocoagulation Alone. » *Ophthalmic Surgery, Lasers & Imaging Retina* 44 (3): 293-295.

Haydon, P. G. 2001. « GLIA: Listening and Talking to the Synapse. » *Nature Reviews. Neuroscience* 2 (3): 185-193.

Heiss, J. D., E. Papavassiliou, M. J. Merrill, L. Nieman, J. J. Knightly, S. Walbridge, N. A. Edwards, et E. H. Oldfield. 1996. « Mechanism of Dexamethasone Suppression of Brain Tumor-Associated Vascular Permeability in Rats. Involvement of the Glucocorticoid Receptor and Vascular Permeability Factor. » *The Journal of Clinical Investigation* 98 (6): 1400-1408.

Hirota, Shinya, Qian Liu, Hye Shin Lee, Mohammad G. Hossain, Adam Lacy-Hulbert, et Joseph H. McCarty. 2011. « The Astrocyte-Expressed Integrin α v β 8 Governs Blood Vessel Sprouting in the Developing Retina. » *Development (Cambridge, England)* 138 (23): 5157-5166.

Hirrlinger, Johannes, Swen Hülsmann, et Frank Kirchhoff. 2004. « Astroglial Processes Show Spontaneous Motility at Active Synaptic Terminals in Situ. » *The European Journal of Neuroscience* 20 (8): 2235-2239.

Hirrlinger, Petra G., Thomas Pannicke, Ulrike Winkler, Thomas Claudepierre, Shweta Varshney, Christine Schulze, Andreas Reichenbach, William J. Brunken, et Johannes Hirrlinger. 2011. « Genetic Deletion of Laminin Isoforms β 2 and γ 3 Induces a Reduction in Kir4.1 and Aquaporin-4 Expression and Function in the Retina. » *PloS One* 6 (1): e16106.

Hoffman, E. P., C. A. Garcia, J. S. Chamberlain, C. Angelini, J. R. Lupski, et R. Fenwick.

1991. « Is the Carboxyl-Terminus of Dystrophin Required for Membrane Association? A Novel, Severe Case of Duchenne Muscular Dystrophy. » *Annals of Neurology* 30 (4): 605-610.
- Howard, P. L., G. Y. Dally, M. H. Wong, A. Ho, R. G. Weleber, D. A. Pillers, et P. N. Ray. 1998. « Localization of Dystrophin Isoform Dp71 to the Inner Limiting Membrane of the Retina Suggests a Unique Functional Contribution of Dp71 in the Retina. » *Human Molecular Genetics* 7 (9): 1385-1391.
- Hugnot, J. P., H. Gilgenkrantz, N. Vincent, P. Chafey, G. E. Morris, A. P. Monaco, Y. Berwald-Netter, A. Koulakoff, J. C. Kaplan, et A. Kahn. 1992. « Distal Transcript of the Dystrophin Gene Initiated from an Alternative First Exon and Encoding a 75-kDa Protein Widely Distributed in Nonmuscle Tissues. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (16): 7506-7510.
- Huxlin, K. R., A. J. Sefton, et J. H. Furby. 1992. « The Origin and Development of Retinal Astrocytes in the Mouse. » *Journal of Neurocytology* 21 (7): 530-544.
- Ishikawa, F., K. Miyazono, U. Hellman, H. Drexler, C. Wernstedt, K. Hagiwara, K. Usuki, F. Takaku, W. Risau, et C. H. Heldin. 1989. « Identification of Angiogenic Activity and the Cloning and Expression of Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor. » *Nature* 338 (6216): 557-562.
- Itoh, M., A. Nagafuchi, S. Moroi, et S. Tsukita. 1997. « Involvement of ZO-1 in Cadherin-Based Cell Adhesion through Its Direct Binding to Alpha Catenin and Actin Filaments. » *The Journal of Cell Biology* 138 (1): 181-192.
- Jancsik, V., et F. Hajós. 1999. « The Demonstration of Immunoreactive Dystrophin and Its Developmental Expression in Perivascular Astrocytes. » *Brain Research* 831 (1-2): 200-205.
- Janzer, R. C., et M. C. Raff. 1987. « Astrocytes Induce Blood-Brain Barrier Properties in Endothelial Cells. » *Nature* 325 (6101): 253-257.
- Jesaitis, L. A., et D. A. Goodenough. 1994. « Molecular Characterization and Tissue Distribution of ZO-2, a Tight Junction Protein Homologous to ZO-1 and the Drosophila Discs-Large Tumor Suppressor Protein. » *The Journal of Cell Biology* 124 (6): 949-961.
- Kaal, Evert C. A., et Charles J. Vecht. 2004. « The Management of Brain Edema in Brain Tumors. » *Current Opinion in Oncology* 16 (6): 593-600.
- Karwoski, C. J., H. K. Lu, et E. A. Newman. 1989. « Spatial Buffering of Light-Evoked Potassium Increases by Retinal Müller (glial) Cells. » *Science (New York, N.Y.)* 244 (4904): 578-580.
- Keil, Jason M., Xuwen Liu, et David A. Antonetti. 2013. « Glucocorticoid Induction of Occludin Expression and Endothelial Barrier Requires Transcription Factor p54 NONO. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 54 (6): 4007-4015.
- Klaassen, Ingeborg, John M. Hughes, Ilse M. C. Vogels, Casper G. Schalkwijk, Cornelis J. F. Van Noorden, et Reinier O. Schlingemann. 2009. « Altered Expression of Genes Related to Blood-Retina Barrier Disruption in Streptozotocin-Induced Diabetes. » *Experimental Eye*

Research 89 (1): 4□15.

Koenig, M., E. P. Hoffman, C. J. Bertelson, A. P. Monaco, C. Feener, et L. M. Kunkel. 1987. « Complete Cloning of the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) cDNA and Preliminary Genomic Organization of the DMD Gene in Normal and Affected Individuals. » *Cell* 50 (3): 509□17.

Kofuji, Paulo, Bernd Biedermann, Venkatraman Siddharthan, Maik Raap, Ian Iandiev, Ivan Milenkovic, Achim Thomzig, Rüdiger W. Veh, Andreas Bringmann, et Andreas Reichenbach. 2002. « Kir Potassium Channel Subunit Expression in Retinal Glial Cells: Implications for Spatial Potassium Buffering. » *Glia* 39 (3): 292□303.

Kofuji, P., P. Ceelen, K. R. Zahs, L. W. Surbeck, H. A. Lester, et E. A. Newman. 2000. « Genetic Inactivation of an Inwardly Rectifying Potassium Channel (Kir4.1 Subunit) in Mice: Phenotypic Impact in Retina. » *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (15): 5733□40.

Krause, D., U. Mischeck, H. J. Galla, et R. Dermietzel. 1991. « Correlation of Zonula Occludens ZO-1 Antigen Expression and Transendothelial Resistance in Porcine and Rat Cultured Cerebral Endothelial Cells. » *Neuroscience Letters* 128 (2): 301□4.

Kubota, Yoshiaki, et Toshio Suda. 2009. « Feedback Mechanism between Blood Vessels and Astrocytes in Retinal Vascular Development. » *Trends in Cardiovascular Medicine* 19 (2): 38□43.

Lam, Wai-Ching, David A. Albani, Pradeepa Yoganathan, John Chanchiang Chen, Amin Kherani, David Al Maberley, Alejandro Oliver, et al. 2015. « Real-World Assessment of Intravitreal Dexamethasone Implant (0.7 Mg) in Patients with Macular Edema: The CHROME Study. » *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)* 9: 1255□68.

Larsen, Michael, Maria Wang, et Birgit Sander. 2005. « Overnight Thickness Variation in Diabetic Macular Edema. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46 (7): 2313□16.

Lee, In Sook, Ji Eun Lee, Hak Jin Kim, Jong Woon Song, et Seon Hee Choi. 2011. « Immediate Break-down of Blood Retinal Barrier by Infusion of Triolein Emulsion Observed by Fluorescein Angiography. » *Current Eye Research* 36 (4): 358□63.

Lee, Jae-Chul, Ji Hyeon Ahn, In Hye Kim, Joon Ha Park, Bing Chun Yan, Geum-Sil Cho, Taek Geun Ohk, et al. 2014. « Transient Ischemia-Induced Change of CCR7 Immunoreactivity in Neurons and Its New Expression in Astrocytes in the Gerbil Hippocampus. » *Journal of the Neurological Sciences* 336 (1-2): 203□10.

Lee, Jae-Chul, Ji Hyeon Ahn, Dae Hwan Lee, Bing Chun Yan, Joon Ha Park, In Hye Kim, Geum-Sil Cho, et al. 2013. « Neuronal Damage and Gliosis in the Somatosensory Cortex Induced by Various Durations of Transient Cerebral Ischemia in Gerbils. » *Brain Research* 1510 (mai): 78□88.

Lehre, K. P., L. M. Levy, O. P. Ottersen, J. Storm-Mathisen, et N. C. Danbolt. 1995. « Differential Expression of Two Glial Glutamate Transporters in the Rat Brain: Quantitative and Immunocytochemical Observations. » *The Journal of Neuroscience: The Official Journal*

of the Society for Neuroscience 15 (3 Pt 1): 1835□53.

Lidov, H. G., et L. M. Kunkel. 1997. « Dp140: Alternatively Spliced Isoforms in Brain and Kidney. » *Genomics* 45 (1): 132□39.

Liu, Hansheng, Anna Maria Demetriades, Wei-Hong Xiao, Peter A. Campochiaro, et Stanley A. Vinore. 2004. « Mouse Model of Post-Surgical Breakdown of the Blood-Retinal Barrier. » *Current Eye Research* 28 (6): 421□26.

Liu, Xiao-Qiang, Hideyuki Kobayashi, Zi-Bing Jin, Akihiko Wada, et Nobuhis Nao-I. 2007. « Differential Expression of Kir4.1 and Aquaporin 4 in the Retina from Endotoxin-Induced Uveitis Rat. » *Molecular Vision* 13: 309□17.

Lobo, Conceição. 2012. « Pseudophakic Cystoid Macular Edema. » *Ophthalmologica. Journal International D'ophthalmologie. International Journal of Ophthalmology. Zeitschrift Für Augenheilkunde* 227 (2): 61□67.

Louie, K., R. S. Apte, K. Mori, et P. Gehlbach. 2004. « Severe Proliferative Retinopathy in a Patient with Advanced Muscular Dystrophy. » *The British Journal of Ophthalmology* 88 (12): 1604□5.

Maheshwari, Megha, Supriya Bhutani, Aniruddha Das, Rajarshi Mukherjee, Ankit Sharma, Yoshihiro Kino, Nobuyuki Nukina, et Nihar Ranjan Jana. 2014. « Dexamethasone Induces Heat Shock Response and Slows down Disease Progression in Mouse and Fly Models of Huntington's Disease. » *Human Molecular Genetics* 23 (10): 2737□51.

Makar, T. K., M. Nedergaard, A. Preuss, A. S. Gelbard, A. S. Perumal, et A. J. Cooper. 1994. « Vitamin E, Ascorbate, Glutathione, Glutathione Disulfide, and Enzymes of Glutathione Metabolism in Cultures of Chick Astrocytes and Neurons: Evidence That Astrocytes Play an Important Role in Antioxidative Processes in the Brain. » *Journal of Neurochemistry* 62 (1): 45□53.

Marmor, M. F. 1999. « Mechanisms of Fluid Accumulation in Retinal Edema. » *Documenta Ophthalmologica. Advances in Ophthalmology* 97 (3-4): 239□49.

Martin, D. L. 1992. « Synthesis and Release of Neuroactive Substances by Glial Cells. » *Glia* 5 (2): 81□94.

Martín-Padura, I., S. Lostaglio, M. Schneemann, L. Williams, M. Romano, P. Fruscella, C. Panzeri, et al. 1998. « Junctional Adhesion Molecule, a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily That Distributes at Intercellular Junctions and Modulates Monocyte Transmigration. » *The Journal of Cell Biology* 142 (1): 117□27.

Ma, Shang, Hyo Jun Kwon, et Zhen Huang. 2012a. « A Functional Requirement for Astroglia in Promoting Blood Vessel Development in the Early Postnatal Brain. » *PloS One* 7 (10): e48001.

Ma, Shang, Hyo Jun Kwon, et Zhen Huang. 2012b. « A Functional Requirement for Astroglia in Promoting Blood Vessel Development in the Early Postnatal Brain. » *PloS One* 7 (10): e48001.

Mathari, Brahim El, Abdoulaye Sene, Hugo Charles-Messance, Ophélie Vacca, Xavier Guillonneau, Claudine Grepin, Florian Sennlaub, José-Alain Sahel, Alvaro Rendon, et Ramin Tadayoni. 2015. « Dystrophin Dp71 Gene Deletion Induces Retinal Vascular Inflammation and Capillary Degeneration. » *Human Molecular Genetics*, avril.

Miyawaki, Takaya, Akiyoshi Uemura, Mari Dezawa, Ruth T. Yu, Chizuka Ide, Shinichi Nishikawa, Yoshihito Honda, Yasuto Tanabe, et Teruyo Tanabe. 2004. « Tlx, an Orphan Nuclear Receptor, Regulates Cell Numbers and Astrocyte Development in the Developing Retina. » *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (37): 8124-34.

Moizard, M. P., C. Billard, A. Toutain, F. Berret, N. Marmin, et C. Moraine. 1998. « Are Dp71 and Dp140 Brain Dystrophin Isoforms Related to Cognitive Impairment in Duchenne Muscular Dystrophy? » *American Journal of Medical Genetics* 80 (1): 32-41.

Moizard, M. P., A. Toutain, D. Fournier, F. Berret, M. Raynaud, C. Billard, C. Andres, et C. Moraine. 2000. « Severe Cognitive Impairment in DMD: Obvious Clinical Indication for Dp71 Isoform Point Mutation Screening. » *European Journal of Human Genetics: EJHG* 8 (7): 552-56.

Molofsky, Anna V., Robert Krencik, Robert Krenick, Erik M. Ullian, Erik Ullian, Hui-hsin Tsai, Benjamin Deneen, William D. Richardson, Ben A. Barres, et David H. Rowitch. 2012. « Astrocytes and Disease: A Neurodevelopmental Perspective. » *Genes & Development* 26 (9): 891-907.

Monaco, A. P., R. L. Neve, C. Colletti-Feener, C. J. Bertelson, D. M. Kurnit, et L. M. Kunkel. 1986. « Isolation of Candidate cDNAs for Portions of the Duchenne Muscular Dystrophy Gene. » *Nature* 323 (6089): 646-50.

Montanaro, F., S. Carbonetto, K. P. Campbell, et M. Lindenbaum. 1995. « Dystroglycan Expression in the Wild Type and Mdx Mouse Neural Retina: Synaptic Colocalization with Dystrophin, Dystrophin-Related Protein but Not Lamindoi:10.1002/jnr.490420411.

Mori, Fumihiko, Taiichi Hikichi, Junichi Takahashi, Taiji Nagaoka, et Akitoshi Yoshida. 2002. « Dysfunction of Active Transport of Blood-Retinal Barrier in Patients with Clinically Significant Macular Edema in Type 2 Diabetes. » *Diabetes Care* 25 (7): 1248-49.

Motulsky, Elie, Philippe Koch, Sarah Janssens, Maité Liénart, Anne-Marie Vanbellinghen, Nargis Bolaky, Chi-Chao Chan, et al. 2010. « Aquaporin Expression in Blood-Retinal Barrier Cells during Experimental Autoimmune Uveitis. » *Molecular Vision* 16: 602-10.

Muntoni, Francesco, Silvia Torelli, et Alessandra Ferlini. 2003. « Dystrophin and Mutations: One Gene, Several Proteins, Multiple Phenotypes. » *The Lancet. Neurology* 2 (12): 731-40.

Murakami, Tomoaki, Edward A. Felinski, et David A. Antonetti. 2009. « Occludin Phosphorylation and Ubiquitination Regulate Tight Junction Trafficking and Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Permeability. » *The Journal of Biological Chemistry* 284 (31): 21036-46.

Murakami, Tomoaki, Tiffany Frey, Chengmao Lin, et David A. Antonetti. 2012. « Protein

Kinase C β Phosphorylates Occludin Regulating Tight Junction Trafficking in Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Permeability in Vivo. » *Diabetes* 61 (6): 1573-83.

Nagai, Makiko, Diane B. Re, Tetsuya Nagata, Alcmène Chalazonitis, Thomas M. Jessell, Hynek Wichterle, et Serge Przedborski. 2007. « Astrocytes Expressing ALS-Linked Mutated SOD1 Release Factors Selectively Toxic to Motor Neurons. » *Nature Neuroscience* 10 (5): 615-22.

Nagelhus, E. A., M. L. Veruki, R. Torp, F. M. Haug, J. H. Laake, S. Nielsen, P. Agre, et O. P. Ottersen. 1998. « Aquaporin-4 Water Channel Protein in the Rat Retina and Optic Nerve: Polarized Expression in Müller Cells and Fibrous Astrocytes. » *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 18 (7): 2506-19.

Neely, J. D., M. Amiry-Moghaddam, O. P. Ottersen, S. C. Froehner, P. Agre, et M. E. Adams. 2001. « Syntrophin-Dependent Expression and Localization of Aquaporin-4 Water Channel Protein. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (24): 14108-13.

Newman, E. A. 1985. « Membrane Physiology of Retinal Glial (Müller) Cells. » *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 5 (8): 2225-39.

Newman, E. A. 1985. 1996. « Acid Efflux from Retinal Glial Cells Generated by Sodium Bicarbonate Cotransport. » *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16 (1): 159-68.

Newman, E. A. 1985. 2001. « Calcium Signaling in Retinal Glial Cells and Its Effect on Neuronal Activity. » *Progress in Brain Research* 132: 241-54.

Newman, E. A., D. A. Frambach, et L. L. Odette. 1984. « Control of Extracellular Potassium Levels by Retinal Glial Cell K⁺ Siphoning. » *Science (New York, N.Y.)* 225 (4667): 1174-75.

Newman, Eric A. 2003. « Glial Cell Inhibition of Neurons by Release of ATP. » *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23 (5): 1659-66.

Nicchia, G. P., B. Nico, L. M. A. Camassa, M. G. Mola, N. Loh, R. Dermietzel, D. C. Spray, M. Svelto, et A. Frigeri. 2004. « The Role of Aquaporin-4 in the Blood-Brain Barrier Development and Integrity: Studies in Animal and Cell Culture Models. » *Neuroscience* 129 (4): 935-45.

Nico, B., P. Corsi, R. Ria, E. Crivellato, A. Vacca, A. M. Roccaro, D. Mangieri, D. Ribatti, et L. Roncali. 2006. « Increased Matrix-Metalloproteinase-2 and Matrix-Metalloproteinase-9 Expression in the Brain of Dystrophic Mdx Mouse. » *Neuroscience* 140 (3): 835-48.

Nico, Beatrice, Patrizia Corsi, Angelo Vacca, Luisa Roncali, et Domenico Ribatti. 2002. « Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Expression in Mdx Mouse Brain. » *Brain Research* 953 (1-2): 12-16.

Nico, Beatrice, Antonio Frigeri, Grazia Paola Nicchia, Patrizia Corsi, Domenico Ribatti, Fabio Quondamatteo, Rainer Herken, et al. 2003. « Severe Alterations of Endothelial and Glial Cells in the Blood-Brain Barrier of Dystrophic Mdx Mice. » *Glia* 42 (3): 235-51.

- Nico, Beatrice, Roberto Tamma, Tiziana Annese, Domenica Mangieri, Annamaria De Luca, Patrizia Corsi, Vincenzo Benagiano, et al. 2010. « Glial Dystrophin-Associated Proteins, Laminin and Agrin, Are Downregulated in the Brain of Mdx Mouse. » *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 90 (11): 1645□60.
- Nico, B., A. Frigeri, G. P. Nicchia, F. Quondamatteo, R. Herken, M. Errede, D. Ribatti, M. Svelto, et L. Roncali. 2001. « Role of Aquaporin-4 Water Channel in the Development and Integrity of the Blood-Brain Barrier. » *Journal of Cell Science* 114 (Pt 7): 1297□1307.
- Nico, B., G. Paola Nicchia, A. Frigeri, P. Corsi, D. Mangieri, D. Ribatti, M. Svelto, et L. Roncali. 2004. « Altered Blood-Brain Barrier Development in Dystrophic MDX Mice. » *Neuroscience* 125 (4): 921□35.
- Nitta, Takehiro, Masaki Hata, Shimpei Gotoh, Yoshiteru Seo, Hiroyuki Sasaki, Nobuo Hashimoto, Mikio Furuse, et Shoichiro Tsukita. 2003. « Size-Selective Loosening of the Blood-Brain Barrier in Claudin-5-Deficient Mice. » *The Journal of Cell Biology* 161 (3): 653□60.
- Norenberg, M. D. 1987. « The Role of Astrocytes in Hepatic Encephalopathy. » *Neurochemical Pathology* 6 (1-2): 13□33.
- Orlova, A., I. N. Rybakova, E. Prochniewicz, D. D. Thomas, J. M. Ervasti, et E. H. Egelman. 2001. « Binding of Dystrophin's Tandem Calponin Homology Domain to F-Actin Is Modulated by Actin's Structure. » *Biophysical Journal* 80 (4): 1926□31.
- Otori, Y., S. Shimada, K. Tanaka, I. Ishimoto, Y. Tano, et M. Tohyama. 1994. « Marked Increase in Glutamate-Aspartate Transporter (GLAST/GluT-1) mRNA Following Transient Retinal Ischemia. » *Brain Research. Molecular Brain Research* 27 (2): 310□14.
- Ozawa, E. 1995. « [Dystrophin, dystrophin-associated protein and dystrophinopathy]. » *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi = Japanese Journal of Psychopharmacology* 15 (3): 289□93.
- Pannicke, T., W. Fischer, B. Biedermann, H. Schädlich, J. Grosche, F. Faude, P. Wiedemann, et al. 2000. « P2X7 Receptors in Müller Glial Cells from the Human Retina. » *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (16): 5965□72.
- Pannicke, Thomas, Andreas Bringmann, et Andreas Reichenbach. 2002. « Electrophysiological Characterization of Retinal Müller Glial Cells from Mouse during Postnatal Development: Comparison with Rabbit Cells. » *Glia* 38 (3): 268□72.
- Pannicke, Thomas, Ianors Iandiev, Antje Wurm, Ortrud Uckermann, Franziska vom Hagen, Andreas Reichenbach, Peter Wiedemann, Hans-Peter Hammes, et Andreas Bringmann. 2006. « Diabetes Alters Osmotic Swelling Characteristics and Membrane Conductance of Glial Cells in Rat Retina. » *Diabetes* 55 (3): 633□39.
- Paques, Michel, Ramin Tadayoni, Richard Sercombe, Pierre Laurent, Olivier Genevois, Alain Gaudric, et Eric Vicaut. 2003. « Structural and Hemodynamic Analysis of the Mouse Retinal Microcirculation. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44 (11): 4960□67.

- Pillers, D. A., D. E. Bulman, R. G. Weleber, D. A. Sigesmund, M. A. Musarella, B. R. Powell, W. H. Murphey, C. Westall, C. Panton, et L. E. Becker. 1993. « Dystrophin Expression in the Human Retina Is Required for Normal Function as Defined by Electroretinography. » *Nature Genetics* 4 (1): 82–86.
- Pinzón-Duarte, Germán, Gerard Daly, Yong N. Li, Manuel Koch, et William J. Brunken. 2010. « Defective Formation of the Inner Limiting Membrane in Laminin beta2- and gamma3-Null Mice Produces Retinal Dysplasia. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51 (3): 1773–82.
- Pow, D. V., et D. K. Crook. 1996. « Direct Immunocytochemical Evidence for the Transfer of Glutamine from Glial Cells to Neurons: Use of Specific Antibodies Directed against the D-Stereoisomers of Glutamate and Glutamine. » *Neuroscience* 70 (1): 295–302.
- Provis, J. M., T. Sandercoe, et A. E. Hendrickson. 2000. « Astrocytes and Blood Vessels Define the Foveal Rim during Primate Retinal Development. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41 (10): 2827–36.
- Qin, Song, Wenze Niu, Nida Iqbal, Derek K. Smith, et Chun-Li Zhang. 2014. « Orphan Nuclear Receptor TLX Regulates Astrogenesis by Modulating BMP Signaling. » *Frontiers in Neuroscience* 8: 74.
- Raff, M. C., L. E. Lillien, W. D. Richardson, J. F. Burne, et M. D. Noble. 1988. « Platelet-Derived Growth Factor from Astrocytes Drives the Clock That Times Oligodendrocyte Development in Culture. » *Nature* 333 (6173): 562–65.
- Rakic, Pasko. 2002. « Adult Neurogenesis in Mammals: An Identity Crisis. » *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22 (3): 614–18.
- Ransom, B. R., et H. Sontheimer. 1992. « The Neurophysiology of Glial Cells. » *Journal of Clinical Neurophysiology: Official Publication of the American Electroencephalographic Society* 9 (2): 224–51.
- Rapaport, D., O. Fuchs, U. Nudel, et D. Yaffe. 1992. « Expression of the Duchenne Muscular Dystrophy Gene Products in Embryonic Stem Cells and Their Differentiated Derivatives. » *The Journal of Biological Chemistry* 267 (30): 21289–92.
- Reichenbach, A., A. Henke, W. Eberhardt, W. Reichelt, et D. Dettmer. 1992. « K⁺ Ion Regulation in Retina. » *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 70 Suppl: S239–47.
- Renley, B. A., I. N. Rybakova, K. J. Amann, et J. M. Ervasti. 1998. « Dystrophin Binding to Nonmuscle Actin. » *Cell Motility and the Cytoskeleton* 41 (3): 264–70. d
- Renner, Nicole A., Hope A. Sansing, Fiona M. Inglis, Smriti Mehra, Deepak Kaushal, Andrew A. Lackner, et Andrew G. Maclean. 2013. « Transient Acidification and Subsequent Proinflammatory Cytokine Stimulation of Astrocytes Induce Distinct Activation Phenotypes. » *Journal of Cellular Physiology* 228 (6): 1284–94.

- Risau, W., A. Dingler, U. Albrecht, M. P. Dehouck, et R. Cecchelli. 1992. « Blood-Brain Barrier Pericytes Are the Main Source of Gamma-Glutamyltranspeptidase Activity in Brain Capillaries. » *Journal of Neurochemistry* 58 (2): 667-672.
- Romero, Ignacio A., Katrina Radewicz, Emmanuelle Jubin, C. Charles Michel, John Greenwood, Pierre-Olivier Couraud, et Peter Adamson. 2003. « Changes in Cytoskeletal and Tight Junctional Proteins Correlate with Decreased Permeability Induced by Dexamethasone in Cultured Rat Brain Endothelial Cells. » *Neuroscience Letters* 344 (2): 112-116.
- Rosman, N. P., et B. A. Kakulas. 1966. « Mental Deficiency Associated with Muscular Dystrophy. A Neuropathological Study. » *Brain: A Journal of Neurology* 89 (4): 769-788.
- Rothstein, J. D., M. Dykes-Hoberg, C. A. Pardo, L. A. Bristol, L. Jin, R. W. Kuncl, Y. Kanai, et al. 1996. « Knockout of Glutamate Transporters Reveals a Major Role for Astroglial Transport in Excitotoxicity and Clearance of Glutamate. » *Neuron* 16 (3): 675-686.
- Runkle, E. Aaron, et David A. Antonetti. 2011. « The Blood-Retinal Barrier: Structure and Functional Significance. » *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 686: 133-148.
- Sagaties, M. J., G. Raviola, S. Schaeffer, et C. Miller. 1987. « The Structural Basis of the Inner Blood-Retina Barrier in the Eye of Macaca Mulatta. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 28 (12): 2000-2014.
- Sarig, R., V. Mezger-Lallemand, I. Gitelman, C. Davis, O. Fuchs, D. Yaffe, et U. Nudel. 1999. « Targeted Inactivation of Dp71, the Major Non-Muscle Product of the DMD Gene: Differential Activity of the Dp71 Promoter during Development. » *Human Molecular Genetics* 8 (1): 1-10.
- Sarthy, Vijay P., Leonardo Pignataro, Thomas Pannicke, Michael Weick, Andreas Reichenbach, Takayuki Harada, Kohichi Tanaka, et Robert Marc. 2005. « Glutamate Transport by Retinal Muller Cells in Glutamate/aspartate Transporter-Knockout Mice. » *Glia* 49 (2): 184-196.
- Schett, G., K. Redlich, Q. Xu, P. Bizan, M. Gröger, M. Tohidast-Akrad, H. Kiener, J. Smolen, et G. Steiner. 1998. « Enhanced Expression of Heat Shock Protein 70 (hsp70) and Heat Shock Factor 1 (HSF1) Activation in Rheumatoid Arthritis Synovial Tissue. Differential Regulation of hsp70 Expression and hsf1 Activation in Synovial Fibroblasts by Proinflammatory Cytokines, Shear Stress, and Antiinflammatory Drugs. » *The Journal of Clinical Investigation* 102 (2): 302-311.
- Schnitzer, J. 1988. « Immunocytochemical Studies on the Development of Astrocytes, Müller (glial) Cells, and Oligodendrocytes in the Rabbit Retina. » *Brain Research. Developmental Brain Research* 44 (1): 59-72.
- Schousboe, A. 1981. « Transport and Metabolism of Glutamate and GABA in Neurons Are Glial Cells. » *International Review of Neurobiology* 22: 1-45.
- Scott, Andrew, Michael B. Powner, Pranita Gandhi, Claire Clarkin, David H. Gutmann, Randall S. Johnson, Napoleone Ferrara, et Marcus Fruttiger. 2010. « Astrocyte-Derived Vascular Endothelial Growth Factor Stabilizes Vessels in the Developing Retinal Vasculature. » *PloS One* 5 (7): e11863.

- Sene, Abdoulaye, Ramin Tadayoni, Thomas Pannicke, Antje Wurm, Brahim El Mathari, Romain Benard, Michel Joseph Roux, et al. 2009. « Functional Implication of Dp71 in Osmoregulation and Vascular Permeability of the Retina. » *PloS One* 4 (10): e7329. doi:10.
- Shanker, G., J. W. Allen, L. A. Mutkus, et M. Aschner. 2001. « The Uptake of Cysteine in Cultured Primary Astrocytes and Neurons. » *Brain Research* 902 (2): 156□63.
- Shen, Weiyong, Shiyong Li, Sook Hyun Chung, et Mark C. Gillies. 2010. « Retinal Vascular Changes after Glial Disruption in Rats. » *Journal of Neuroscience Research* 88 (7): 1485□99.
- Sidoryk-Wegrzynowicz, Marta, Michal Wegrzynowicz, Eunsook Lee, Aaron B. Bowman, et Michael Aschner. 2011. « Role of Astrocytes in Brain Function and Disease. » *Toxicologic Pathology* 39 (1): 115□23.
- Skatchkov, S. N., M. J. Eaton, Y. M. Shuba, Y. V. Kucheryavykh, C. Derst, R. W. Veh, A. Wurm, et al. 2006. « Tandem-Pore Domain Potassium Channels Are Functionally Expressed in Retinal (Müller) Glial Cells. » *Glia* 53 (3): 266□76.
- Snook, Eric R., Jeanne M. Fisher-Perkins, Hope A. Sansing, Kim M. Lee, Xavier Alvarez, Andrew G. MacLean, Karin E. Peterson, Andrew A. Lackner, et Bruce A. Bunnell. 2014. « Innate Immune Activation in the Pathogenesis of a Murine Model of Globoid Cell Leukodystrophy. » *The American Journal of Pathology* 184 (2): 382□96.
- Staurengi, Giovanni, Srinivas Satta, Usha Chakravarthy, Richard F. Spaide, et International Nomenclature for Optical Coherence Tomography (IN•OCT) Panel. 2014. « Proposed Lexicon for Anatomic Landmarks in Normal Posterior Segment Spectral-Domain Optical Coherence Tomography: The IN•OCT Consensus. » *Ophthalmology* 121 (8): 1572□78.
- Steinberg, R. H., B. Oakley, et G. Niemeyer. 1980. « Light-Evoked Changes in [K⁺]_o in Retina of Intact Cat Eye. » *Journal of Neurophysiology* 44 (5): 897□921.
- Stenzel, Denise, Andrea Lundkvist, Dominique Sauvaget, Marta Busse, Mariona Graupera, Arjan van der Flier, Errol S. Wijelath, et al. 2011. « Integrin-Dependent and -Independent Functions of Astrocytic Fibronectin in Retinal Angiogenesis. » *Development (Cambridge, England)* 138 (20): 4451□63.
- Stevenson, B. R., J. D. Siliciano, M. S. Mooseker, et D. A. Goodenough. 1986. « Identification of ZO-1: A High Molecular Weight Polypeptide Associated with the Tight Junction (zonula Occludens) in a Variety of Epithelia. » *The Journal of Cell Biology* 103 (3): 755□66.
- Storck, T., S. Schulte, K. Hofmann, et W. Stoffel. 1992. « Structure, Expression, and Functional Analysis of a Na⁺-Dependent Glutamate/aspartate Transporter from Rat Brain. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (22): 10955□59.
- Sun, D., C. Lytle, et M. E. O'Donnell. 1997. « IL-6 Secreted by Astroglial Cells Regulates Na-K-Cl Cotransport in Brain Microvessel Endothelial Cells. » *The American Journal of Physiology* 272 (6 Pt 1): C1829□35.

- Szabó, Adrienn, Veronika Jancsik, Dominique Mornet, et Mihály Kálmán. 2004. « Immunofluorescence Mapping of Dystrophin in the Rat Brain: Astrocytes Contain the Splice Variant Dp71f, but This Is Confined to Subpopulations. » *Anatomy and Embryology* 208 (6): 463–477.
- Tadayoni, Ramin, Alvaro Rendon, L. E. Soria-Jasso, et Bulmaro Cisneros. 2012. « Dystrophin Dp71: The Smallest but Multifunctional Product of the Duchenne Muscular Dystrophy Gene. » *Molecular Neurobiology* 45 (1): 43–60.
- Tamura, Hiroshi, Kazuaki Miyamoto, Junichi Kiryu, Shinsuke Miyahara, Hideto Katsuta, Fumitaka Hirose, Kunihiro Musashi, et Nagahisa Yoshimura. 2005. « Intravitreal Injection of Corticosteroid Attenuates Leukostasis and Vascular Leakage in Experimental Diabetic Retina. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46 (4): 1440–44.
- Tan, Jin, Sichuang Tan, Hexin Zheng, Meidong Liu, Guangwen Chen, Huali Zhang, Kangkai Wang, Sipin Tan, Jiang Zhou, et Xian-zhong Xiao. 2015. « HSF1 Functions as a Transcription Regulator for Dp71 Expression. » *Cell Stress & Chaperones* 20 (2): 371–79.
- Theodosis, Dionysia T., Dominique A. Poulain, et Stéphane H. R. Oliet. 2008. « Activity-Dependent Structural and Functional Plasticity of Astrocyte-Neuron Interactions. » *Physiological Reviews* 88 (3): 983–1008.
- Toda, Ryotaro, Kouichi Kawazu, Masanobu Oyabu, Tatsuya Miyazaki, et Yoshiaki Kiuchi. 2011. « Comparison of Drug Permeabilities across the Blood-Retinal Barrier, Blood-Aqueous Humor Barrier, and Blood-Brain Barrier. » *Journal of Pharmaceutical Sciences* 100 (9): 3904–11.
- Tout, S., T. Chan-Ling, H. Holländer, et J. Stone. 1993. « The Role of Müller Cells in the Formation of the Blood-Retinal Barrier. » *Neuroscience* 55 (1): 291–301.
- Tsacopoulos, M., et P. J. Magistretti. 1996. « Metabolic Coupling between Glia and Neurons. » *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16 (3): 877–85.
- Tyler, Kenneth L. 2003. « Origins and Early Descriptions of “Duchenne Muscular Dystrophy”. » *Muscle & Nerve* 28 (4): 402–22.
- Uckermann, Ortrud, Franziska Kutzera, Antje Wolf, Thomas Pannicke, Andreas Reichenbach, Peter Wiedemann, Sebastian Wolf, et Andreas Bringmann. 2005. « The Glucocorticoid Triamcinolone Acetonide Inhibits Osmotic Swelling of Retinal Glial Cells via Stimulation of Endogenous Adenosine Signaling. » *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 315 (3): 1036–45.
- Vacca, Ophélie, Marie Darche, David V. Schaffer, John G. Flannery, José-Alain Sahel, Alvaro Rendon, et Deniz Dalkara. 2014. « AAV-Mediated Gene Delivery in Dp71-Null Mouse Model with Compromised Barriers. » *Glia* 62 (3): 468–76. doi:10.1002/glia.22617.
- van Deutekom, Judith C. T., et Gert-Jan B. van Ommen. 2003. « Advances in Duchenne Muscular Dystrophy Gene Therapy. » *Nature Reviews. Genetics* 4 (10): 774–83.

- Varma, Rohit, Neil M. Bressler, Quan V. Doan, Mark Danese, Chantal M. Dolan, Abraham Lee, et Adam Turpcu. 2015. « Visual Impairment and Blindness Avoided with Ranibizumab in Hispanic and Non-Hispanic Whites with Diabetic Macular Edema in the United States. » *Ophthalmology* 122 (5): 982-989.
- Waite, Adrian, Susan C. Brown, et Derek J. Blake. 2012. « The Dystrophin-Glycoprotein Complex in Brain Development and Disease. » *Trends in Neurosciences* 35 (8): 487-496.
- Walz, W. 1989. « Role of Glial Cells in the Regulation of the Brain Ion Microenvironment. » *Progress in Neurobiology* 33 (4): 309-333.
- Wang, Ai Ling, Albert C. H. Yu, Lok Ting Lau, Chong Lee, Le Meng Wu, Xiu'An Zhu, et Mark O. M. Tso. 2005. « Minocycline Inhibits LPS-Induced Retinal Microglia Activation. » *Neurochemistry International* 47 (1-2): 152-158.
- Wang, Kang, Yanling Wang, Lixin Gao, Xinmin Li, Mingming Li, et Jianyou Guo. 2008. « Dexamethasone Inhibits Leukocyte Accumulation and Vascular Permeability in Retina of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats via Reducing Vascular Endothelial Growth Factor and Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression. » *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 31 (8): 1541-1546.
- Wang, X. F., et M. S. Cynader. 2000. « Astrocytes Provide Cysteine to Neurons by Releasing Glutathione. » *Journal of Neurochemistry* 74 (4): 1434-1442.
- Watanabe, T., et M. C. Raff. 1988. « Retinal Astrocytes Are Immigrants from the Optic Nerve. » *Nature* 332 (6167): 834-837.
- West, Heloise, William D. Richardson, et Marcus Fruttiger. 2005. « Stabilization of the Retinal Vascular Network by Reciprocal Feedback between Blood Vessels and Astrocytes. » *Development (Cambridge, England)* 132 (8): 1855-1862.
- Willis, Colin L., Lopa Leach, Garry J. Clarke, Christopher C. Nolan, et David E. Ray. 2004. « Reversible Disruption of Tight Junction Complexes in the Rat Blood-Brain Barrier, Following Transitory Focal Astrocyte Loss. » *Glia* 48 (1): 1-13.
- Willis, Colin L., Christopher C. Nolan, Sharon N. Reith, Timothy Lister, Malcolm J. W. Prior, Christopher J. Guerin, George Mavroudis, et David E. Ray. 2004. « Focal Astrocyte Loss Is Followed by Microvascular Damage, with Subsequent Repair of the Blood-Brain Barrier in the Apparent Absence of Direct Astrocytic Contact. » *Glia* 45 (4): 325-337.
- Wolburg, Hartwig, et Andrea Lippoldt. 2002. « Tight Junctions of the Blood-Brain Barrier: Development, Composition and Regulation. » *Vascular Pharmacology* 38 (6): 323-337.
- Wolburg, H., J. Neuhaus, U. Kniessel, B. Krauss, E. M. Schmid, M. Ocalan, C. Farrell, et W. Risau. 1994. « Modulation of Tight Junction Structure in Blood-Brain Barrier Endothelial Cells. Effects of Tissue Culture, Second Messengers and Cocultured Astrocytes. » *Journal of Cell Science* 107 (Pt 5) (mai): 1347-1357.
- Xu, Q., T. Qaum, et A. P. Adamis. 2001. « Sensitive Blood-Retinal Barrier Breakdown Quantitation Using Evans Blue. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42 (3):

789□94.

Yamada, E. 1969. « Some Structural Features of the Fovea Centralis in the Human Retina. » *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)* 82 (2): 151□59.

Yanoff, M., B. S. Fine, A. J. Brucker, et R. C. Eagle. 1984. « Pathology of Human Cystoid Macular Edema. » *Survey of Ophthalmology* 28 Suppl (mai): 505□11.

Yao, Huanling, Tianshi Wang, Jiexin Deng, Ding Liu, Xiaofei Li, et Jinbo Deng. 2014. « The Development of Blood-Retinal Barrier during the Interaction of Astrocytes with Vascular Wall Cells. » *Neural Regeneration Research* 9 (10): 1047□54.

Zettl, K. S., M. D. Sjaastad, P. M. Riskin, G. Parry, T. E. Machen, et G. L. Firestone. 1992. « Glucocorticoid-Induced Formation of Tight Junctions in Mouse Mammary Epithelial Cells in Vitro. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (19): 9069□73.

Zhao, Min, Elodie Bousquet, Fatemeh Valamanesh, Nicolette Farman, Jean-Claude Jeanny, Frederic Jaisser, et Francine F. Behar-Cohen. 2011. « Differential Regulations of AQP4 and Kir4.1 by Triamcinolone Acetonide and Dexamethasone in the Healthy and Inflamed Retina. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52 (9): 6340□47.

Zheng, Xiao, Ping-hua Li, et Sheng-fang Song. 2008. « [Expression of glial fibrillary acidic protein in retina of rats in acute experimental autoimmune encephalomyelitis]. » *Sichuan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban = Journal of Sichuan University. Medical Science Edition* 39 (5): 719□22.

Zhong, Y., K. Enomoto, H. Isomura, N. Sawada, T. Minase, M. Oyamada, Y. Konishi, et M. Mori. 1994. « Localization of the 7H6 Antigen at Tight Junctions Correlates with the Paracellular Barrier Function of MDCK Cells. » *Experimental Cell Research* 214 (2): 614□20.

Résumé

La compréhension des mécanismes intervenant au cours du développement vasculaire de la rétine et des phénomènes de rupture de la barrière hémato rétinienne (BHR) sont indispensables car permettent une approche physiopathologique et thérapeutique de nombreuses maladies rétinienne, telles que la rétinopathie diabétique, la rétinopathie des prématurés, et les oedèmes maculaires diabétiques, ou secondaires à des occlusions veineuses et uvéites qui constituent les principales causes de malvoyance ou cécité dans le monde.

La dystrophine Dp71, issue du gène DMD impliqué dans la dystrophie musculaire de Duchenne, a été étudiée dans cet objectif car son absence est à l'origine de modifications de l'homéostasie rétinienne et d'une rupture de la BHR interne chez la souris KoDp71.

A partir des résultats antérieurs de notre équipe, ayant permis d'identifier la dystrophine Dp71 au sein d'un complexe sous-membranaire impliqué dans les phénomènes de positionnement péri-vasculaire des principaux canaux aqueux et potassiques de la cellule gliale de Müller (CGM) assurant le maintien de l'homéostasie, nous avons émis l'hypothèse de l'implication de cette protéine au cours du développement vasculaire de la rétine. Etant bien établi dans la littérature, que les astrocytes rétiens jouent un rôle majeur de guidage des cellules endothéliales durant le développement vasculaire, nous nous sommes particulièrement intéressés à ces cellules. Nous avons ainsi mis en évidence une localisation rétinienne jusque-là méconnue de la Dp71 au sein des astrocytes rétiens. Nous avons également étudié l'effet *in vivo* de l'absence de Dp71, sur le développement vasculaire et observé une plus faible densité et une morphologie astrocytaire différente comparativement aux souris contrôles, à l'origine d'un développement vasculaire retardé. Compte tenu de la spécificité du réseau vasculaire rétinien dont l'étanchéité des parois est maintenue en partie par les pieds des CGM et des astrocytes, nous avons émis l'hypothèse, étant donné l'implication de la Dp71 dans la stabilisation de ces cellules, d'une altération de cette protéine dans les phénomènes de rupture de la BHR. Ainsi dans un modèle transitoire de rupture de la BHR *in vivo* relativement « pur », sans ischémie ni injection de VEGF, nous avons observé une diminution de l'expression de la dystrophine Dp71 ainsi que du canal aqueux AQP4 et une délocalisation du canal potassique Kir4.1 dans les CGM. L'injection intra-vitréenne de Dexaméthasone dans ce modèle a permis de prévenir les modifications d'expression et de localisation de ces protéines. En effet, nous montrons également que la Dystrophine Dp71 est régulée *in vitro* par la Dexaméthasone en partie par surexpression de l'un de ses facteurs de transcription HSF1.

Nous apportons ici des preuves, que la protéine Dp71, protéine du cytosquelette associée à la membrane est exprimée au sein de la rétine, non seulement dans les CGM mais également dans les astrocytes, et est impliquée dans le maintien de la densité et de la morphologie astrocytaire servant de patron au développement vasculaire rétinien normal. Cette protéine est également associée au maintien de l'homéostasie rétinienne via des canaux aqueux et potassiques trans-membranaires au niveau des cellules macrogliales rétiniennes. Nous montrons également, qu'en conditions pathologiques, la Dexaméthasone semble réguler cette protéine. Ces découvertes constituent un premier pas vers une approche neuroprotectrice de la rétine en conditions pathologiques, par une action thérapeutique ciblée sur les cellules macrogliales rétiniennes.

Summary

Understanding vascular development and blood retinal barrier (BRB) breakdown pathophysiology is very important in order to treat retinal diseases, such as diabetic retinopathy, macular edema after vein occlusions or uveitis, that are leading causes of blindness worldwide.

Dp71, is a dystrophin produced from DMD gene, and involved in Duchenne muscular dystrophy. Dp71 is involved in retinal homeostasis and maintenance of BRB.

We have previously shown that Dp71, part of a complex called Dystrophin associated protein, is involved in the localization of aqueous and potassic channels in Muller glial cell (MGC), particularly around blood vessels, allowing maintenance of retinal homeostasis. We hypothesized that this protein plays a key role during retinal vascular development based on its perivascular localization.

Based on the knowledge that growing retinal vessels migrate on an astrocyte template during development, we highlighted the expression of Dp71 in retinal astrocytes. In absence of Dp71, *in vivo*, we observed a lower density and a different morphology of retinal astrocytes compared to control retina in mice, responsible for a delayed vascular development.

Due to the role of barrier of the retinal vascular network, insured also by astrocytes, we studied a model of post surgical BRB breakdown and found a decreased of Dp71 protein expression associated with Kir4.1 delocalization and AQP4 decrease in MGC. Intravitreal Dexamethasone prevents these protein expression changes.

We suggest here that the membrane associated cytoskeletal protein, Dp71, expressed in astrocytes is involved in the maintenance of astrocytes density and morphology necessary as a template for retinal vascular development. This protein insure also a key role in retinal homeostasis by localizing and maintaining aqueous and potassic channels in MGC. Moreover when this protein is altered, Dexamethasone seems to be capable to promote Dp71 expression which could have wide clinical implications in retinal diseases treatment and the target for retinal neuroprotection under pathological conditions seems to be the macroglial cells.