



**HAL**  
open science

# Physiopathologie des dystrophies rétinienne héréditaires associées aux variants pathogènes du gène **IMPG1**

Olivier Guillaume

► **To cite this version:**

Olivier Guillaume. Physiopathologie des dystrophies rétinienne héréditaires associées aux variants pathogènes du gène IMPG1. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2020. Français. NNT : 2020MONTT021 . tel-03144091

**HAL Id: tel-03144091**

**<https://theses.hal.science/tel-03144091>**

Submitted on 17 Feb 2021

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

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

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Unité de recherche U1051

## Physiopathologie des dystrophies rétiniennes héréditaires associées au gène *IMPG1*

Présentée par Guillaume OLIVIER  
Le 28 Septembre 2020

Sous la direction de Agnès MULLER  
et Gaël MANES

Devant le jury composé de

David GENEVIEVE, P.U-P.H, CHU de Montpellier

Isabelle AUDO, P.U-P.H, Institut de la vision

François PAQUET-DURAND, P.U, Institute for Ophthalmic Research University of Tübingen

Claire-Marie DHAENENS, M.C.U-P.H, CHU de Lille

Isabelle MEUNIER, P.A-P.H, CHU de Montpellier

Federica BERTASO, C.R, INSERM U1138

Agnès MULLER, P.U, Université de Montpellier

Gaël MANES, C.R, Université de Montpellier

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Invitée

Invitée

Directrice de thèse

Co-encadrant de thèse



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER

## REMERCIEMENTS:

J'aimerais tout d'abord adresser mes remerciements à l'association Valentin HAÛY et son président Monsieur Jean-Jacques LAFARGE ainsi qu'à l'association SOS rétinite présidée par Madame Monique ROUX. Leur soutien financier a été le prérequis à l'aboutissement de ces 3 années de recherche. Ces associations apportent à la recherche, un soutien indispensable aux scientifiques depuis de très longues années.

Je remercie tous les membres de mon jury : des rapporteurs jusqu'aux examinateurs !!! Merci au Professeur David GENEVIEVE de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Je le remercie également, avec le Docteur Federica BERTASO, pour m'avoir suivi et conseillé durant ces 3 longues années.

Bien sûr, un grand merci à toi Gaël, pour m'avoir encadré au quotidien et transmis ta passion pour la recherche, l'ARVO 2019 à Vancouver restera gravé dans ma mémoire (plus que la soirée Phoenix Research...). Merci à Agnès, d'avoir répondu présent à chacun de mes besoins pour le déroulement de ma thèse.

Merci à toutes les personnes de l'Institut des Neurosciences de Montpellier et à son directeur Jean-Luc PUEL de m'avoir accueilli ces 3 années. Un merci aux plateaux techniques : Montpellier Ressources Imagerie (MRI), le Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier (RHEM), le plateau de microscopie électronique (COMET) et une attention particulière au personnel de l'animalerie de l'INM qui a beaucoup œuvré pour la gestion de la lignée murine *Impg1<sup>-/-</sup>*. Ce fut très enrichissant et agréable de travailler avec eux. Je remercie bien chaleureusement l'intégralité de l'équipe vision, ils m'ont tous beaucoup appris. Merci pour leur temps, leur aide, leur science, leur disponibilité et leur goûter. Un merci plus personnel à :

Professeur PhiPhi, pour ces longues conversations scientifiques, son expérience, son savoir. Tout cela à travers le placo qui sépare nos bureaux, ou devant le magret de canard sauce aux cèpes qu'on nous servait à la cantine Gui de Chauliac. Merci pour ces parties de pétanque du Vendredi au boulodrome Saint-Eloi avec Mélanie, petit GUILLOU, Ervan et Jérémy.

Merci à Manu, pour son chaleureux accueil au sein de son bureau, toutes ces discussions scientifiques et ces débats à refaire le monde 3 ans durant. J'espère le meilleur pour la suite de son avenir professionnel (2020 semble bien parti et j'en suis content).

Merci à petit GUILLOU pour sa culture (sportive), pour ces repas en tête à tête mais aussi pour son aide dans la maîtrise de l'HPLC-UV.

Merci à QUILES, pour ces ragots dont elle-seule en a le secret, ragots élaborés pendant que je transfectais les HEK magique de PhiPhi dans le L1 et durant les pauses café.

Merci à la team mots fléchés, avec qui il était difficilement concevable de démarrer un aprem sans « se péter une grille » (Sylvie, Jérémy et les autres). Cécile pour ta réactivité dans mes commandes

d'oligonucléotides, malgré les anciennes versions du fichier Excel (et pour tes présences lors de mes comités individuels de suivi de thèse). Merci à RichRich, pour ses qualités futsalistiques (et accessoirement informatiques).

Marie merci pour ton aide, ta pédagogie et ta connaissance, notamment dans le monde très fermé de la C57Bl/6J. A Audrey pour sa bonne humeur au quotidien ! A Vicky pour son humanisme. Merci à Mehdi et Ervan pour l'aide apportée au cours de leur stage.

J'espère pouvoir échanger des nouvelles avec chacun dans le futur, un grand merci pour tout !

Je remercie également ma famille, et notamment mon père qui m'a toujours inculqué les valeurs de l'effort et du sacrifice : indispensables au parcours universitaire.

Merci à mon neveu, capable de venir m'éteindre mon ordinateur pendant ma rédaction, à l'âge de 2 ans, ça m'aura fait passer de bons moments.

Merci à ma dulcinée Magali PICARD, que je cite dans ces remerciements pour la simple et bonne raison que ça m'aurait valu une séance de bouderie de 48h de ne pas le faire...

Merci à Cedric ODILLE pour les coups de fil hebdomadaire me permettant de relativiser sur la vie.

Merci aux Bomberes et au groupe « Prends ta sieste » pour les moments de loisir et de rigolade, que ça soit au café de la place de Générac ou au Mexicana.

Un grand regret de n'avoir pu faire lire ce manuscrit à Cyril, parti beaucoup trop tôt, nous laissant un gros manque à ton frère ainsi qu'à moi.

Pour terminer, je tiens à rendre hommage au Professeur Christian HAMEL, un brillant scientifique et ophtalmologiste qui fut mon directeur de thèse et qui ne pourra lire le manuscrit de son dernier thésard.

*En mémoire à mon directeur de thèse le Professeur Christian HAMEL*

## Publications et présentations lors de conférences internationales :

### Liste de publications :

#### « Pathogenic variants in *IMPG1* cause autosomal dominant and autosomal recessive retinitis pigmentosa »

Guillaume Olivier, Xavier Zanlonghi, Carmen Ayuso, Ghylène Le Meur, Claire-Marie Dhaenens, Graeme Black, SanneVerbakel, Hélène Naacke, Sophie Naudion, Carel Hoyng, Daniela Intartaglia, Béatrice Bocquet, Audrey Sénéchal, Sandro Banfi, Frans Cremers, Agnès Muller, Christian P. Hamel, Ivan Conte, Isabelle Meunier, Gaël Manes.

*Journal of Medical Genetics -2020-107150.R1*

#### « *Impg1* is essential for photoreceptor survival by interplaying between the interphotoreceptor matrix and the retinal pigment epithelium »

Guillaume Olivier, Philippe Brabet, Melanie Quiles, Laurent Guillou, Emmanuelle Sarzi, Nelly Pirot, Morgane Broyon, Ervan Andreo, Isabelle Meunier, Agnès Muller, Christian P. Hamel<sup>†1</sup>, and Gaël Manes

*En soumission*

#### « Novel missense mutations in *PRPF6* cause autosomal dominant retinitis pigmentosa with incomplete penetrance and impairment of PRPF6 protein localization within the nucleus »

Guillaume Olivier, Béatrice Bocquet, Carlo Rivolta, Gaël Manes.

*En soumission*

### Résumés de conférences internationales :

#### « Mutations in *IMPG1* cause autosomal dominant and recessive retinitis pigmentosa »

Gaël Manes, Xavier Zanlonghi, Carmen Ayuso, Graeme Black, Guillaume Olivier, Mehdi Sekssaoui, Audrey Sénéchal, Béatrice Bocquet, Isabelle Meunier, Christian P. Hamel.

*ARVO 2018 - Hawai – Etats Unis (Poster #2322 – B0311)*

#### « *Impg1* and *Impg2* knock down analysis in the development of medaka fish photoreceptors »

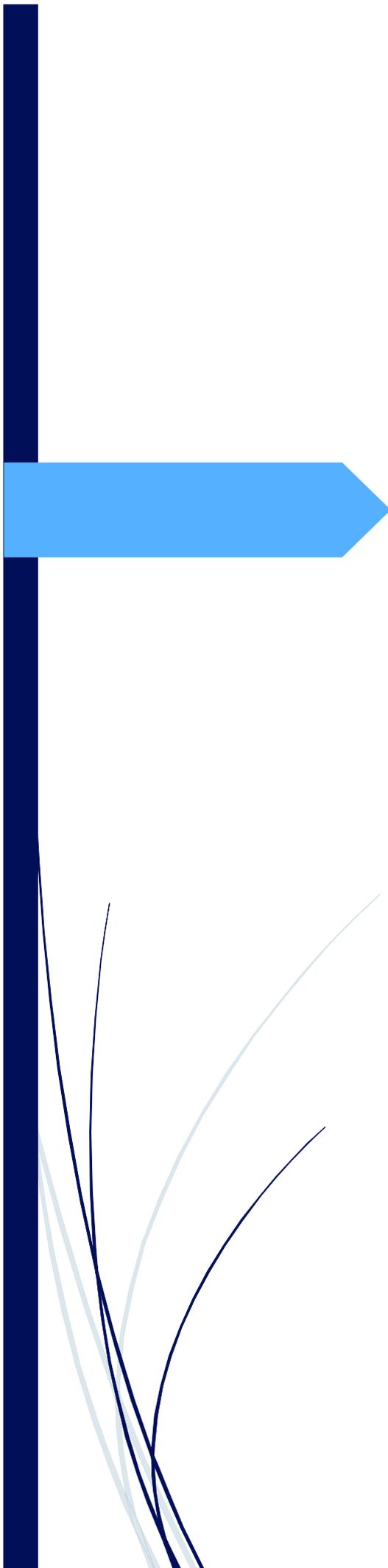
Guillaume Olivier, Daniela intartaglia, Chantal Cazevieille, Francesco Salierno, Sandro Banfi, Agnès Müller, Isabelle Meunier, Ivan Conte, Gaël Manes.

*ARVO 2019 - Vancouver – Canada (Poster #3114 – A0505)*

#### « Novel missense mutations in *PRPF6* cause autosomal dominant retinitis pigmentosa »

Guillaume Olivier, Béatrice Bocquet, Carlo Rivolta, Gaël Manes.

*ARVO 2020 - Baltimore– Etats Unis (Poster #2401 - A0069)*



# Tables des matières

REMERCIEMENTS:.....	2
Tables des matières .....	6
Table des illustrations:.....	9
Abréviations: .....	10
Préambule:.....	12
ETAT DE L'ART .....	13
<b>CHAPITRE 1 – LE SYSTEME VISUEL .....</b>	<b>14</b>
1.1 LES TUNIQUE OCULAIRES .....	16
1.1.1 La neurorétine .....	18
1.1.2 Le photorécepteur (PR).....	21
1.1.3 Les spécificités des bâtonnets .....	22
1.1.4 Les spécificités des cônes .....	22
1.1.5 Répartition spatiale des photorécepteurs .....	24
1.2 EPITHELIUM PIGMENTAIRE RETINIEN.....	25
1.2.1 Cascade de phototransduction.....	27
1.2.2 Le cycle des rétinoïdes .....	30
<b>CHAPITRE 2 – LA MATRICE INTERPHOTORECEPTRICE .....</b>	<b>33</b>
2.1 COMPOSITION ET STRUCTURE .....	33
2.1.1 Caractérisation de la matrice interphotoréceptrice .....	33
2.1.2 Les Glycosaminoglycanes.....	35
2.1.3 Les Protéoglycanes .....	36
2.1.4 Les Glycoprotéines.....	36
2.2 LES FONCTIONS DE LA MATRICE INTERPHOTORECEPTRICE.....	38
2.2.1 L'adhésion .....	38
2.2.2 La circulation des nutriments et de l'oxygène.....	39
2.2.3 La phagocytose .....	40
<b>CHAPITRE 3 – LES DYSTROPHIES RETINIENNES HEREDITAIRES NON SYNDROMIQUES .....</b>	<b>42</b>
3.1 LES DYSTROPHIES RETINIENNES HEREDITAIRES A ATTEINTE PERIPHERIQUE .....	44
3.1.1 La rétinite pigmentaire.....	44
3.1.2 La dystrophie cônes bâtonnets (rétinite pigmentaire inverse) .....	46
3.1.3 L'amaurose congénitale de Leber (rétinite pigmentaire congénitale) .....	47
3.2 LES DYSTROPHIES RETINIENNES HEREDITAIRES MACULAIRES.....	49

3.2.1	Les dystrophies maculaires sans dépôt vitellin .....	50
3.2.1.1	La dystrophie maculaire lié à l'âge (DMLA), hérédité complexe .....	50
3.2.1.2	La maladie de Stargardt (dystrophie maculaire à hérédité mendélienne) .....	52
3.2.1.4	La dystrophie maculaire de la Caroline du Nord .....	55
3.2.2	Les dystrophies maculaires héréditaires avec dépôts vitellins autofluorescents .....	57
3.2.2.1	La dystrophie maculaire de Best.....	59
3.2.2.2	La dystrophie maculaire vitelliforme adulte liée au gène PRPH2.....	62
3.2.2.3	La dystrophie maculaire vitelliforme adulte liée au gène IMPG1 .....	66
3.2.2.4	La dystrophie maculaire vitelliforme adulte liée au gène IMPG2 .....	69
<b>PROJET DE THESE .....</b>		<b>72</b>
<b>RESULTATS.....</b>		<b>74</b>
<b>I : Mutations du gène <i>IMPG1</i> impliquées dans des rétinites pigmentaires autosomiques dominantes et récessives.....</b>		<b>75</b>
I.1:	Introduction .....	75
I.2:	Résultats .....	76
I.3:	Discussion .....	115
<b>II : Phénotypage du modèle murin <i>Impg1-KO</i> .....</b>		<b>118</b>
II.1:	Introduction .....	118
II.2:	Résultats .....	119
II.3:	Discussion .....	142
<b>Discussion Générale et Perspectives .....</b>		<b>145</b>
<b>REFERENCES .....</b>		<b>154</b>

## Table des illustrations:

Figure 1: Anatomie de l'œil humain adulte .....	17
Figure 2: Organisation laminaire de la rétine humaine .....	20
Figure 3: Les photorécepteurs .....	21
Figure 4: Spectre d'absorption des différentes opsines .....	23
Figure 5: Densité des cônes et des bâtonnets au sein de la rétine humaine.....	24
Figure 6: La cellule de l'épithélium pigmentaire rétinien .....	26
Figure 7: Cascade de la phototransduction .....	28
Figure 8: Le cycle visuel.....	30
Figure 9: Le cycle des rétinoïdes des cônes .....	32
Figure 10: Micrographie à fluorescence de rétines de différentes espèces .....	34
Figure 11: Structure générale d'un protéoglycane.....	36
Figure 12: Schéma de la matrice interphotoréceptrice .....	37
Figure 13: Apport du glucose et de l'oxygène aux photorécepteurs .....	39
Figure 14: Fréquence des dystrophies héréditaires (centre de référence de Montpellier) .....	43
Figure 15: Phénotype classique de rétinite pigmentaire .....	45
Figure 16: hétérogénéité génétique de l'amaurose congénitale de Leber.....	48
Figure 17: Formes de la dégénérescence maculaire lié à l'âge.....	51
Figure 18: Dystrophie maculaire de Stargardt .....	54
Figure 19: Dystrophie maculaire de la Caroline du Nord.....	56
Figure 20: Evolution des différents stades associés à des lésions vitelliformes .....	58
Figure 21: Structure de la Bestrophine-1 humaine .....	60
Figure 22: Transport trans-épithélial.....	61
Figure 23: Domaines fonctionnels et mutations de la périphérine.....	63
Figure 24: Localisation de la périphérine au sein des disques des PR .....	64
Figure 25: Modèle murin Prph2 (30 jours).....	65
Figure 26: Représentation schématique de la protéine SPACR et gène IMPG1 .....	67
Figure 27: Représentation schématique de la protéine SPACRCAN.....	70
Figure 28: Impg1 <sup>-/-</sup> versus phénotype DMVA associée à IMPG1:.....	88
Figure 29: 4 gènes à tester en cas de RP ou DMV .....	91

## Abréviations:

ABCA4	ATP binding cassette subfamily A member 4
ACL	Amaurose congénitale de Leber
AQP1	Aquaporine 1
ARR1	Arrestin 1
BHR	Barrière hémato-rétinienne
CE	Communauté Européenne
CRD	Cone rod dystrophy
DM	Dystrophie maculaire
DMLA	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
DMVA	Dystrophie maculaire vitelliforme adulte
DMVJ	Dystrophie maculaire vitelliforme juvénile
DMV	Dystrophie maculaire vitelliforme
EGF	Epidermal growth factor
EOG	Electro-oculogramme
EPR	Epithélium pigmentaire rétinien
ERG	Electro-rétinogramme
GAG	Glycosaminoglycane
GDP	Guanosine diphosphate
GMP	Guanosine monophosphate
GRK1	Rhodopsin kinase 1
GTP	Guanosine triphosphate
HABM	Hyaluronan binding motif
IMPG1	Interphotoreceptor matrix proteoglycan 1
IMPG2	Interphotoreceptor matrix proteoglycan 2
IRBP	Interphotoreceptor retinoid binding protein
KO	Knock-out
LRAT	Lecithin-retinol acyltransferase
MEC	Matrice extracellulaire

MERTK	Myeloid epithelial reproductive tyrosine kinase
MFGE8	Milk fat globule-EGF factor 8 protein
MIP	Matrice interphotoréceptrice
NCMD	North carolina macular dystrophy
OMS	Organisation mondiale de la santé
PDE	Phosphodiesterase
PNA	Peanut agglutinin
PR	Photorécepteur
Ptdr Ser	Phosphatidyl serine
SE	Segment externe
SI	Segment interne
SNP	Single nucleotid polymorphism
SPACR	Sialoprotein associated with cones and rods
SPACRCAN	Sialoprotein associated with cones and rods proteoglycans
RDH	Retinol dehydrogenase
RDS	Retinal degeneration slow
RHAMM	Receptor hyaluronan-mediated motility
RP	Rétinite pigmentaire
RPad	Rétinite pigmentaire autosomique dominante
RPar	Rétinite pigmentaire autosomique récessive
RPE65	Retinal pigment epithelium 65
SEA	Sperm, enterokinase, Agrin protein
TAM	Tyro3, Axl, Mar
VEGf	Vascular endothelial growth factor
WGA	Wheat germ agglutinin

## Préambule:

J'ai rejoint l'équipe vision du professeur Christian HAMEL le mois de Février 2017. L'équipe travaille sur la génétique et les thérapies des cécités rétiniennes et du nerf optique. Le défunt professeur Christian HAMEL (1955-2017) était mon directeur de thèse, le Dr Gaël MANES mon encadrant au quotidien, le professeur Agnès MULLER a repris la direction de ma thèse.

En 2013, le Dr MANES et l'équipe ont découvert l'implication d'un nouveau gène dans une dystrophie rétinienne héréditaire : la dystrophie maculaire vitelliforme (DMV). Deux autres gènes, *BEST1* et *PRPH2*, sont également connus comme étant responsables de DMV lorsqu'ils sont mutés.

La découverte du gène *IMPG1*, premier gène codant une protéine de la matrice interphotoréceptrice impliqué dans une dystrophie rétinienne, a conduit l'équipe à créer un modèle murin *Impg1*<sup>-/-</sup>. La genèse de ce modèle fut permise par l'aide financière apportée par la fondation maladie rare. Mon doctorat, financé par l'association Valentin Haüy puis l'association SOS Rétinite, s'est intéressé à suivre l'évolution de cette pathologie neurodégénérative chez ce modèle murin.

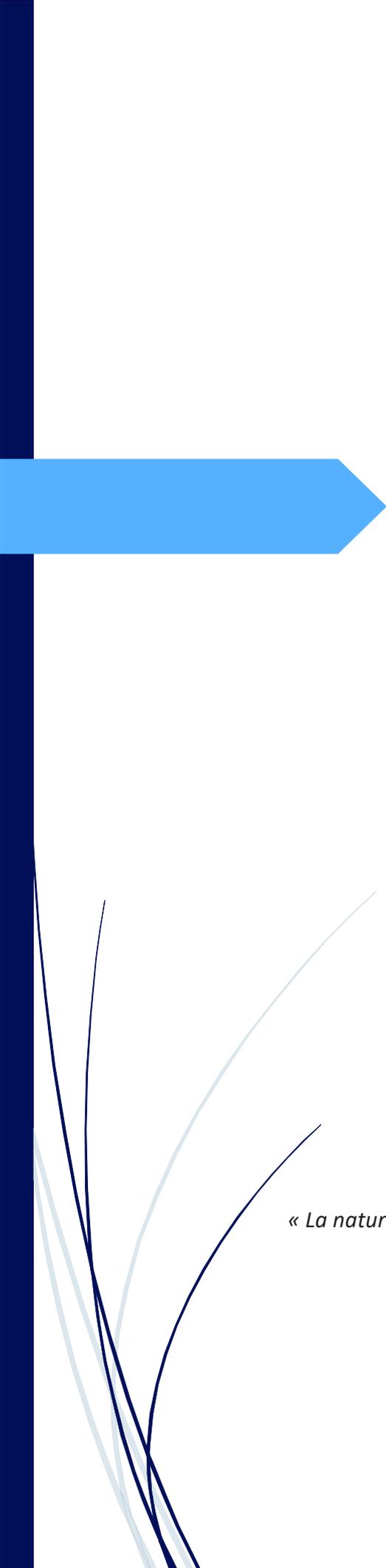
Un phénotypage à l'aide du matériel d'exploration fonctionnelle ophtalmologique disponible dans notre animalerie, et une étude histologique ont été les clés de la compréhension mécanistique de cette dystrophie de la rétine causée par le gène *Impg1*.

A travers l'introduction de ce manuscrit de thèse, je vais vous présenter les principales structures et fonctions de l'œil humain (principalement, la neurorétine et l'épithélium pigmentaire rétinien).

Je m'attarderai ensuite sur la matrice interphotoréceptrice, matrice extracellulaire formant l'interface entre l'épithélium pigmentaire rétinien et la neurorétine. Je proposerai par la suite une classification possible des dystrophies héréditaires rétiniennes en discriminant : la rétinite pigmentaire, des différentes dystrophies maculaires.

Cette introduction ne prétend pas être une description complète de l'œil, mais une vue d'ensemble que je pense nécessaire pour la compréhension de mon travail doctoral.

Chers lecteurs, vous souhaitant par cela, vous faire apprécier la lecture de ce manuscrit.



# ETAT DE L'ART

*« La nature nous a doté de cinq sens mais trop souvent oublié le bon sens »*

*Cyrille KELLER*

## CHAPITRE 1 – LE SYSTEME VISUEL

Nous pourrions définir les organes des sens comme l'ensemble des tissus nous octroyant la capacité de traiter des informations en provenance du monde extérieur. Nous utilisons chaque jour la totalité de nos cinq sens sans même en avoir conscience, et pourtant la dysfonction d'un seul d'entre eux devient handicapante (1). La capacité à conduire une voiture, reconnaître des amis ou voir des mots sur une page imprimée ne sont que quelques-unes des nombreuses activités de la vie quotidienne qui dépendent de la fonction normale d'une région particulière de notre oeil : la macula (2).

L'œil étant sans doute l'organe le plus important pour relier l'individu au monde qui l'entoure, n'est-il d'ailleurs pas coutume de dire que l'œil est le miroir de l'âme?

Aujourd'hui, à l'échelle mondiale, on estime à environ 2,2 milliards le nombre de personnes vivant avec une forme de déficience visuelle (Organisation Mondiale de la Santé OMS, Octobre 2019). Près de 36 millions d'entre elles sont atteintes de cécité selon l'OMS. La cécité étant définie par l'OMS selon deux critères objectifs: l'acuité visuelle d'une part et le champ visuel d'autre part. La cécité totale correspondant en l'absence de perception lumineuse.

La principale cause de déficience visuelle dans le monde, hors pays développés, est la cataracte (47,9%). Dans les pays développés, les principales causes sont, par ordre d'importance: les glaucomes (12,3%), la Dégénérescence Maculaire liée à l'âge (DMLA) (8,7%), les opacités cornéennes (5,1%), la rétinopathie diabétique (4,8%) etc...(3).

L'âge est un des facteurs de risque important de l'apparition de ces pathologies. Or la croissance démographique et le vieillissement de la population vont accroître le risque de voir davantage de personnes développer ce type de déficience visuelle.

Nous nous intéressons dans l'équipe à un autre type de pathologie visuelle, les maladies héréditaires rares de la rétine et du nerf optique. La notion de maladie rare est définie par sa prévalence; dans l'union européenne: toute maladie dont la prévalence est égale ou inférieure à 1/2000 est considérée comme maladie rare (Règlement CE No 141/2000 du Parlement européen et

du Conseil du 16 décembre 1999). Les dystrophies rétiniennes héréditaires forment un groupe de pathologies hétérogènes d'origine génétique, également responsables de déficiences visuelles chez l'adulte. De sévérité variable ; certaines sont stables au cours de la vie (par exemple l'héméralopie essentielle) et d'autres sont neurodégénératives (exemple la rétinite pigmentaire). L'âge d'apparition de ces atteintes est également très variable, du stade néonatal au stade adulte.

Le diagnostic repose sur un ensemble d'examens cliniques tels que l'imagerie rétinienne (fondoscopie, OCT, autofluorescence rétinienne, angiographie), les enregistrements de l'activité électrique de la rétine (électrophysiologie), la mesure de l'acuité visuelle et du champ visuel périphérique, le test de vision des couleurs, etc... Les caractéristiques neuronales de la plupart des cellules de la rétine permettent de considérer l'oeil comme une extension du cerveau et une partie du système nerveux central.

## 1.1 LES TUNIQUES OCULAIRES

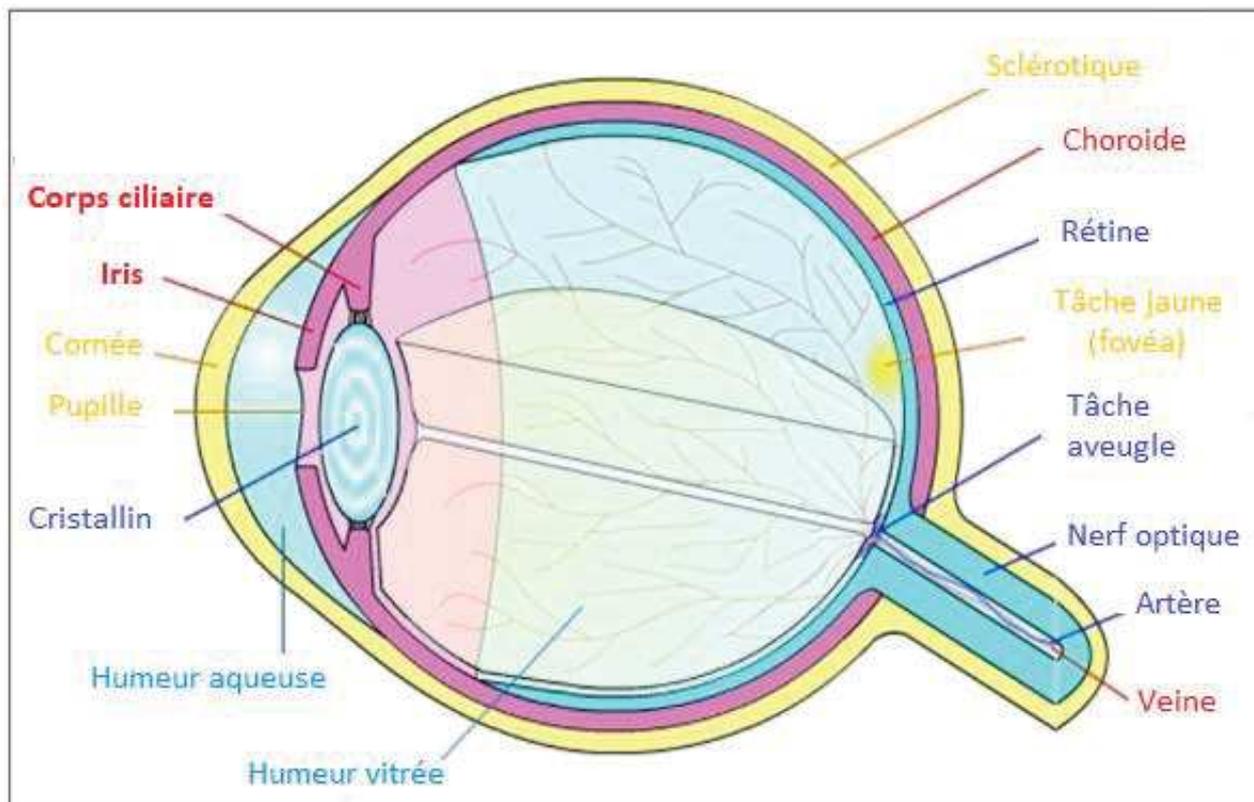
L'œil est une structure complexe, creuse, de forme globalement sphérique. On estime le diamètre du globe oculaire humain emmétrope à 2,5 cm, pour une masse de 8 grammes. Il se compose de trois différentes tuniques : externe, moyenne et interne (**Figure 1**).

\*La tunique la plus externe est la sclérotique, formée d'un tissu conjonctif dense et résistant, peu vascularisé qui joue un rôle de protection (la sclérotique est transparente côté antérieur de l'œil et forme la cornée). La cornée est la porte d'entrée de la lumière dans l'organe.

\*La tunique moyenne est composée de la choroïde, de l'iris, du cristallin, de la pupille et du corps ciliaire. La choroïde est un tissu pigmenté et vascularisé ayant un rôle nutritif pour la rétine externe. L'iris est une membrane circulaire contractile de l'œil, elle est sa partie colorée et l'orifice en son centre forme la pupille. Quant au cristallin, on le définit comme une lentille convergente, transparente et fibreuse; il permet la focalisation des rayons lumineux sur la rétine.

\*La tunique la plus interne est formée de deux couches: la rétine neurosensorielle la plus interne formée de différentes populations cellulaires traitant et acheminant l'information visuelle vers le cerveau. Cette neurorétine est une structure du système nerveux central. La couche la plus externe forme une seule couche de cellules hexagonales densément chargées de granules de pigment de mélanine, l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR). Elle repose via l'EPR sur la choroïde, composée d'un réseau capillaire : les choriocapillaires.

Le fonctionnement et la structure de cette dernière tunique, la rétine, seront développés par la suite dans cette thèse (**Paragraphe 1.1.1**), et plus particulièrement : la matrice interphotoréceptrice (**Chapitre 2**) qui est la zone de contact étroit entre l'EPR et les photorécepteurs. Ces 3 tuniques entourent le corps vitré : substance gélatineuse qui maintient la forme sphérique de l'œil, et la rétine accolée au fond de l'œil (**Figure 1**).



*Figure 1: Anatomie de l'œil humain adulte*

*Illustration d'une coupe sagittale de l'œil humain représentant les structures macroscopiques.  
Source (4)*

### 1.1.1 La neurorétine

Puisque dérivant du neuro-ectoderme, il faut considérer la neurorétine comme une projection du système nerveux central (5).

#### LES DIFFERENTES COUCHES NEURONALES

La rétine neurale, transparente, se compose de différentes populations cellulaires (**Figure 2A**).

\*Des neurones à transmission verticale : les photorécepteurs (PR), les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires.

\*Des neurones à transmission horizontale (aussi appelés cellules d'association): les cellules horizontales et les cellules amacrines.

\*Des cellules gliales : les cellules de Müller, les astrocytes et les cellules microgliales.

Les PR captent les photons et transforment leur énergie lumineuse en un signal électrochimique (la phototransduction est un processus qui sera abordé dans le paragraphe **I.1.6**). Les PR transmettent ce signal aux cellules bipolaires, qui elles-mêmes le transmettent aux cellules ganglionnaires. Ces dernières acheminent l'information au cortex visuel via le nerf optique (ce sont les axones des cellules ganglionnaires qui forment le nerf optique).

Les synapses forment des zones de contact fonctionnelles entre ces différents types neuronaux, permettant la transmission du signal électrochimique. A chaque relais, le signal est modulé par les cellules horizontales et amacrines qui établissent des connexions latérales avec les photorécepteurs, les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires. Les cellules d'association permettent ainsi d'améliorer le contraste et la définition du stimulus visuel en inhibant ou en activant les cellules.

Les cellules de Müller occupent elles, toute l'épaisseur de la rétine. Elles entourent les neurones et leurs expansions (dendrites et axones). Elles ont un rôle métabolique et un rôle de maintien de l'architecture rétinienne et participent également à la formation de la barrière hémato-rétinienne (BHR) interne.

Les cellules microgliales représentent les principales cellules immunitaires résidentes de la rétine. En condition non pathologique, elles sont situées uniquement dans la couche des axones des cellules ganglionnaires de la rétine (6). Elles sont activées en condition pathologique et migrent à travers la rétine vers la région lésée pour dégrader les débris cellulaires (7).

La neurorétine se présente alors comme une succession de couches laminaires, son organisation est stratifiée (**Figure 2B**). De la partie neurorétinienne la plus externe vers la partie la plus interne :

\*L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR).

\*La couche des segments externes (SE) et internes (SI) des PR.

\*La membrane limitante externe, qui constitue une zone d'adhérence entre les PR et les pieds distaux des cellules gliales de Müller (**Figure 2A**).

\*La couche nucléaire externe, formée par le corps cellulaire des PR.

\*La couche plexiforme externe, contenant les synapses des cellules bipolaires, des cellules horizontales et des PR.

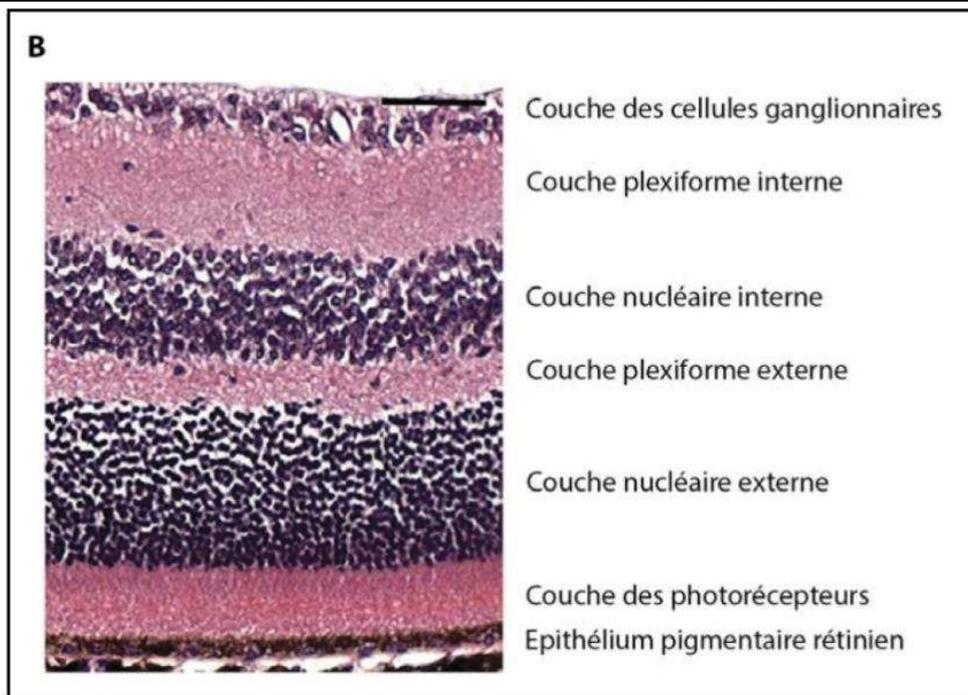
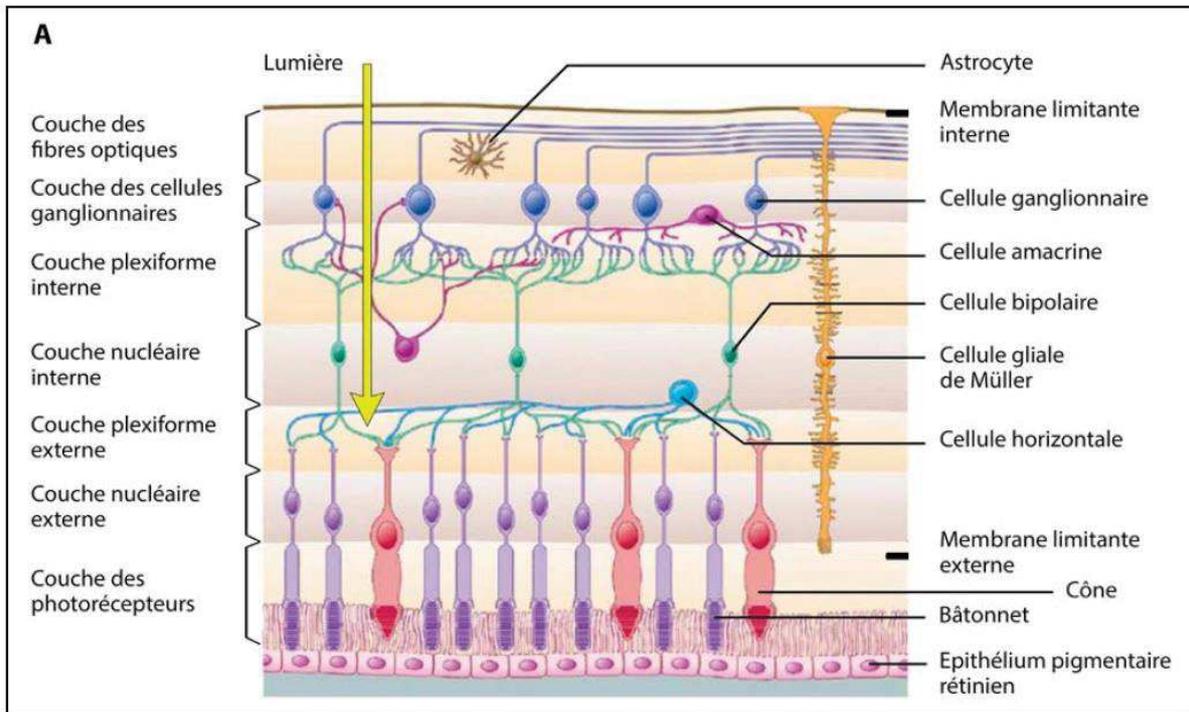
\*La couche nucléaire interne, qui contient les corps cellulaires des cellules bipolaires, amacrines, horizontales et des cellules de Müller.

\*La couche plexiforme interne, formée par les synapses entre les cellules ganglionnaires, bipolaires et les cellules amacrines.

\*La couche des cellules ganglionnaires, constituée par les corps cellulaires des cellules ganglionnaires.

\*La couche des fibres nerveuses rétinienne (**Figure 2A**) formée des axones des cellules ganglionnaires.

\*La membrane limitante interne, membrane en contact avec le vitré et contenant les pieds proximaux des cellules de Müller (**Figure 2A**).



*Figure 2: Organisation laminaire de la rétine humaine*

(A) Schéma des cellules nerveuses et épithéliales composant la rétine. De l'EPR vers les cellules les plus internes de l'œil : les cellules ganglionnaires.

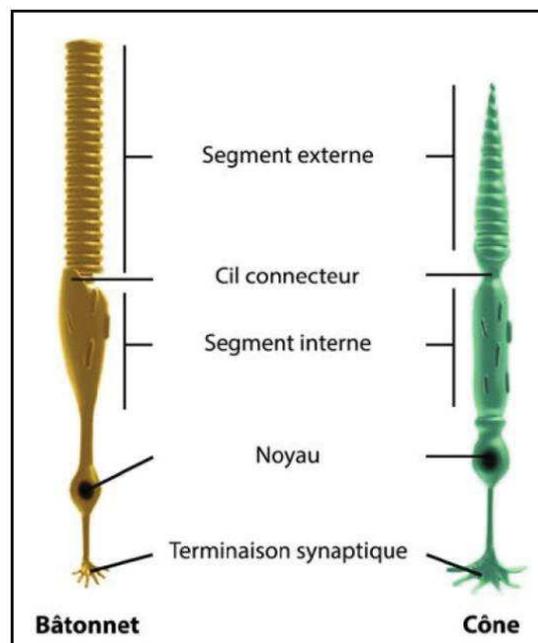
(B) Histologie. Coupe de rétine de souris adulte colorée en hématoxyline éosine.

Barre d'échelle = 50µm

Source (Iconographie du manuscrit de thèse de Célia PARINOT)

### 1.1.2 Le photorécepteur (PR)

Les PR sont les cellules neuro-sensorielles localisées au niveau de la rétine externe. Ces cellules photoreceptrices sont à l'origine de la transduction du signal lumineux en influx nerveux. Deux populations de PR sont présentes dans l'espèce humaine : les PR de type bâtonnet et les PR de type cône (**Figure 3**). Ils sont tous deux formés par un segment externe (SE), région en contact avec l'EPR, un segment interne (SI) contenant tous les organites nécessaires à la survie cellulaire (le SE est relié au SI via le cil connecteur), un noyau et une synapse. Les terminaisons synaptiques du PR sont connectées aux cellules bipolaires et horizontales au niveau de la couche plexiforme externe.



*Figure 3: Les photorécepteurs*

*Les deux types de PR dans l'espèce humaine.*

*Source (8)*

La couche des PR mesure 4  $\mu\text{m}$  chez l'être humain. Les bâtonnets et des cônes sont en proportion inégale dans la rétine humaine. On estime à 130 millions le nombre de bâtonnets pour 6,5 millions de cônes.

### 1.1.3 Les spécificités des bâtonnets

Le SE des bâtonnets est composé d'un empilement d'environ 1000 disques entourés d'une membrane plasmique, disques contenant le photo-pigment, la rhodopsine (9). Les disques sont synthétisés dans le SI du PR puis migrent jusqu'au SE via le cil connecteur. La synthèse continue des disques permet de renouveler complètement le SE en 10 jours environ, et ainsi compenser le processus de phagocytose du SE par les cellules de l'EPR. Il y a convergence des connexions synaptiques d'une centaine de bâtonnets vers une seule cellule bipolaire. Ces multiples connexions synaptiques sur une seule cellule bipolaire ne permettent pas une image d'une précision optimale. Les bâtonnets sont essentiellement impliqués dans la perception visuelle dans l'obscurité ou en adaptation à l'obscurité. En ambiance photopique, la fonction des bâtonnets est complètement saturée, ils ne participent donc plus à la perception visuelle.

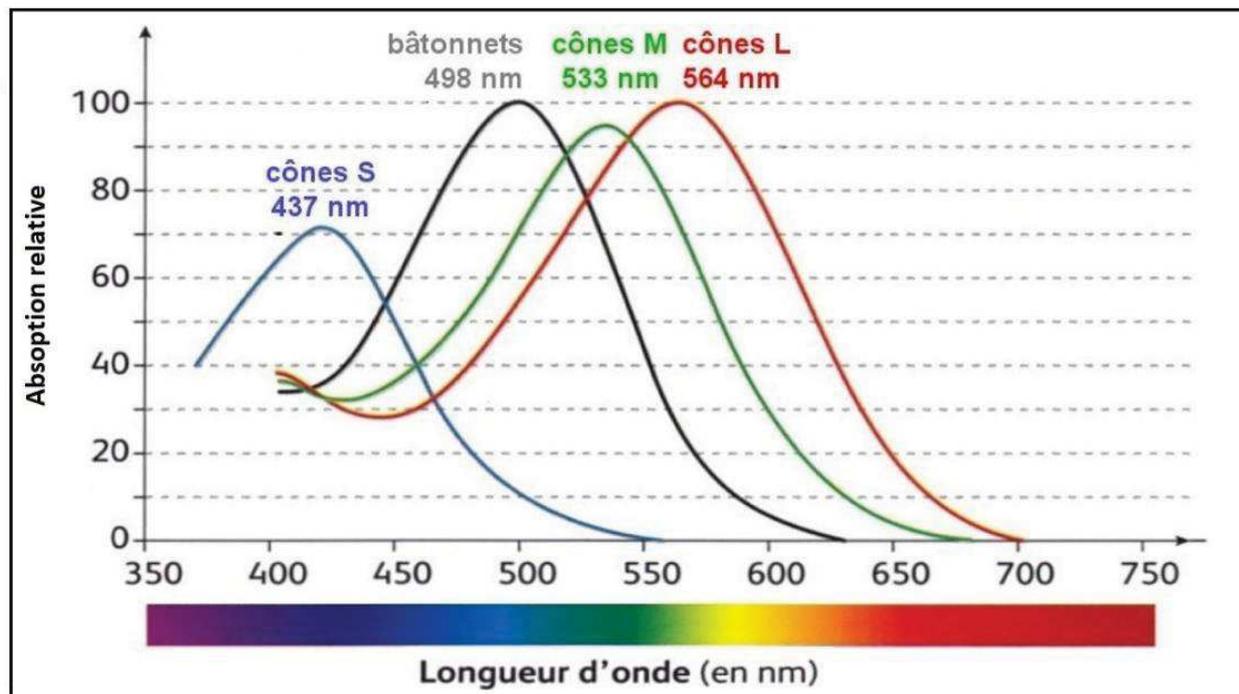
La **Figure 4** présente le spectre d'absorption de la rhodopsine et des différentes iodopsines présentes dans les cônes chez l'espèce humaine.

### 1.1.4 Les spécificités des cônes

Les cônes ont une structure globale similaire aux bâtonnets, en revanche ils ont une forme conique et c'est le repliement en lamelle de la membrane plasmique qui forme l'enveloppe du PR (**Figure 3**). Les cônes permettent la vision diurne (conditions photopiques), ce sont les cônes périphériques qui sont responsables de la vision périphérique de jour. On distingue trois types de iodopsines excitables chacune dans une longueur d'onde donnée. La caractérisation de ces trois opsines a permis de classer les cônes en 3 sous populations (**Figure 4**) :

- Les cônes S (pour *Short wavelength*), dont l'opsine possède une longueur d'onde d'absorption courte avec un pic de sensibilité à 437nm, pigment sensible au bleu (10% des cônes totaux).
- Les cônes M (*Medium*), pic de sensibilité à 533nm, sensible au vert (30% de la population).
- Les cônes L (*Large*), sensibilité à 564nm, sensible au rouge (60% des cônes).

Le recrutement des différentes sous populations de cônes permet la détection de toutes les nuances de couleurs du spectre visible.



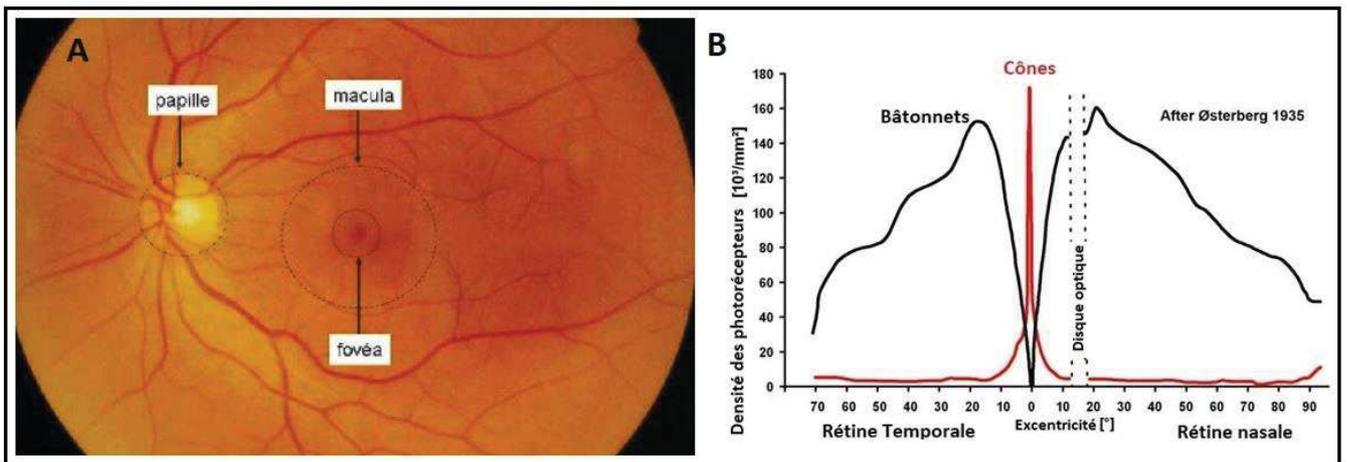
*Figure 4: Spectre d'absorption des différentes opsines*

*Le spectre d'absorption de la rhodopsine et des 3 différentes opsines chez l'humain.*

*Source (« The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease | OMMBID | McGraw-Hill Medical » s. d.)*

### 1.1.5 Répartition spatiale des photorécepteurs

Il n'y a pas seulement des différences de caractéristiques entre tous ces PR, mais des différences de répartition spatiale au niveau de la rétine. Cette différence de répartition des PR au sein de la rétine permet de la régionaliser (**Figure 5 B**). Au centre de la rétine, on distingue une zone appelée macula *lutea* ou « tache jaune » (de par la couleur du pigment xanthophylle), où il y a une densité maximale de cônes. Au centre de la macula est située une petite zone de 1,5 mm de circonférence, conique et creuse : la fovéa. La densité des bâtonnets est maximale en moyenne périphérie de la rétine alors qu'ils sont absents de la fovéa. De plus, la macula est exempte de vaisseaux sanguins pour ne pas interférer avec la vision centrale (**Figure 5 A**).



*Figure 5: Densité des cônes et des bâtonnets au sein de la rétine humaine*

(A) Fond d'œil humain

(B) Répartition des PR sur la rétine.

Source schéma adapté de (11)

## 1.2 EPITHELIUM PIGMENTAIRE RETINIEN

De même que la neurorétine, l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) est issu du neuroectoderme. L'EPR est une monocouche continue de cellules pigmentées situées entre la neurorétine et la choroïde. De forme hexagonale, de taille comprise entre 10 et 20  $\mu\text{m}$ , ces cellules sont : adhérentes, très jointives (présence de desmosomes et de microfilaments organisés en *zonula occludens* et *zonula adherens* formant des jonctions serrées). Cette monocouche représente donc une véritable barrière, assurant l'étanchéité entre la choroïde et la neurorétine interne : on parle de barrière hémato rétinienne (BHR) externe. D'un point de vue structural, les cellules de l'EPR sont polarisées (**Figure 6**), la membrane basolatérale est située face à la membrane de Bruch (matrice extracellulaire de collagène et d'élastine séparant l'EPR de l'endothélium fenestré des choriocapillaires de la choroïde) tandis que la membrane apicale de cet épithélium fait face aux SE des PR. On retrouve une structure très importante de la cellule épithéliale en son pôle apical : les microvillosités. Les SE des PR sont enchevêtrés dans les microvillosités et c'est à ce niveau que les interactions entre les PR et l'EPR se réalisent (détaillé dans le paragraphe **2.2.3**). Des organites particuliers sont présents principalement en partie apicale de l'EPR :

\*Les mélanosomes qui sont spécialisés dans la synthèse et le stockage de la mélanine (principal pigment de l'EPR). Ce pigment permet de protéger la rétine du rayonnement lumineux.

\*Les phagosomes qui sont des organites chargés en débris de SE de PR ayant été phagocytés par l'EPR.

On dénombre de 4 à 6 millions de cellules épithéliales rétinienne selon l'âge du sujet. Une cellule de l'EPR est en contact avec en moyenne 45 PR. Les fonctions de l'EPR dans la rétine sont multiples:

\*Il permet la régulation et les échanges passifs (oxygène...) et actifs vers la choroïde.

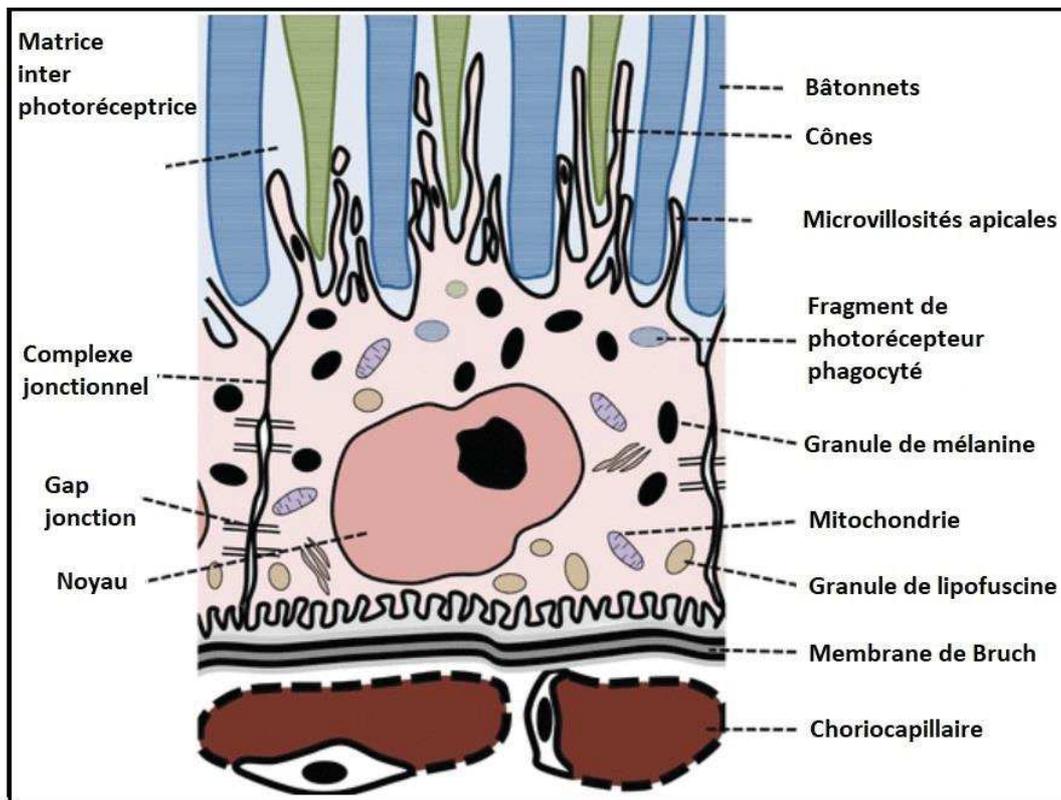
\*Il est responsable de la phagocytose des articles externes des PR (nécessaire à leur bon fonctionnement et à leur renouvellement).

\*L'EPR intervient dans le maintien de la neurorétine et son adhésion au fond de l'oeil (action de tampon ionique).

\*Il permet une partie de la synthèse et du renouvellement de la matrice interphotoréceptrice (MIP).

\*Il joue un rôle d'écran pour la rétine en limitant la réflexion lumineuse par absorption de la lumière.

\*Enfin il intervient dans le cycle des rétinoïdes (paragraphe 1.2.2).



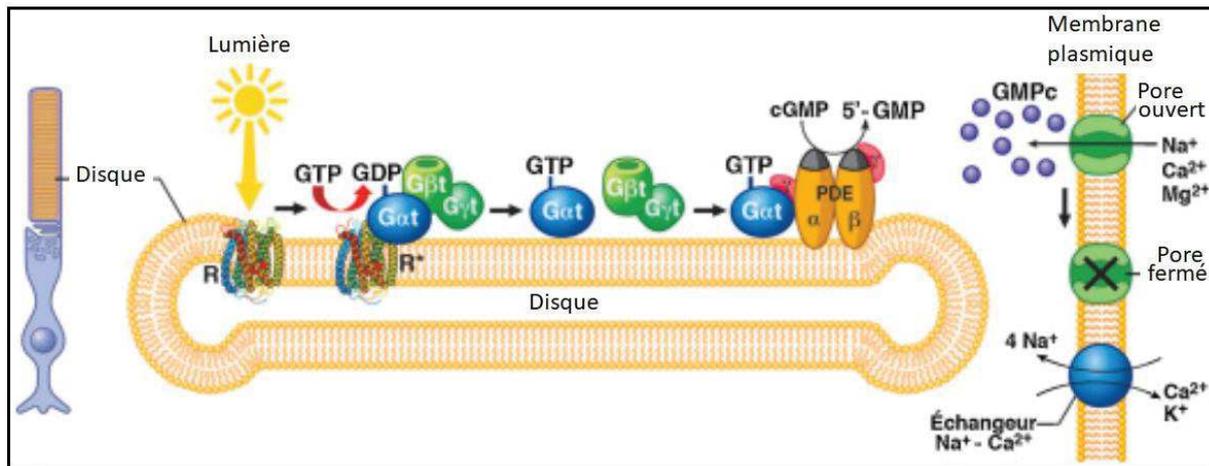
*Figure 6: La cellule de l'épithélium pigmentaire rétinien*

*Les principaux constituants de la cellule épithéliale rétinienne.  
Source schéma adapté de (12)*

### 1.2.1 Cascade de phototransduction

La phototransduction est le processus par lequel l'énergie lumineuse est transformée en énergie électrique. Les opsines présentes dans la membrane des disques des PR sont des protéines transmembranaires couplées aux protéines G.

A l'obscurité, les opsines sont inactives. L'excitation du chromophore par les photons va induire son isomérisation du 11-cis-retinal en tout-trans-retinal, s'en suit une cascade biochimique d'activation de plusieurs seconds messagers, qui conduira au final à la régénération du chromophore (1.2.2). L'isomérisation du chromophore va activer l'opsine ( $R^*$ ), elle-même active la transducine (une protéine G trimérique  $\alpha\beta\gamma$  liée au GDP) par catalyse de l'échange du GDP par le GTP, l'activation de la transducine se traduit par la libération de sa sous-unité  $\alpha$  liée au GTP. Cette sous-unité  $\alpha$ -GTP de la transducine active ensuite la phosphodiesterase (PDE) en se liant aux deux sous-unités inhibitrices gamma, PDE- $\gamma$ , par compétition. Cela libère les deux sous-unités alpha et beta de la PDE qui forment un complexe protéique actif. Ce complexe actif peut alors hydrolyser le GMP cyclique (GMPc) cytoplasmique du PR en GMP. Cette diminution de la concentration en GMPc intracellulaire provoque la fermeture des canaux  $Na^+$  et  $Ca^{2+}$  responsables du courant d'obscurité et qui sont situés à la membrane externe des PR (**Figure 7**). La fermeture des canaux  $Na^+$  et  $Ca^{2+}$  entraîne une diminution de la concentration en  $Ca^{2+}$  et une hyperpolarisation du PR puis une diminution de la sécrétion de glutamate au niveau synaptique (13). Il y a genèse du signal électrique au niveau du PR qui va être transmis aux cellules bipolaires puis ganglionnaires dont les axones forment le nerf optique. L'organisation laminaire de la rétine permet la phototransduction et la modulation du signal lumineux.



*Figure 7: Cascade de la phototransduction*

*L'activation de la cascade de phototransduction entraîne une fermeture des canaux sodium-calcium. L'absorption de la lumière active la rhodopsine ( $R^*$ ) qui va ensuite catalyser l'échange du GDP pour le GTP par la sous-unité  $G_{\alpha t}$  de la transducine. Cette sous-unité va alors se dissocier de la  $R^*$  et de ses sous-unités  $G_{\beta\gamma t}$  pour activer la PDE en se liant à ses sous-unités  $\gamma$ . La PDE ainsi activée va hydrolyser le GMPc en 5'-GMP, ce qui provoque la fermeture des pores à  $Na^+/Ca^{2+}$  de la membrane plasmique*

*Source (14)*

Le signal est amplifié par l'activation de plusieurs centaines de transducine par une seule rhodopsine active ; puis par l'activation de centaine de PDE par une seule transducine. L'activité d'hydrolyse du GMPc par la PDE est extrêmement élevée (6000–8000 GMPc hydrolysés par seconde par PDE). Ainsi, une rhodopsine permet donc l'activation de 650 PDE qui hydrolysent chacune 8000 GMPc permettant la fermeture de 300 à 400 canaux sodium-calcium (14,15). Il faut noter qu'un réel phénomène d'amplification à trois niveaux est responsable de cette importante fermeture de canaux ioniques (16).

La désactivation de la cascade de phototransduction passe par une inactivation de la rhodopsine. La phosphorylation de  $R^*$  par une rhodopsine kinase (GRK1), permet son interaction avec l'arrestine (ARR1) (17). C'est la formation du complexe  $R^*$ -phosphorylée-arrestine qui déclenche la libération du tout-trans rétinale de son opsine; il s'en suit alors la séparation de la rhodopsine déphosphorylée et de l'arrestine (18).

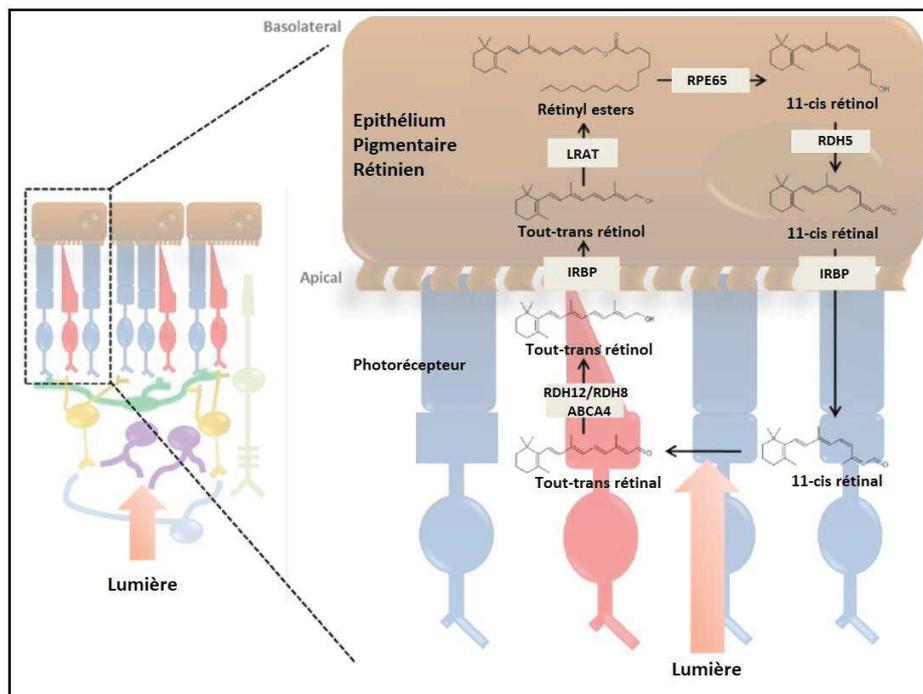
De nombreuses protéines associées à la cascade de la phototransduction sont codées par des gènes qui sont impliqués dans des dystrophies rétiniennes héréditaires :

- La rétinite pigmentaire (*RHO, PDE6A, PDE6B, SAG*)
- L'amaurose congéniale de Leber (*GUCY2D*)
- L'héméralopie essentielles, de type Maladie d'Oguchi (*SAG, GRK1*)
- La dystrophie cônes et bâtonnets (*GUCA1A*).

## 1.2.2 Le cycle des rétinoïdes

Le cycle des rétinoïdes, ou cycle visuel, permet de régénérer le 11-cis rétinol au moyen d'une cascade enzymatique localisée à la fois dans les PR et l'EPR.

Les photorécepteurs (bâtonnets et cônes) sont les cellules responsables de la conversion du signal lumineux en signal électrique. Quatre opsines différentes sont présentes dans la rétine humaine, absorbant différentes longueurs d'onde du spectre visible (**Figure 4**). Le 11-cis rétinol, isomère commun dérivé de la vitamine A, constitue le chromophore pour les pigments visuels des cellules photoréceptrices (**Figure 8**). La photoréponse des cônes est environ 10 fois plus rapide que celles des bâtonnets, mais les bâtonnets sont plus sensibles en condition de faible luminosité. Les processus de régénération du chromophore des pigments visuels des cônes et bâtonnets semblent différents et se déroulent dans plusieurs types cellulaires : l'EPR pour sa grande majorité, et les cellules de Müller.



*Figure 8: Le cycle visuel*

*Les principales protéines impliquées dans le cycle visuel.  
Source schéma adapté de (19)*

Le rétinol est lié à une opsine sous la forme de 11-cis-rétinal. L'excitation par les photons provoque son isomérisation (un changement de conformation) le faisant passer à la forme tout-trans rétinol en le libérant ainsi de son opsine (**Figure 8**). Il réagit avec l'amine des phospholipides PE pour être ensuite pris en charge par un transporteur lipidique, la protéine ABCA4 (*ATP-Binding Cassette*), et acheminé dans la membrane plasmique des disques jusqu'aux déshydrogénases RDH8 exprimées au niveau du SE, qui réduisent le rétinol toxique en tout-trans rétinol inerte. Le transporteur ABCA4 participe également à la détoxification des produits issus de la peroxydation lipidique (19). Le tout-trans rétinol est ensuite transporté du PR vers l'EPR à l'aide d'une protéine, l'IRBP (*Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein*) (20). Dans l'EPR, le tout-trans rétinol est alors estérifié en retinyl ester par l'enzyme LRAT (*lecithin retinol acyltransferase*), puis isomérisé en 11-cis rétinol par l'isomérase RPE65 (21). Finalement, la RDH5 (11-cis-rétinol déshydrogénase) va catalyser le passage du 11-cis-rétinol en 11-cis-rétinal (22) qui sera transporté de l'EPR aux disques des SE des PR par la protéine IRBP.

De multiples évidences suggèrent l'existence d'un second cycle visuel pour la régénération du pigment visuel des cônes. Les cônes seulement, ont montré une régénérescence de la photosensibilité après l'exposition de neurorétines à la lumière (23–25). Des données très récentes proposent un modèle de fonctionnement d'un second cycle spécifique aux cônes impliquant la cellule gliale de Müller (26,27).

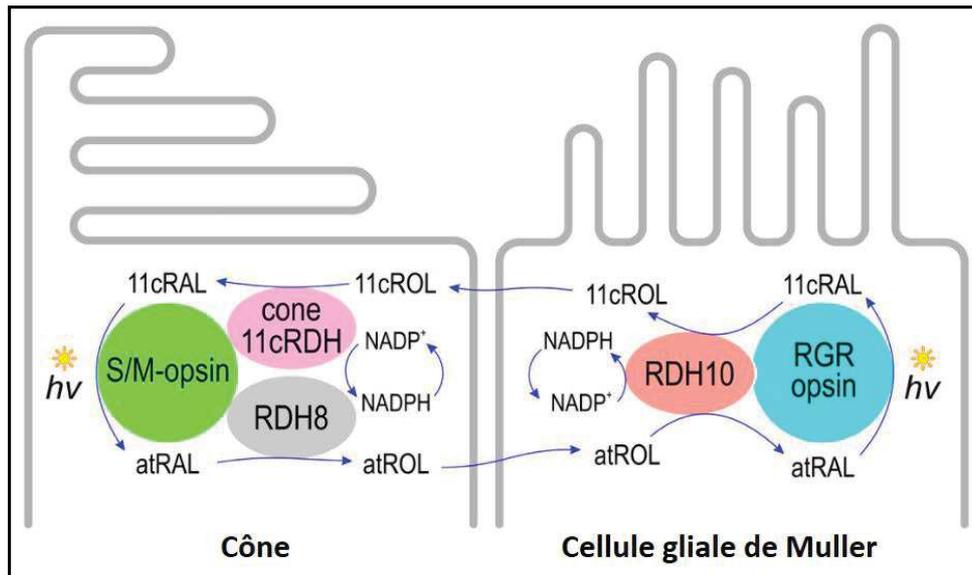


Figure 9: Le cycle des rétinoïdes des cônes

Les principales protéines impliquées dans le cycle visuel des cônes.  
Source schéma adapté de (26)

De nombreuses protéines nécessaires à ces cycles sont codées par des gènes qui sont impliqués dans des dystrophies rétinienne héréditaires comme par exemple :

- La rétinite pigmentaire (*RPE65, RDH12, RBP3*)
- Le *Fundus albipunctatus* (*RDH5*)
- La maladie de Stargardt (*ABCA4*)

Les rétinoïdes transitent entre les cellules de Müller, les PR et le RPE via la MIP, la matrice à l'interface des PR et de l'EPR (**Chapitre 2**).

## CHAPITRE 2 – LA MATRICE INTERPHOTORECEPTRICE

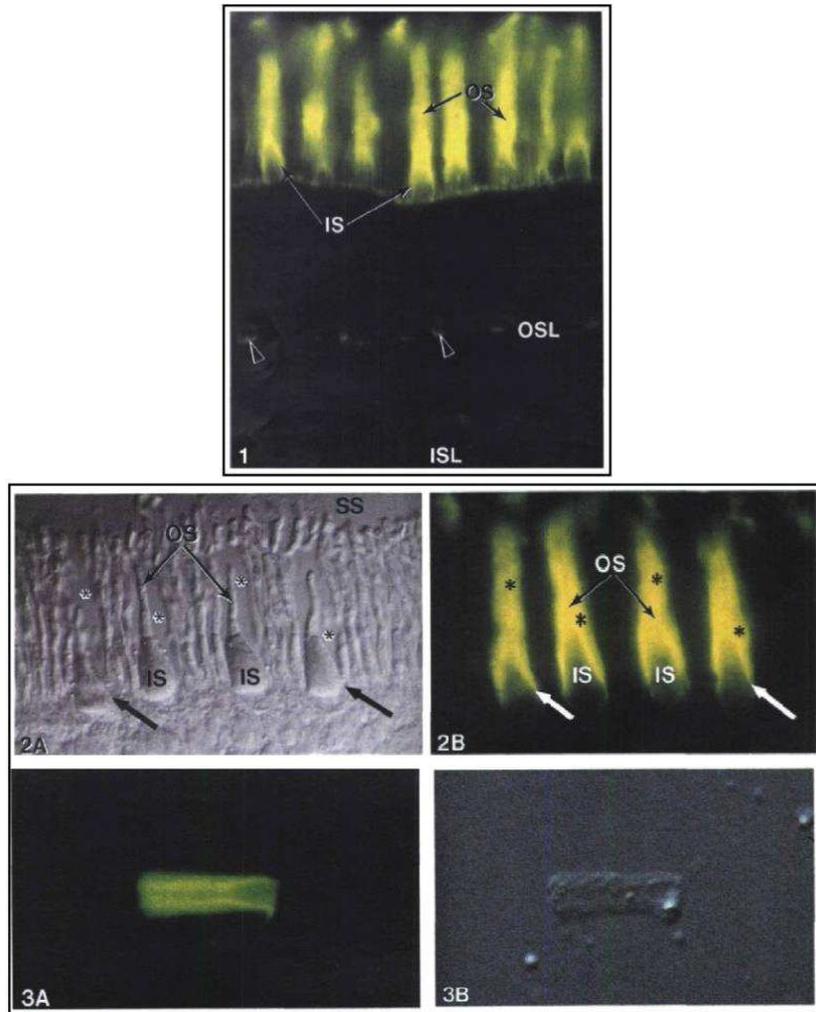
### 2.1 COMPOSITION ET STRUCTURE

#### 2.1.1 Caractérisation de la matrice interphotoréceptrice

Les matrices extracellulaires (MEC) constituent un environnement intercellulaire formé de macromolécules. Les MEC sont non seulement le support structurel des constituants cellulaires, mais aussi le siège d'importantes réactions biochimiques (la matrice osseuse, la matrice cartilagineuse, la lame basale...) (28). Au niveau rétinien, la MEC prend le nom de matrice interphotoréceptrice (MIP) au niveau de l'interface allant des SI des PR, jusqu'aux microvillies de l'EPR (29) (**Figure 9**).

Les premières études sur cette structure, dans les années 60, ont été faites à l'aide de différents colorants histologiques. Une coloration au bleu alcian permettait de révéler la MIP en microscopie optique (30). En 1984, l'équipe du professeur JOHNSON a découvert la liaison de l'agglutinine de cacahuète (*Peanut agglutinin*, PNA) à la MIP au niveau des cônes (**Figure 9**) (31). Une autre lectine, l'agglutinine de germe de blé (*wheat germ agglutinin*, WGA), est capable de lier spécifiquement des glycoprotéines de cette matrice au niveau des bâtonnets (32).

Les composés majeurs de cette matrice sont des glycosaminoglycanes, des protéoglycanes, des glycoprotéines, des fibres, des facteurs de croissance, des chimiokines et des protéases.



*Figure 10: Micrographie à fluorescence de rétines de différentes espèces*

- (1) Section maculaire de l'œil humain incorporé à l'acrylamide démontrant la liaison du FITC-PNA. Les segments internes (IS) et externes (OS) du photorécepteur sont spécifiquement marqués.
- (2A) Micrographie de contraste interférentiel différentiel Nomarski et micrographie de fluorescence de la même section de rétine de singe incorporé à l'acrylamide (*Macaca fascicularis*) exposée au FITC-PNA. Les astérisques représentent les régions dépourvues de constituants cellulaires autour des segments internes (IS) et externes (OS) des cônes (2A). Ces composants cylindriques au sein de la matrice d'interphotoréceptrice sont responsables pour la majorité de la liaison de PNA spécifique au cône (visible sur la micrographie de fluorescence du même champ (2B)).
- (3A) Micrographie à fluorescence et micrographie de contraste interférentiel différentiel Nomarski (3B) d'une gaine de matrice extracellulaire de cône isolée, d'une rétine porcine après exposition au FITC-PNA.

## 2.1.2 Les Glycosaminoglycanes

Les glycosaminoglycanes (GAGs) forment une famille de macromolécules glucidiques, qui prennent l'apparence de longues chaînes linéaires non ramifiées, composées de répétition de disaccharides. Ces disaccharides peuvent alors être N-sulfatés ou N-acétylés. Ces macromolécules glucidiques possèdent la caractéristique d'être acide et d'avoir un fort pouvoir de rétention d'eau (33). Les GAGs peuvent alors se lier à des protéines pour former des protéoglycanes par 2 moyens :

\*La liaison covalente par un GAG sulfaté

\*La liaison non covalente par un GAG non sulfaté (le cas de l'acide hyaluronique).

Les principaux GAGs des MEC sont :

La chondroïtine sulfate (**Figure 10**), le dermatane sulfate, le kératane sulfate, l'héparane sulfate et l'acide hyaluronique (ce dernier possède un fort poids moléculaire).

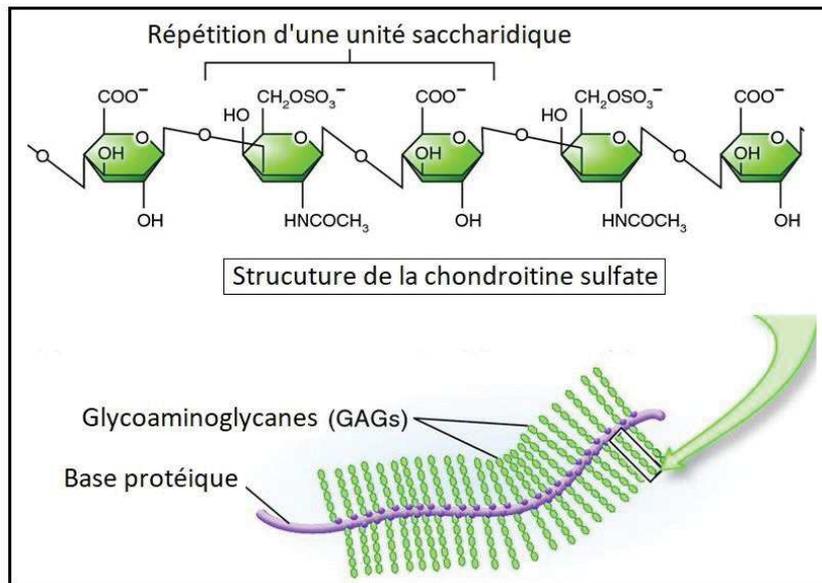
L'acide hyaluronique est un composé important de cette matrice ; c'est un immense polymère dont le poids moléculaire est compris entre 100 000 et 10 000 000 de Dalton. Ce polymère possède un important pouvoir de rétention d'eau, ce qui permet à la matrice d'absorber efficacement les chocs (34). Une perturbation de la synthèse ou de l'élimination de l'acide hyaluronique conduit à un défaut de phagocytose des SE des PR (35).

La chondroïtine sulfate est également très abondante dans la MIP, et il a été montré que l'inhibition de la synthèse de ce composé entraîne un détachement de la neurorétine de l'EPR (36).

Contrairement aux matrices des tissus conjonctifs de l'organisme, la MIP ne contient que très peu de collagène. Cette protéine confère normalement aux matrices une résistance mécanique à l'étirement. On pourra noter que la rétine est relativement « sensible » en comparaison avec d'autres tissus, le fait que la concentration en fibre de collagène soit plus faible pourrait en être l'explication (37).

### 2.1.3 Les Protéoglycanes

Les protéoglycanes sont le résultat de l'assemblage d'une protéine à un GAG via la O-glycosylation (**Figure 10**). La partie glucidique d'un protéoglycane peut représenter jusqu'à 95% de la macromolécule.



*Figure 11: Structure générale d'un protéoglycane*

*Composition d'un protéoglycane composé de chondroïtine sulfate*  
*Source schéma adapté d'une figure de (38)*

La protéine SPACRCAN codée par le gène *IMPG2* est un des protéoglycanes majeurs de la MIP  
**(3.2.2.3)**

### 2.1.4 Les Glycoprotéines

Les glycoprotéines sont le produit d'un processus de maturation des protéines au sein de la cellule. En effet, de nombreuses modifications post-traductionnelles débutent du réticulum endoplasmique rugueux jusqu'à l'appareil de Golgi. Ces modifications post-traductionnelles

consistent en l'ajout d'une liaison amide entre un résidu asparagine et un ose : la N-glycosylation et/ou l'ajout d'une liaison osidique (entre une sérine ou une thréonine), et un ose : la O-glycosylation.

La glycoprotéine IRBP est le composé soluble le plus abondant de la MIP. Comme nous l'avons abordé précédemment dans la partie sur le cycle visuel (1.2.2), IRBP est produite et sécrétée par les PR, elle intervient comme un échangeur de rétinoïdes entre l'EPR et les PR. Des mutations du gène codant pour IRBP, *RBP3*, sont également responsables de rétinite pigmentaire (39).

Chez l'humain, la glycoprotéine SPACR codée par le gène *IMPG1* est un des composés majeurs de la MIP (3.2.2.4)

Les interactions entre les glycosaminoglycane (2.1.2), les protéoglycane (2.1.3) et les glycoprotéines (2.1.4) sont à l'origine d'un véritable réseau, nécessaire à la structuration de la MIP (Figure 11).

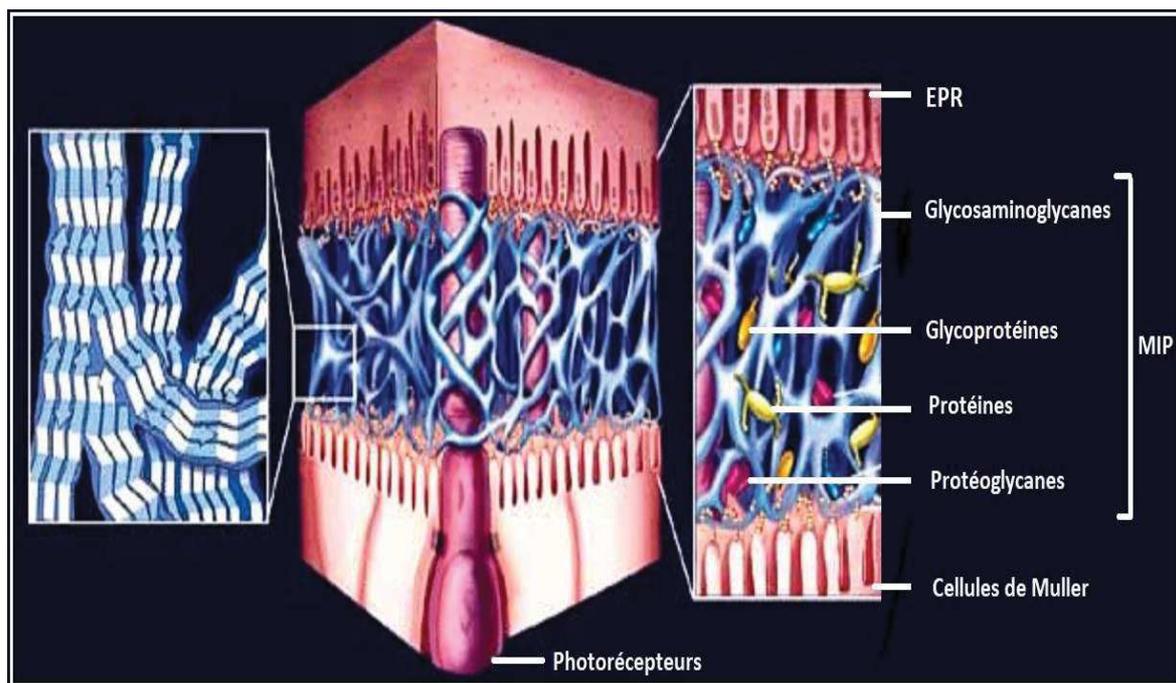


Figure 12: Schéma de la matrice interphotoréceptrice

Schéma en réseau de la matrice interphotoréceptrice de la rétine.  
Adaptation de la figure de Joe HOLLYFIELD (34)

## 2.2 LES FONCTIONS DE LA MATRICE INTERPHOTORECEPTRICE

Les études sur la matrice interphotoréceptrice demeurent relativement rares dans la littérature scientifique. Il est admis que cet espace allant des SI des PR aux microvillies apicales de l'EPR rétinien est extrêmement organisé structurellement. Cette matrice contribue aux fonctions assurées par l'EPR :

\*La régulation du transport des rétinoïdes (1.2.2).

\*La MIP est structurée en échafaudage, elle permet l'adhésion de la neurorétine à l'EPR ainsi que le maintien mécanique des cellules avoisinantes (2.2.1).

\*Le transport des nutriments, de facteurs de croissance et de l'oxygène (2.2.2).

\*le fonctionnement du processus de renouvellement des SE des PR. La phagocytose des SE n'est possible que par une orientation correcte des PR permettant leurs interactions avec les microvillies de l'EPR (2.2.3).

### 2.2.1 L'adhésion

Le transport transépithélial de l'eau et des ions entre les PR et l'EPR est nécessaire à leurs survies. La MIP sert de connecteur entre ces deux types cellulaires. L'intense activité métabolique des PR engendre une régulière augmentation du volume hydraulique rétinien (40). Ajoutée à cela, la pression intraoculaire provoque des mouvements d'eau et d'ions au sein de la MIP (41).

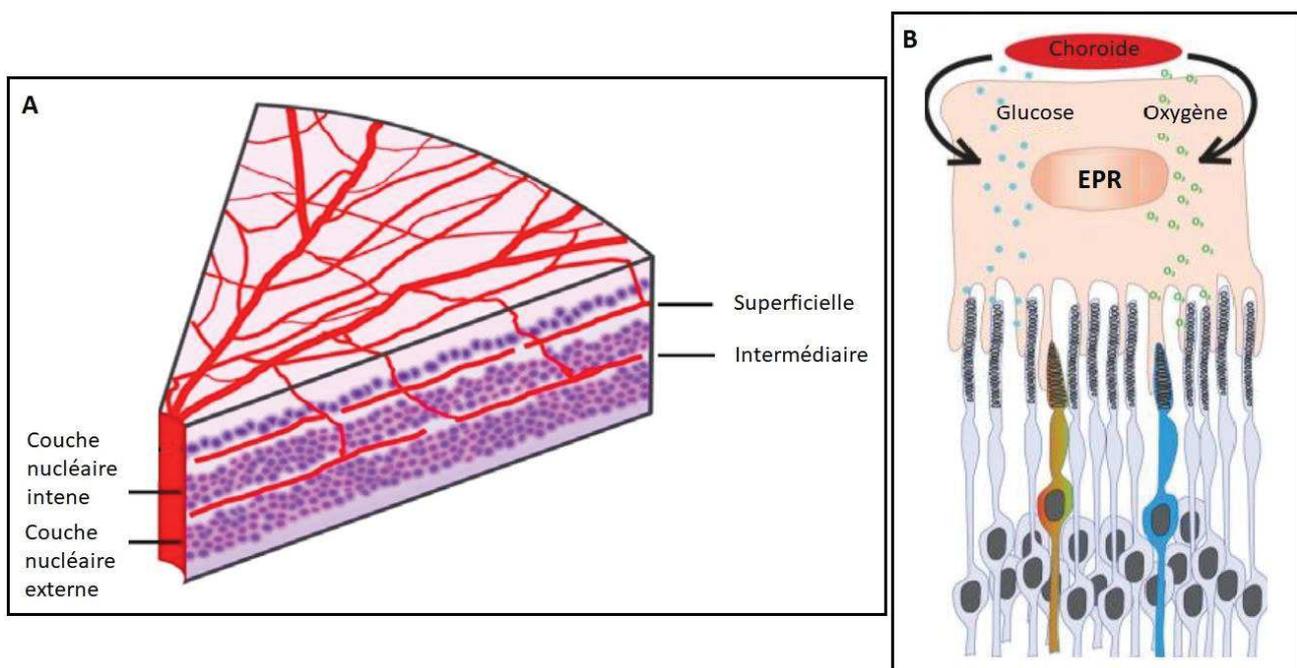
Les ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  situées sur le pôle apical de l'EPR permettent de créer un gradient ionique favorisant le passage des ions et de l'eau. L'eau sera éliminée de la matrice vers la choroïde par le passage à travers des pores perméables : les aquaporines-1 (AQP1). Les aquaporines-1 situées sur les membranes apicales et basales des cellules de l'EPR, permettent l'adhésion de la neurorétine à celui-ci (42).

## 2.2.2 La circulation des nutriments et de l'oxygène

Les photorécepteurs sont les cellules du corps humain les plus consommatrices d'énergie (43). L'apport en oxygène et en nutriments est donc particulièrement important pour assurer les fonctions physiologiques de ces cellules. Seules les couches superficielles de la neurorétine sont vascularisées: les cellules bipolaires, les interneurones, les cellules gliales de Müller et les cellules ganglionnaires (**Figure 12A**). Cet apport est effectué par deux systèmes distincts:

\*Le premier système assure un apport aux cellules avoisinantes.

\*Un deuxième système d'apport est assuré par la choroïde puis l'EPR qui va acheminer l'oxygène et les nutriments jusqu'à la MIP et les PR (**Figure 12B**).



*Figure 13: Apport du glucose et de l'oxygène aux photorécepteurs*

*(A) Vascularisation rétinienne des couches cellulaires superficielles et intermédiaires. Schéma adapté d'une figure de (44).*

*(B) Source des apports en glucose et en oxygène des photorécepteurs. Source schéma adapté d'une figure de (45).*

### 2.2.3 La phagocytose

Le processus de phagocytose des SE des PR par l'EPR est indispensable pour leur fonctionnement. Le taux de renouvellement complet du SE des bâtonnets est estimé à 10j (46) contre 16j pour celui des cônes (47). Ce processus de phagocytose possède certaines similarités avec le processus de phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages. En effet, les SE des PR et les cellules en apoptose expriment des signaux « *eat me* » similaires. Pour la rétine, ces signaux sont exprimés dans la MIP et reconnus par les cellules de l'EPR (48). Les principaux signaux de reconnaissance « *eat me* » sont l'expression de PhosphatidylSérines (PtdSer) par les PR, l'expression de la calréticuline extracellulaire et le changement de charge et de glycosylation de certaines molécules à la surface cellulaire (49). L'EPR présente à sa surface apicale des récepteurs reconnaissant les PtdSer. L'intégrine  $\alpha\beta 5$  ainsi que des récepteurs de la famille TAM (Tyro3, Axl et Mer) sont exprimés sur toute la longueur des microvillies, au niveau de la MIP (50). Les principaux récepteurs de la famille TAM exprimés sont MerTK (Mer tyrosine kinase) et Tyro3 (51).

Les PtdSer à la surface des PR, peuvent être reconnus de façon directe ou indirecte, par les récepteurs membranaires exprimés à la membrane de l'EPR :

\*Des interactions directes par les récepteurs CD14, CD36, SR-BA1 et SR-B2 (récepteurs de la famille des « scavengers »)(52) (53).

\*Des interactions indirectes via des protéines solubles présentes dans la matrice, permettant la formation d'un pont entre les PtdSer et les récepteurs membranaires de l'EPR. Les interactions indirectes connues : L'intégrine  $\alpha\beta 5$  est capable de lier la protéine soluble matricielle MFG-E8, qui liera PtdSer (54).

La protéine S et la protéine Gas6 sont également des ligands solubles de la matrice, permettant la formation de ponts entre les SE des PR et l'EPR (55).

A noter que la phagocytose rétinienne est soumise à un rythme circadien. La phagocytose des bâtonnets chez la souris présente un pic d'activité le matin. Il a été montré que le nombre de phagosomes à l'intérieur des cellules de l'EPR était à peu près 4 fois plus important chez la souris entre 30mn et 2h après exposition des animaux à la lumière (éclairage de l'animalerie) (15). Ce

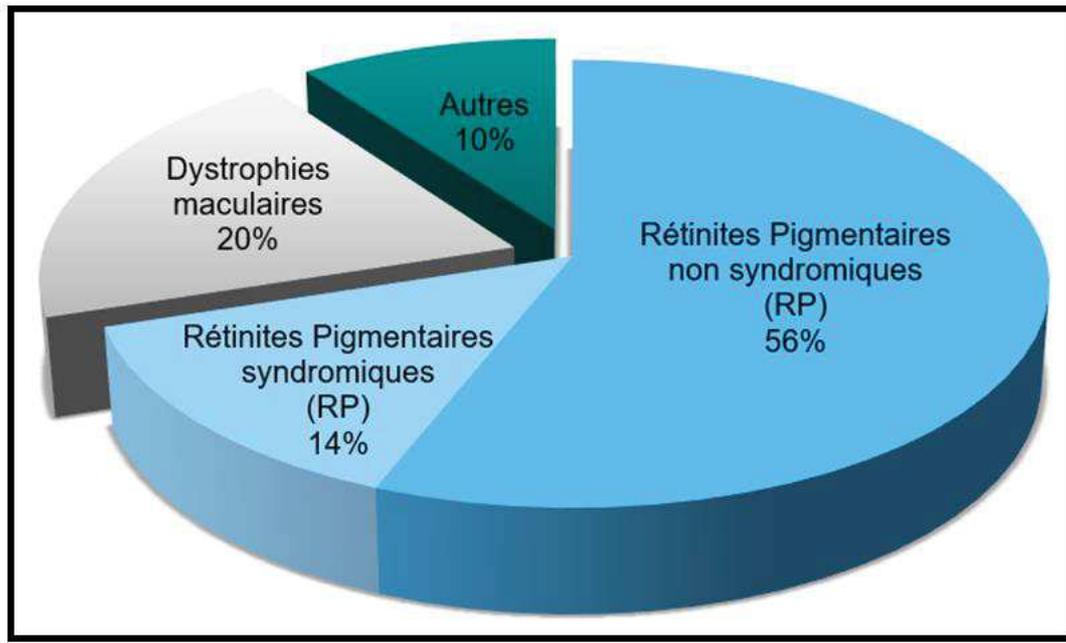
rythme ne dépend pas de la lumière; des souris laissées en permanence dans le noir expriment une concentration maximale de PtdSer au niveau de la partie distale des SE à phagocyter: le matin. Le rythme de la phagocytose est complètement dérégulé chez les modèles murins transgéniques  $\beta 5^{-/-}$  et MFG-E8<sup>-/-</sup>. Cela suggère que le processus de phagocytose serait initié par les cellules de l'EPR, en modulant l'expression de ces récepteurs au niveau de la MIP (51) et (56).

## CHAPITRE 3 – LES DYSTROPHIES RETINIENNES HEREDITAIRES NON SYNDROMIQUES

Les dystrophies rétiniennes héréditaires sont des neurodégénérescences de la rétine ayant une prévalence de 1/2000 dans le monde (57). Ce sont des maladies génétiques mendéliennes évolutives entraînant la dysfonction puis, dans la plupart des cas, la mort cellulaire; notamment des PR et des cellules de l'EPR (58).

Les dystrophies rétiniennes héréditaires sont caractérisées par une grande hétérogénéité à la fois clinique et génétique. On distingue cependant deux grands sous type parmi ces atteintes, les formes généralisées (3.1) et les formes maculaires (3.2) selon la localisation des zones de la rétine atteinte. Toutes ces dégénérescences conduisent progressivement à une déficience visuelle pouvant aller jusqu'à la cécité pour les formes les plus sévères.

La classification de ces maladies génétiques rares est complexe, elles peuvent être syndromiques ou non syndromiques (**Figure 13**). Une dystrophie rétinienne héréditaire syndromique se caractérise par une atteinte visuelle associée à des symptômes extra-oculaires (audition, neurologie, néphrologie, hématologie, dermatologie etc...). Par exemple, le syndrome de Bardet-Biedl associe une rétinite pigmentaire (RP) à différentes atteintes telles que l'obésité, la polydactylie, une néphropathie et un retard mental. Seules les formes non syndromiques des dystrophies héréditaires seront abordées dans ce manuscrit.



*Figure 14: Fréquence des dystrophies héréditaires (centre de référence de Montpellier)*

1957 patients (des CAS) consultés à Gui de CHAULIAC  
Source (iconographie de la thèse du Professeur I.MEUNIER)

## 3.1 LES DYSTROPHIES RETINIENNES HEREDITAIRES GENERALISEES

### 3.1.1 La rétinite pigmentaire

Le nom de *retinitis pigmentosa* (RP) a été proposé pour la première fois en 1855 par le professeur de médecine néerlandais Franciscus CORNELIS DONDERS. Il a décrit une affection cécitante caractérisée par des dépôts pigmentaires prenant l'aspect d'ostéoblastes en fond d'œil. La prévalence de la rétinite pigmentaire est de 1 sur 3500 personnes. On estime à 40000 le nombre de personnes atteintes en France et près de 2 millions dans le monde (59). Si elle reste une pathologie classée comme rare, la RP est la cause de cécité héréditaire la plus répandue dans les pays développés et représente plus de la moitié des dystrophies rétiniennes héréditaires.

La RP est caractérisée par une perte progressive des PR de type bâtonnet et un dysfonctionnement de l'EPR, associés à des dépôts pigmentaires visibles en fond d'œil (**Figure 14**). Dans les formes les plus évoluées, les cônes sont également affectés par la maladie qui peut évoluer jusqu'à la cécité. La grande hétérogénéité phénotypique et génotypique des RP rend difficile la prédiction de son évolution.

Une multitude de signes et symptômes cliniques caractérisent la RP. Le symptôme le plus précoce étant l'héméralopie (ou perte de la vision nocturne), suivi d'une baisse de l'acuité visuelle et d'un rétrécissement progressif du champ visuel de façon concentrique, la vision centrale est généralement préservée jusqu'aux derniers stades du processus de la maladie (60). Dans les formes les plus sévères, la perte de la vision centrale provoque la cécité totale. Cette évolution se fait sur plusieurs dizaines d'années. L'électrorétinogramme (ERG) est l'examen clinique permettant de diagnostiquer le plus précocement la pathologie : il consiste à analyser la réponse électrique de la rétine à une stimulation lumineuse (**Figure 14**). Une perte de la discrimination précise des couleurs (dyschromatopsie), une photopsie (apparition de flashes lumineux) due à une privation sensorielle sont parfois observées chez le patient (61).

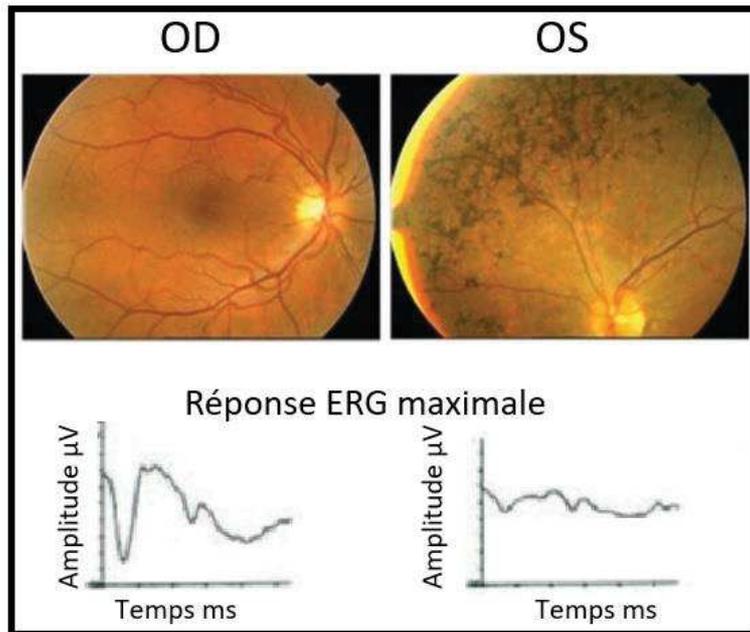


Figure 15: Phénotype classique de rétinite pigmentaire

Phénotype d'un patient sain (Oculus Dexter : œil droit) et d'un patient atteint de rétinite pigmentaire (Oculus Sinister : œil gauche)

Source : données adaptées d'une figure de (62)

Génétiquement hétérogène, il existe plus de 90 gènes responsables de RP identifiés (base de données *Retinal Information Network*, RetNet, chiffres datant du 07/10/2020). Trente gènes pour les RP autosomiques dominantes (RPad), 63 pour les RP autosomiques récessives (RPar) et 3 pour les formes liées à l'X, et dans de très rares cas, un digénisme associant *PRPH2* et *ROM1* a été observé (63). A noter que certains gènes sont impliqués dans les deux formes autosomiques, comme par exemple *RP1*, *NR2E3* ou *RHO*.

Malgré le nombre important de gènes associés à la RP, il est important de noter que l'identification d'un variant pathogène dans ces gènes connus permet d'établir un diagnostic génétique pour environ 70% des cas (64). Notre connaissance génétique de cette affection est donc loin d'être complète, d'où l'intérêt de procéder aux analyses génétiques des patients sans diagnostic génétique.

Pour les formes liées à l'X, deux gènes majeurs (*RPGR* et *RP2*) représentent plus de 80 % des cas.

### 3.1.2 La dystrophie cônes bâtonnets

Plus rare que la RP (1/40.000), la dystrophie cônes bâtonnets (*cone rod dystrophy*, CRD en anglais), appelée également RP à cônes dominant, est une forme de RP avec des signes inauguraux inverses. En effet, c'est l'atteinte des cônes qui précède ou qui est concomitante avec l'atteinte des bâtonnets (65).

Cela se caractérise en fondocopie par des dépôts pigmentaires majoritairement au niveau de la région maculaire de la rétine. Contrairement à la RP, la baisse d'acuité visuelle est le signe inaugural dans les CRD. L'apparition d'un scotome central, une photophobie et une altération de la vision des couleurs surviennent par la suite (66). La dystrophie cônes bâtonnets est souvent bien plus sévère et plus rapide que la RP « classique » et conduit donc plus rapidement à la cécité (65). Le diagnostic de ce type de RP est basé sur des examens cliniques tels que : la fondoscopie, l'électrorétinogramme et la Tomographie en Cohérence Optique (OCT).

Il faut noter que dans de rares cas, seuls les cônes sont affectés : la dystrophie pure des cônes (COD). Les patients atteints de COD présentent de grandes variabilités de sévérité. Ils peuvent avoir un fond d'œil d'aspect normal, surtout aux stades débutants puis présenter au fil de la neurodénégénération une baisse de l'acuité visuelle, de la perception des couleurs et une photobie. Les patients COD ou CRD ne présentent pas toujours de migration pigmentaire et peuvent avoir un fond d'œil normal avec une errance diagnostic, avant la réalisation de l'ERG et/ou SD-OCT (67).

Dix gènes sont responsables de CRD ou COD autosomiques dominantes, 23 gènes pour les transmissions autosomiques récessives et 2 pour les formes liées à l'X (base de données *Retinal Information Network*, RetNet, chiffres datant du 07/10/2020).

Le gène *ABCA4* est responsable de 50% des cas autosomiques récessifs, gène également responsable de la maculopathie de Stargardt

**(3.2.1.2).**

### 3.1.3 L'amaurose congénitale de Leber (rétinite pigmentaire congénitale)

Définie pour la première fois par Théodor LEBER en 1869 et 1871, l'amaurose congénitale de Leber (ACL) diffère de la RP classique par son caractère congénital. La prévalence de l'ACL est de 1/50.000 naissances dans le monde, ce qui représente 5% des dystrophies rétiniennes (68).

L'ACL est caractérisée par une malvoyance sévère dès la naissance, peu ou pas évolutive, avec une quasi-absence de lésion en fond d'œil dans les premiers mois de vie. Les électrorétinogrammes (scotopique et photopique) sont sévèrement réduits quelques mois après la naissance (69). Des signes oculaires peuvent apparaître tels que des picotements, des frottements et / ou des pressions des yeux (70). Des personnes atteintes d'ACL peuvent également présenter des réactions pupillaires lentes, un nystagmus pendulaire et/ou une photophobie.

L'hétérogénéité génétique est également importante, 3 gènes sont responsables d'ACL autosomiques dominantes et 23 gènes pour les transmissions autosomiques récessives (base de données *Retinal Information Network*, RetNet, chiffres datant du 07/10/2020).

Par ordre d'importance, les gènes *CEP290*, *CRB1*, *GUCY2D* et le gène *RPE65* sont les plus représentés (<50% des cas). (**Figure 15**).

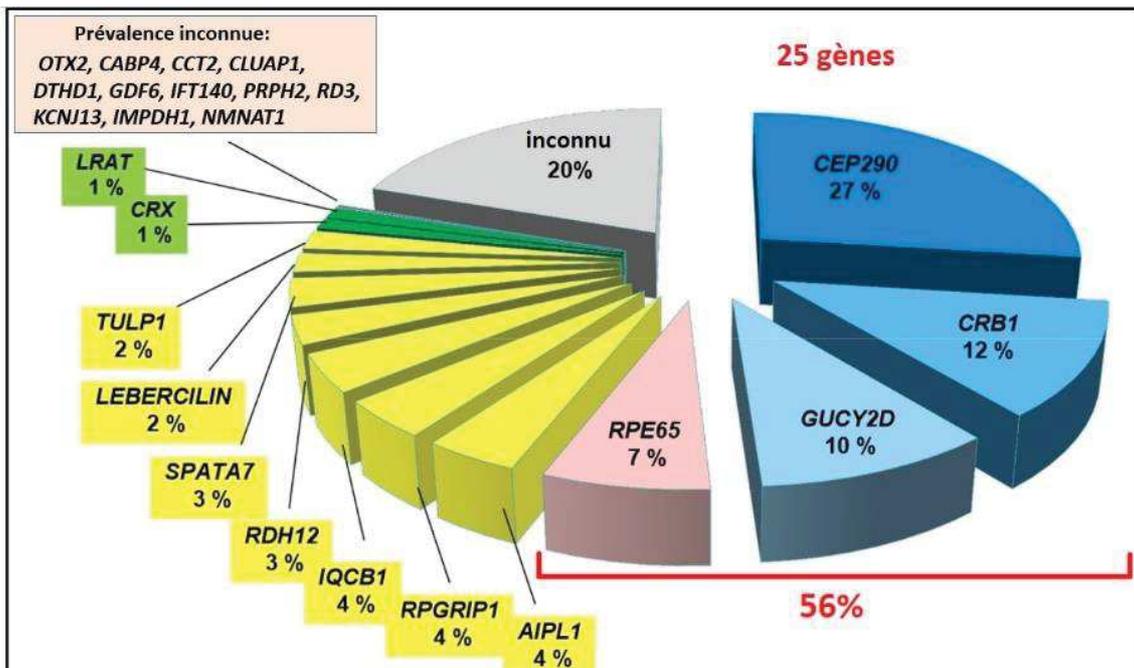


Figure 16: hétérogénéité génétique de l'amaurose congénitale de Leber

Les principaux gènes responsables de l'ACL.

Données de KAPLAN, DEN HOLLENDER, DE BAERE, STONE et HAMEL (chiffres mis à jour 2020 (71))

Je tenais à souligner dans ce chapitre le rôle majeur du Prof Christian HAMEL, fondateur de l'équipe vision et de l'Institut des Neurosciences de Montpellier, dans l'identification du gène *RPE65* et son association avec l'ACL (environ 7% des cas d'ACL) (72)(73).

Protéine exprimée dans l'EPR, *RPE65* est une isomérolase du cycle visuel des vertébrés (1.2.2). L'identification par la suite d'un modèle canin porteur de mutation dans *RPE65* a permis de développer le premier traitement pour une dystrophie héréditaire de la rétine. Le LUXTURNA® (commercialisé en Europe par l'industrie pharmaceutique Novartis à partir de 2019) est l'unique traitement validé par une autorisation de mise sur le marché pour le traitement d'une dystrophie rétinienne héréditaire. Médicament de thérapie génique, il est destiné aux adultes et jeunes patients présentant une perte visuelle due à une mutation bi-allélique du gène *RPE65*.

## 3.2 LES DYSTROPHIES RETINIENNES HEREDITAIRES MACULAIRES

La maculopathie se manifeste par une baisse d'acuité visuelle due à une atteinte de la rétine centrale, la périphérie étant relativement préservée. La baisse de l'acuité visuelle est variable en termes de sévérité et d'âge d'apparition des signes cliniques. Dans tous les cas, le patient décrira ses symptômes par une difficulté de reconnaissance des visages, des problèmes pour la lecture et l'écriture. La plupart des maculopathies conduiront au stade d'atrophie, stade final de dégénérescence de l'épargne fovéales (74).

La Dégénérescence Maculaire Lié à l'Age (DMLA) et l'œdème maculaire diabétique sont les 2 principales causes de maculopathies dans les pays développés. Elles ont toutes deux une étiologie multifactorielle. Bien que la DMLA ne soit pas une dystrophie à transmission mendélienne, elle représente la principale cause de malvoyance chez les personnes âgées de plus de 50 ans dans les pays développés et présente des similitudes dans sa présentation avec certains résultats obtenus au cours de mes travaux de thèse.

Les principales maculopathies héréditaires non syndromiques seront présentées dans la suite de ce manuscrit. Bien que multifactorielle, la DMLA sera brièvement décrite (**3.2.1.1**), la maladie de Stargardt qui représente la maculopathie non syndromique majoritaire (**3.2.1.2**) ainsi que la dystrophie maculaire de la Caroline du Nord (**3.2.1.2**) dans les maculopathies sans dépôts vitelliformes (**3.2.1**). Les maculopathies avec dépôts vitelliformes (**3.2.2**) causées par le gène *BEST1*, *PRPH2*, *IMPG1* ou *IMPG2* seront plus détaillées et clôtureront l'introduction de ce manuscrit.

### 3.2.1 Les dystrophies maculaires sans dépôt vitellin

#### 3.2.1.1 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), hérédité complexe

La DMLA est une maladie multifactorielle, c'est-à-dire qui implique à la fois des facteurs de risques génétiques et l'environnement. La pathogénie de cette maladie reste encore à élucider. Parmi les facteurs environnementaux favorisant l'incidence de l'apparition de la maladie avec l'âge, le tabagisme semble prépondérant (75). Des études génétiques d'associations ont mis en évidence des facteurs de risques génétique dans de nombreux gènes (Complement Factor H : *CFH*, *ARMS2*) (75,76).

Deux formes de DMLA existent (**Figure 16**):

\*La forme « sèche » ou « atrophique » correspond à une accumulation de matériel sous l'EPR. Ce matériel appelé drusen, est composé de glycolipides. Ce sont ces débris lipidiques anormaux à l'interface entre la choroïde et l'EPR, qui entraînent leur dégénérescence. Dans 10% des cas la DMLA sèche évoluera vers la forme humide.

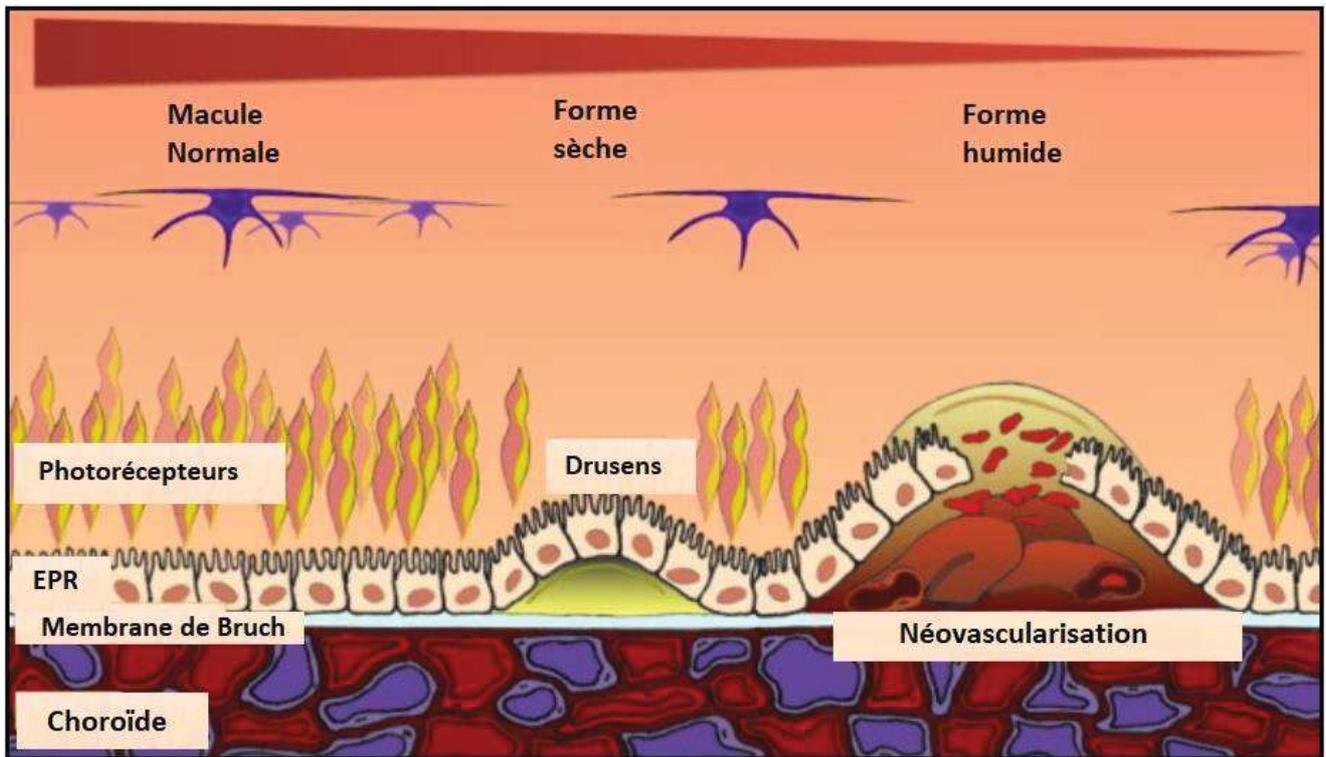
\*La forme « humide » ou « exsudative » se caractérise par la formation de néovaisseaux anormaux sous rétiniens. Ces néovaisseaux choroïdiens laissent échapper des fluides qui vont perturber l'équilibre osmotique de la rétine (des hémorragies peuvent avoir lieu) et provoquer un soulèvement de la neurorétine.

On distingue 2 types de néovaisseaux choroïdiens:

-Les néovaisseaux de type 1, sous-épithéliaux, dit « occultes ». Ils vont se développer sous l'EPR (cas le plus fréquent).

-Les néovaisseaux de type 2, pré-épithéliaux, dit « visibles ». Ils se développent sur l'EPR et vont provoquer une baisse plus rapide de l'acuité visuelle (en cas de non prise en charge).

Un traitement est disponible pour cette deuxième forme et consiste-en des injections intra-vitréennes d'anti-VEGf (facteur anti angiogénique).



*Figure 17: Formes de la dégénérescence maculaire lié à l'âge*

*A gauche du schéma une macula à fonctionnement normal.*

*Au centre du schéma l'apparition d'une DMLA sèche avec apparition de drusens entre la membrane de Bruch et les cellules de l'EPR.*

*A droite du schéma, une DMLA humide avec production de néovaisseaux entrainant une fuite de fluide.*

*Schéma adapté d'une figure de (77)*

### 3.2.1.2 La maladie de Stargardt (dystrophie maculaire à hérédité mendélienne)

Karl STARGARDT décrit pour la première fois en 1909 une dystrophie maculaire héréditaire atypique, la maladie de STARGARDT. Elle représente la première cause de maculopathie héréditaire. C'est une maculopathie d'apparition juvénile qui représente 7% des maladies héréditaires et qui a une prévalence de 1/10.000 dans le monde (78). Il décrit une maculopathie bilatérale symétrique avec une présence de dépôts pisciformes jaunâtres autofluorescents (**Figure 17A-17C**).

En 1963, Adolphe FRANCESCHETTI décrit le *fundus flavimaculatus*, une atteinte avec présence de taches jaunâtres lancéolées (arrondies ou pisciformes), péri-maculaire, de la moyenne périphérie accompagnée d'une baisse de la vision centrale (79).

De nos jours, la dystrophie maculaire de STARGARDT et le *fundus flavimaculatus* sont considérés comme faisant partie de la même entité. On aura tendance à évoquer le terme de dystrophie de STARGARDT lorsque les taches apparaissent dès l'enfance et se concentrent au pôle postérieur de l'œil. Ces taches apparaissent de façon concomitante avec une baisse de l'acuité visuelle (80). En revanche, lorsque les taches apparaissent plus tard (à l'âge adulte), et qu'elles se répartissent en moyenne périphérie, on classera plutôt l'affection dans l'entité des *fundus flavimaculatus*.

Dans les cas de *fundus flavimaculatus*, la fovéa peut aussi être épargnée une certaine durée et donc permettre un maintien de l'acuité visuelle. Deux types d'atteintes maculaires sont donc possibles dans cette entité pathologique : l'atrophie maculaire avec une altération de l'EPR (plus des ¾ des cas) ou une atteinte par des lésions pisciformes (81).

Deux gènes sont responsables de Stargardt-like autosomiques dominants (*PROM1* et *ELOVL4*) et 1 gène à transmission autosomique récessif *ABCA4* (base de données *Retinal Information Network*, RetNet, chiffres datant du 07/10/2020).

*ABCA4* (*ATP binding cassette* sous famille A, membre N°4) est un gène composé de 50 exons, qui code une protéine localisée dans la membrane des disques des PR. *ABCA4* est une flippase

nécessaire au transfert du tout-trans rétinol de la lumière des disques des photorécepteurs, vers leur cytoplasme (82). Des mutations du gène *ABCA4* entraînent une accumulation de tout-trans rétinol et la formation de dimères d'A2PEHE stables, dans la lumière des disques (83). L'A2PEHE va alors être internalisé et stocké sous forme dimérique à l'intérieur de l'EPR après phagocytose (**Figure 17B**). Une partie de ces dimères va être partiellement dégradée par les phagolysosomes de l'EPR; et l'autre partie non ou mal dégradée conduira à une accumulation intracellulaire de dérivés tels que l'A2E. L'A2E est une molécule toxique pour les cellules de l'EPR, elle est un des constituants de la lipofuscine: composé autofluorescent (**Figure 17D**) (84).

Comme pour les rétinopathies, il n'existe pas de traitement pour la maladie de STARGARDT. La prise en charge thérapeutique du patient se limite à se protéger des rayonnements lumineux intenses (lunettes de soleil, visièrre) et à abaisser la prise alimentaire de vitamine A.

Les perspectives thérapeutiques visent la synthèse de molécules antioxydantes et des inhibiteurs du cycle visuel afin de limiter l'accumulation d'A2E.

Malgré les difficultés dues à la grande taille du gène *ABCA4*, des essais de thérapies génétiques sont actuellement en cours (85,86).

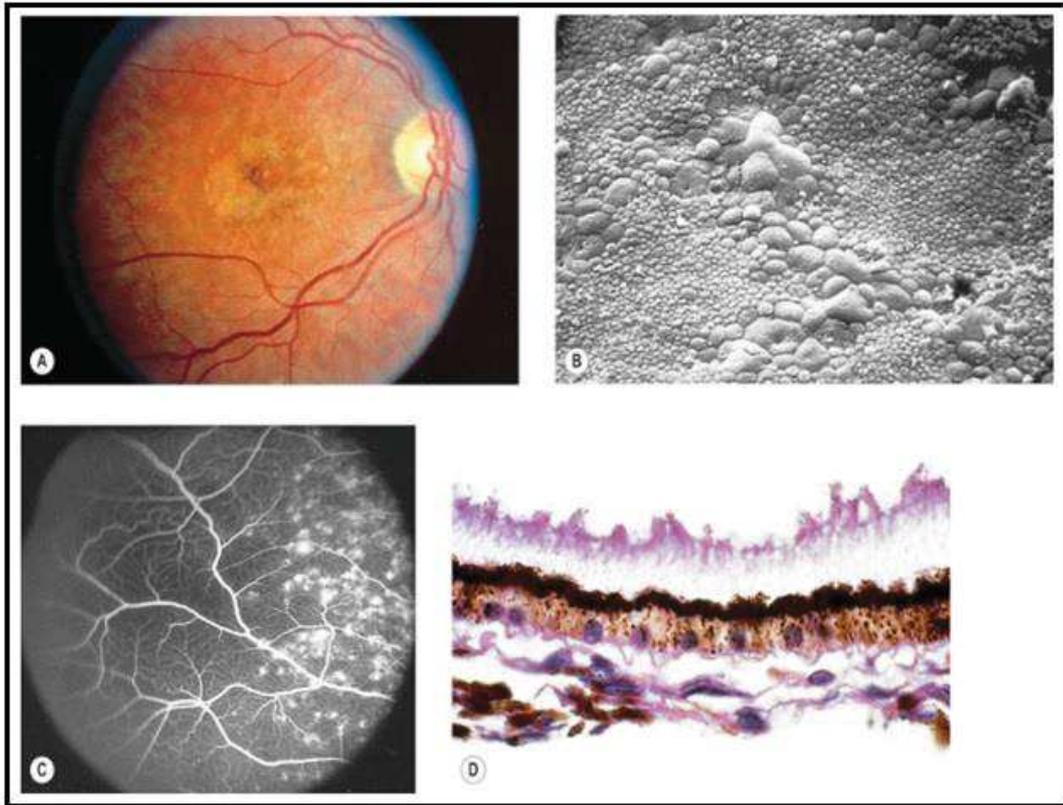


Figure 18: Dystrophie maculaire de Stargardt

(A) Taches caractéristiques jaunâtres (flecks) et zone d'atrophie péri-fovéolaire des cellules de l'EPR.

(B) Photo de microscopie électronique à balayage d'un œil énucléé, d'un patient Stargardt apparenté au patient en A. Présence d'agrégats pisciformes irréguliers d'énormes cellules d'épithélium pigmentaire rétinien, entourées d'une mosaïque de cellules de l'EPR plus petites et relativement normales.

(C) Angiographie à la fluorescéine réalisée sur le patient montré en A. Amortissement caractéristique de la fluorescence choroïdienne de fond (fond sombre).

(D) Coupe histologique de l'œil du patient B, effet de la fluorescéine provoqué par des cellules de l'EPR contenant de la lipofuscine, qui agissent comme un filtre fluorescent.

Source (87)

#### 3.2.1.4 La dystrophie maculaire de la Caroline du Nord

L'ophtalmologiste américain W.H LEFLER décrit pour la première fois en 1971, la dystrophie maculaire de la Caroline du Nord. Cette affection est une maculopathie bilatérale, symétrique, avec une atrophie des différentes couches cellulaires de la rétine; sa prévalence est de 1/200.000 en France.

Congénitale ou infantile, cette pathologie n'évolue pas ou très peu jusqu'à l'âge de 20 ans avant de se stabiliser et prendre l'aspect d'un pseudo colobome au niveau maculaire (**Figure 18**). Le médecin John Donald GASS lui donne le nom de dystrophie maculaire de la Caroline du Nord (*North carolina macular dystrophy*, NCMD) en raison de l'effet fondateur des premières familles observées dans l'état de Caroline du Nord (88).

Il existe trois stades :

Stade 1 : de petites taches blanchâtres sont visibles autour de la macula (évoquant des drusens).

Stade 2 : ces taches convergent vers la fovéa.

Stade 3 : les taches dépassent l'aire maculaire, une atrophie aréolaire pseudo-colobomateuse est visible et on observe l'apparition d'une pigmentation.

La baisse de l'acuité visuelle est variable allant de 6/10 au stade 1, à seulement 1/10 au dernier des stades (89).

La transmission de la pathologie est exclusivement autosomique dominante. Les deux gènes responsables de la Caroline du Nord sont: *PRDM13* pour le locus MCRD1 et *IRX1* pour MCDR3 (90) (base de données *Retinal Information Network*, RetNet, chiffres datant du 07/10/2020). La pénétrance de cette maladie est totale et son expressivité variable.

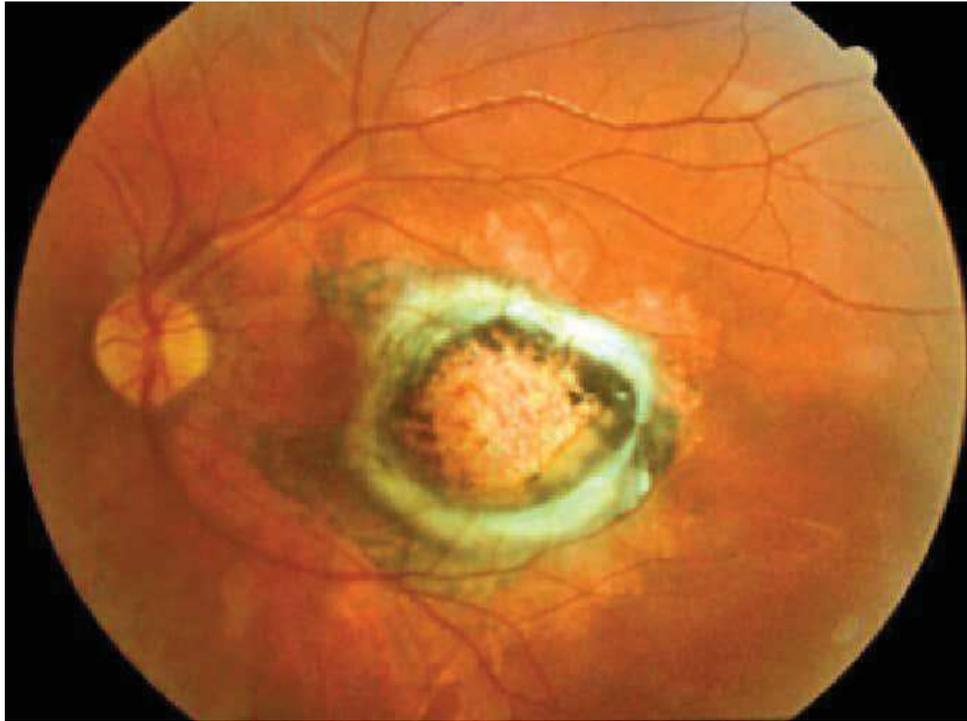


Figure 19: Dystrophie maculaire de la Caroline du Nord

*Fond d'œil d'un enfant avec champs visuel périphérique normal, scotome central de 10 à 15°. Electrorétinogramme d'amplitude normale en photopique et scotopique. Acuité visuelle de 2,5/10 à droite et compte les doigts à gauche  
Source (88)*

### 3.2.2 Les dystrophies maculaires héréditaires avec dépôts vitellins autofluorescents

Les dystrophies maculaires vitelliformes (DMV) forment un sous-groupe de dystrophie maculaire (DM) qui se caractérisent par des dépôts ronds et jaunâtres au niveau maculaire. Apparaissant généralement dans l'enfance, ces produits de dégradation cellulaire appelés lipofuscine, entraînent une baisse de l'acuité visuelle. Ces dépôts sont localisés entre la neurorétine et la partie apicale ou basale de l'EPR. Il existe plusieurs stades d'évolution de la maladie (**Figure 19**) :

*(A) Fondoscopie au stade prévitellin.*

*(B) Fondoscopie au stade vitellin.*

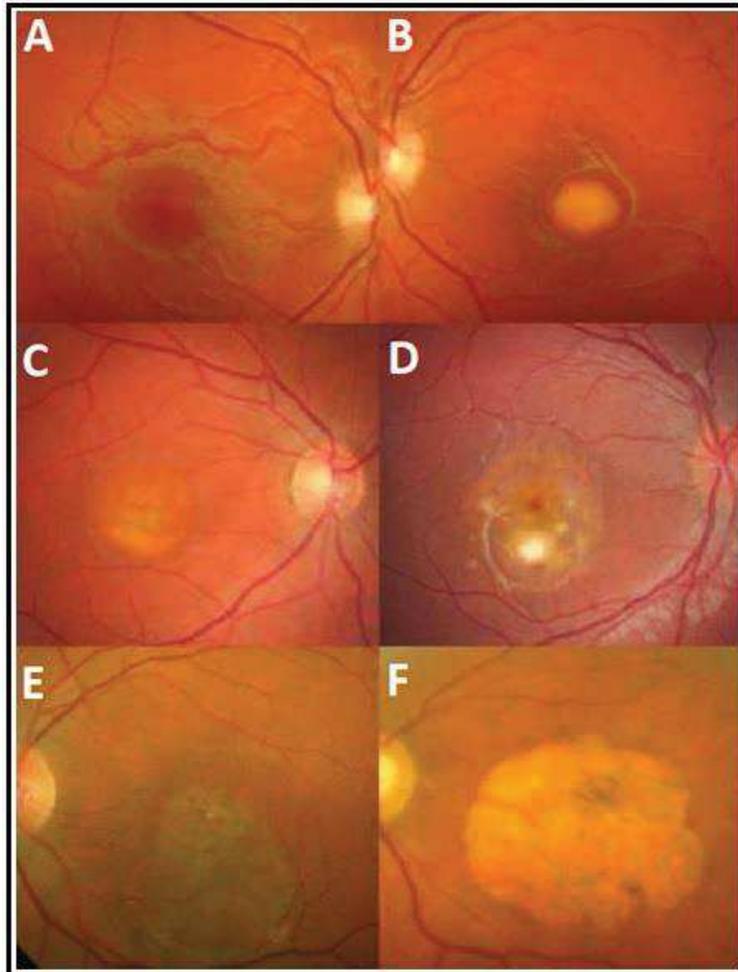
*(C) Fondoscopie au stade de fragmentation avec pseudo-hypopion.*

*(D) Fondoscopie au stade de fragmentation sans hypopion.*

*(E) Fondoscopie avec résorption et lésions d'altération de l'épithélium pigmentaire rétinien.*

*(F) Fondoscopie au stade de résorption avec atrophie.*

Quelque soit le stade de la pathologie, le matériel maculaire présent est toujours autofluorescent. L'acuité visuelle demeure conservée au stade prévitelliforme, en revanche elle diminue lorsque le disque vitelliforme apparaît. A l'étape de fragmentation du matériel accumulé, la macula prendra l'allure d'œuf brouillé, l'acuité visuelle sera alors nettement atteinte.



*Figure 20: Evolution des différents stades associés à des lésions vitelliformes*

*(A) Fondoscopie au stade prévitellin.*

*(B) Fondoscopie au stade vitellin.*

*(C) Fondoscopie au stade de fragmentation avec pseudo-hypopion.*

*(D) Fondoscopie au stade de fragmentation sans hypopion.*

*(E) Fondoscopie avec résorption et lésions d'altération de l'épithélium pigmentaire rétinien.*

*(F) Fondoscopie au stade de résorption avec atrophie.*

*Source (91)*

On distingue la forme juvénile (DMVJ) ou *maladie de Best* et les formes adultes (DMVA). La maladie de Best est causée par des mutations dans le gène *BEST1* (3.2.2.1), la DMVA a pour cause une mutation dans les gènes *PRPH2* (3.2.2.2), *IMPG1* (3.2.2.3), ou *IMPG2* (3.2.2.4).

### 3.2.2.1 La dystrophie maculaire de Best

ADAMS en 1883, puis le docteur Friedrich BEST en 1905 décrivent une dystrophie maculaire génétique bilatérale. Appelée plus tard: dystrophie maculaire vitelliforme (DMV), cette maculopathie à début juvénile (5 à 13 ans) a une prévalence de 1/20000 (92,93).

Les patients présentent une baisse d'acuité visuelle due à une atteinte de la rétine centrale. Les symptômes se traduisent par des difficultés de reconnaissance des visages, des problèmes de lecture et d'écriture, une anomalie de discrimination des couleurs et une métamorphopsie. Cependant, la vision périphérique et l'adaptation à l'obscurité sont conservées.

L'atteinte maculaire est visible à la fondoscopie ; le test d'électro-oculogramme (EOG) est le principal test diagnostique de la dystrophie maculaire de Best.

Après un temps d'obscurité (absence de stimulation), une stimulation lumineuse de longue durée est délivrée à la rétine ; elle permet aux bâtonnets de fonctionner en continu. Le fonctionnement normal des bâtonnets déclenche une série de modifications qui passent par la membrane apicale de l'EPR, puis génèrent une dépolarisation transitoire de la membrane basale par ouverture de ses canaux chlore. Suivre au cours du temps les variations de potentiels de la membrane basale est un moyen de détecter le dysfonctionnement de l'EPR (94).

Le gène responsable de la dystrophie maculaire de Best : *BEST1* (anciennement appelé *VMD2*), a été identifié en 1998 (95). La transmission est presque exclusivement autosomique dominante (91), même si il existe également de rares formes autosomiques récessives impliquant des variants *BEST1*. Le gène *BEST1*, situé sur le chromosome 11q12, est composé de 11 exons, de 2210 pb et 585 acides aminés. Il code une protéine de 68 kDa, la Bestrophine 1, exprimée au niveau de la membrane basale de l'EPR et dans le système nerveux central (96) (**Figure 20**).

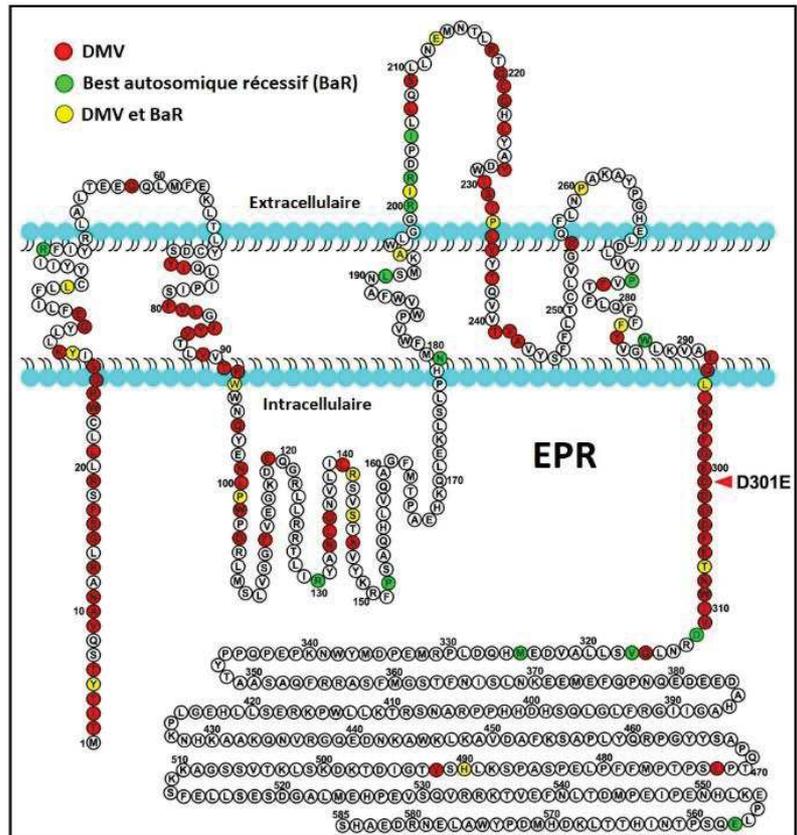


Figure 21: Structure de la Bestrophine-1 humaine

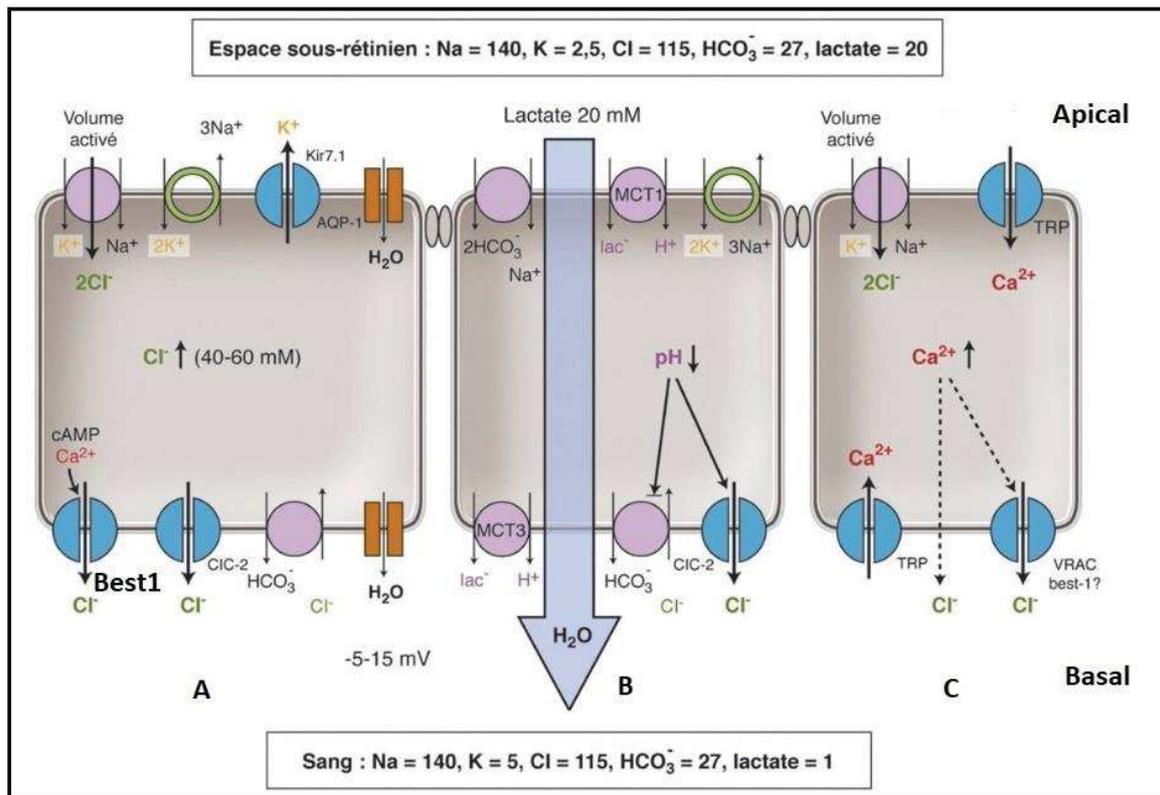
*BEST1, protéine de l'épithélium pigmentaire rétinien à 4 domaines transmembranaires. 585 acides aminés représentés par des cercles, les cercles colorés représentent les mutations pathogènes chez l'humain.*

*Beaucoup de mutations causales sont situées dans la partie cytosolique, adjacente aux 4 domaines transmembranaires*

*Schéma adapté d'une figure de (97)*

La bestrophine-1 comporte 4 domaines transmembranaires: deux courts segments extracellulaires et 3 segments intracellulaires (**Figure 20**). Elle appartient à la famille protéique des RFP-TM (Arginine-Phénylalanine-Proline tripeptide motif), une famille protéique de canaux anioniques. Elle possède un domaine transmembranaire de 350 à 400 acides aminés très conservé au cours de l'évolution avec un motif peptidique RFP invariable.

Bestrophine1 est une protéine formant un canal chlore voltage dépendant, située sur la membrane basale de l'EPR. Elle joue un rôle très important dans l'homéostasie ionique de la cellule et la régulation de la signalisation calcique de l'EPR (**Figure 21**).



*Figure 22: Transport trans-épithélial*

(A) Transport d'H<sub>2</sub>O de chlore du pôle apical vers le pôle basal de la cellule de l'EPR via un transport actif de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup>, ce transport actif d'ions entraîne une sortie d'eau de la neurorétine vers la choroïde.

(B) Changement de pH via les transporteurs Na<sup>+</sup> et HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> qui activent les transporteurs monocarboxylates MCT1 et MCT3 qui permettent l'élimination du lactate et de l'eau.

(C) Les canaux Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> et Cl<sup>-</sup> sensibles au changement de volume des cellules provoquent une modification du calcium intracellulaire.

Schéma adapté d'une figure de (98)

Les mutations pathogènes du gène *BEST1* entraînent une perturbation cette régulation ainsi que du pH de la cellule épithéliale.

Les mécanismes physiopathologiques impliqués par une mutation de ce gène ne sont pas élucidés.

L'accumulation de dérivés lipidiques entre les cellules de l'EPR et la membrane de Bruch est une probable conséquence de cette perturbation de l'homéostasie ionique (99).

De façon similaire aux gènes *PRPH2*, *IMPG1* et *IMPG2*, une mutation du gène *BEST1* peut causer une RP (100).

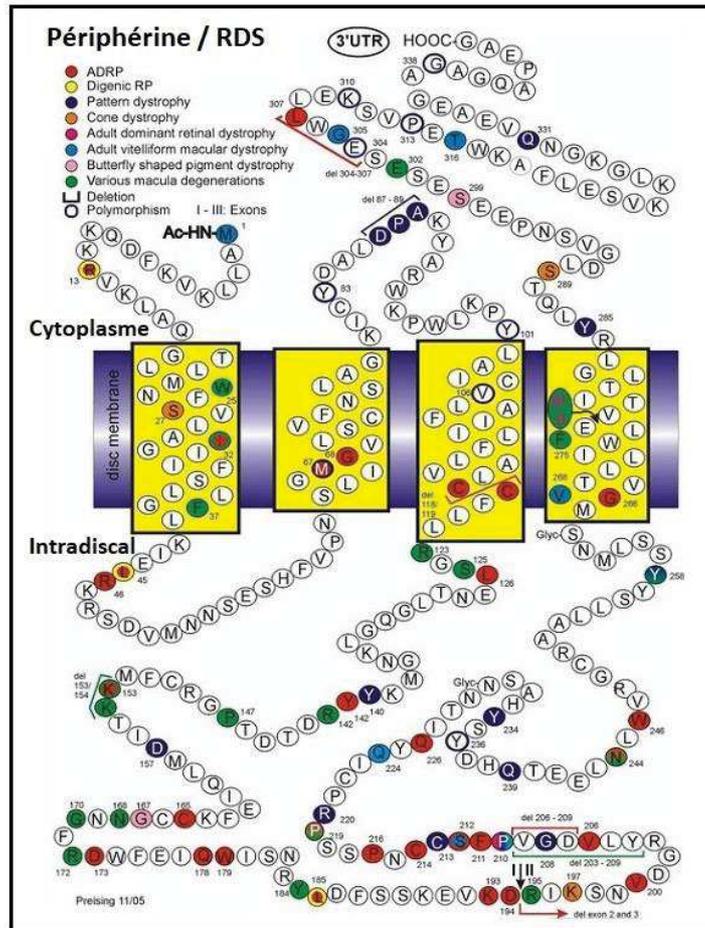
### 3.2.2.2 La dystrophie maculaire vitelliforme adulte liée au gène *PRPH2*

Le gène *PRPH2* (anciennement appelé *RDS*, pour *retinal degeneration slow*) a été identifié pour la première fois chez la souris (101) (102). Par la suite, des mutations du gène *PRPH2* chez l'humain ont été associées à des DM ou des RP (103). La DMVA est plus rare que la forme juvénile et débute plus tardivement que la dystrophie de Best ; les patients sont jeunes adultes : entre 20 et 30 ans.

De façon similaire à la dystrophie de Best, les patients DMVA présentent une baisse d'acuité visuelle, des difficultés de reconnaissance des visages et des problèmes de lecture et d'écriture (les patients conservent leur vision périphérique et l'adaptation à l'obscurité).

Le test d'acuité visuelle et la fondoscopie permettent de détecter l'atteinte maculaire. L'électro-oculogramme est normal.

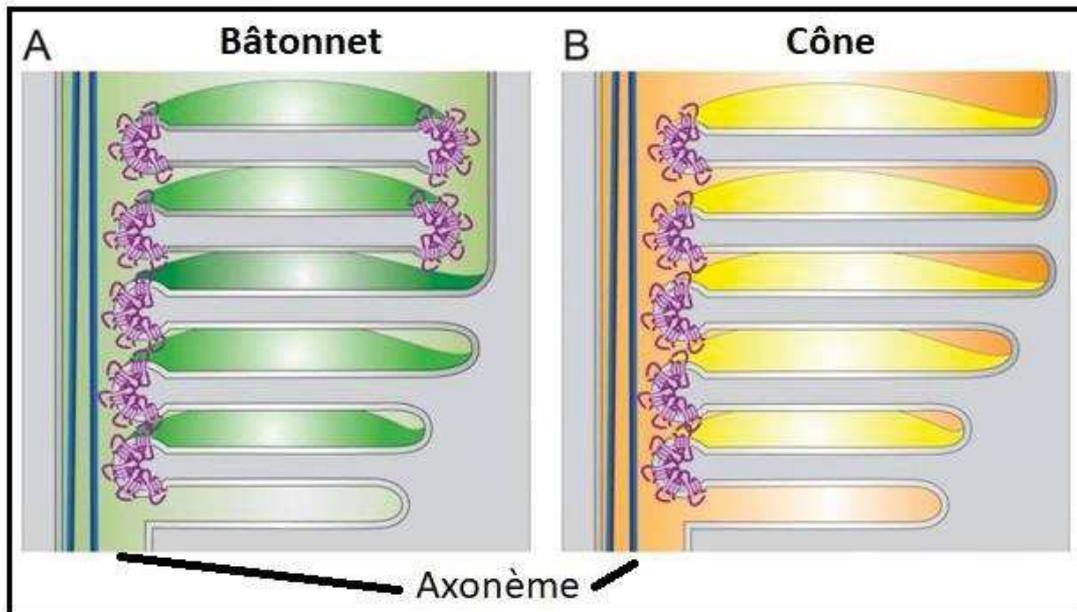
La transmission de la maculopathie est autosomique dominante mais les formes sporadiques sont prédominantes. Le gène *PRPH2* est impliqué dans environ 2 à 18% des cas (104,105). Chez l'humain, le gène *PRPH2* est situé sur le chromosome 6p21. Il possède 3 exons, 346 acides aminés et code une protéine de 39kDa, la périphérine-2, principalement exprimée au niveau des SE des PR. La périphérine-2 est une glycoprotéine à 4 domaines transmembranaires indispensable à la formation des SE des bâtonnets et des cônes (**Figure 22**).



*Figure 23: Domaines fonctionnels et mutations de la périphérine*

*Illustration des mutations connues de la périphérine.  
Schéma adapté d'une figure de (106)*

La périphérine-2 joue un rôle important dans la biogenèse des disques qui composent les SE des PR. Les disques sont synthétisés dans les SI des PR, et par un processus d'évagination, ils passent dans les cils axonèmes pour former le SE (107). Au niveau structurel, les bords fermés du PR représentent le bord du disque du SE en contact avec l'axonème, par opposition, le bord ouvert sera celui opposé au cil connecteur. Lors de la biogenèse des disques, la périphérine est initialement concentrée au niveau du cil connecteur pour se distribuer par la suite du bord fermé jusqu'au bord ouvert (**Figure 23**) (9).



*Figure 24: Localisation de la périphérine au sein des disques des PR*

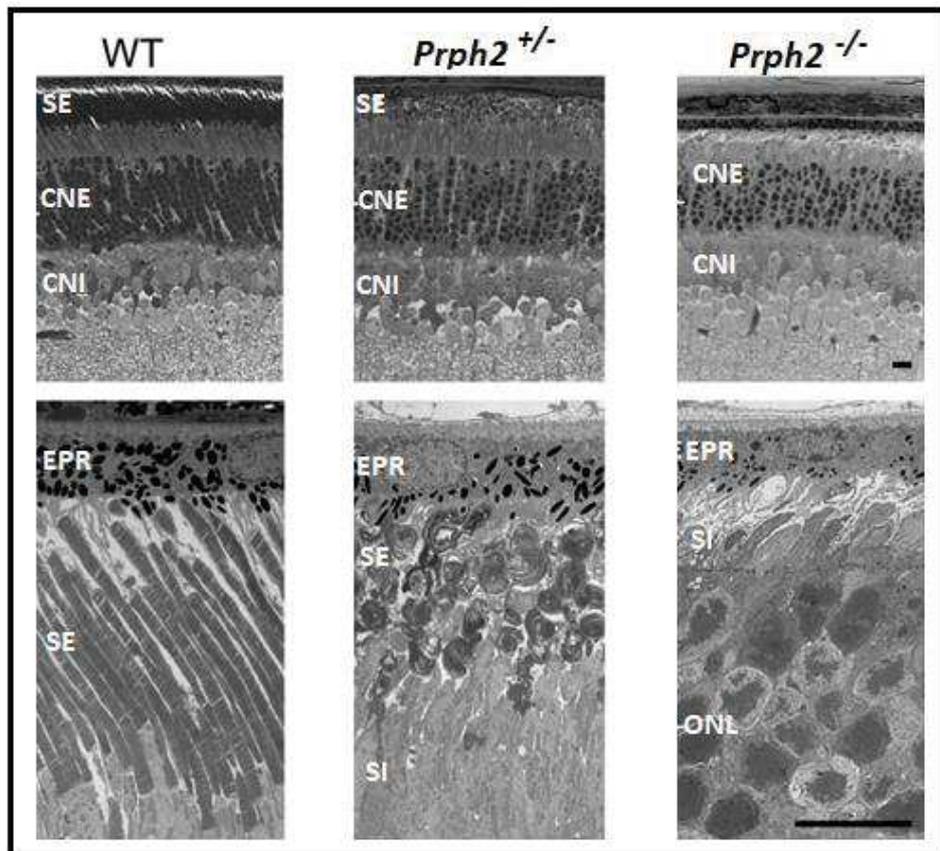
(A) Schéma des segments externes d'un photorécepteur de type bâtonnet

(B) Schéma des segments externes d'un photorécepteur de type cône, en violet la localisation de la périphérine.

Source (106)

Des interactions entre la périphérine-2 et ROM-1 (*retinal outer segment membrane protein 1*) sont nécessaires au sein des SE des PR. Des homotétramères et hétérotétramères se forment pour donner de gros complexes, en bordure des disques, permettant la stabilisation des disques (108). ROM-1 est une protéine de 37 kDa, présentant 35% d'identité avec la périphérine-2 (109). Elle est également localisée en bordure des SE des cônes et des bâtonnets, et comme la périphérine-2, elle fait partie de la super famille des tétraspanines (110).

Le modèle murin *Prph2*<sup>-/-</sup> (**Figure 24**), présente un phénotype sévère, avec une quasi absence de SE des PR à un âge très précoce (30j); un phénotype intermédiaire est observable chez la souris hétérozygote *Prph2*<sup>+/-</sup>.



*Figure 25: Modèle murin Prph2 (30 jours)*

*Forte diminution de l'épaisseur de la couche des SE des PR pour le modèle Prph2 +/-, et disparition totale des SE chez le modèle Prph2 -/.*

*Microscopie électronique à transmission, barre d'échelle 10µM.*

*EPR: épithélium pigmentaire rétinien, SE: segments externes, SI: segments internes, CNE: couche nucléaire externe, CNI: couche nucléaire interne.*

*Schéma adapté d'une figure de (106)*

Outre la DMVA, plusieurs dystrophies rétinienne sont également causées par une mutation du gène *PRPH2*: la RP autosomique dominante (111,112), l'amaurose congénitale de Leber en mode de transmission récessif, la dystrophie cones-bâtonnets (113), et la dystrophie maculaire en forme de papillon (114).

### 3.2.2.3 La dystrophie maculaire vitelliforme adulte liée au gène *IMPG1*

Le gène *IMPG1* (*Interphotoreceptor Matrix ProteoGlycan 1*) fut décrit pour la première fois par WEBER (115). Des mutations du gène *IMPG1* ont tout d'abord été associées à des phénotypes de dystrophies maculaires vitelliformes de l'âge adulte (116) et ensuite à la rétinite pigmentaire (Olivier et al 2020a - Résultat1).

La DMV associée aux mutations dans *IMPG1* est symptomatique à la quarantaine, et tout comme les DMVA associées à *PRPH2*, la neurodégénérescence est lente et modérée (116,117).

Le patient décrit une déficience visuelle modérée tardive, et présente à l'examen du fond d'oeil de petites lésions maculaires vitelliformes bilatérales, des lésions de type drusen pourront y être associées. Le diagnostic est donné principalement, par la présence de ces lésions vitelliformes qui sont autofluorescentes. Contrairement aux DMV causées par les gènes *BEST1* et *PRPH2*, ces dépôts vitelliformes et ces lésions de type drusen sont visualisées par SD-OCT au niveau de la partie apicale de l'EPR. L'OCT révèle une préservation de la réflectivité de l'EPR. L'électro-oculogramme est normal.

La DMVA causée par une mutation du gène *IMPG1* peut être de transmission autosomique dominante ou autosomique récessive (116). La protéine SPACR (SialoProtein Associated with Cones and Rods) fut caractérisée par Joe HOLLYFIELD (118). Elle est formée de 719 acides aminés (150 kDa), elle est codée par le gène *IMPG1* (*Interphotoreceptor Matrix ProteoGlycan 1*). Dans l'espèce humaine, *IMPG1* est situé sur le chromosome 6, il est composé de 3324 pb et comporte 16 exons. SPACR est synthétisée par le PR puis sécrétée dans la MIP. Chez l'humain, les primates supérieurs et le poulet : SPACR est une glycoprotéine (119); elle est un protéoglycane chez la plupart des animaux y compris la souris (120). SPACR contient une séquence peptide signal, un domaine SEA1 et SEA2, ainsi qu'un domaine EGF-like. Elle présente de fortes homologues avec la protéine SPACRCAN (3.2.2.4) dont : un domaine de liaison à des glycosaminoglycane: l'acide hyaluronique et l'héparine sulfate (121) (**Figure 25**).

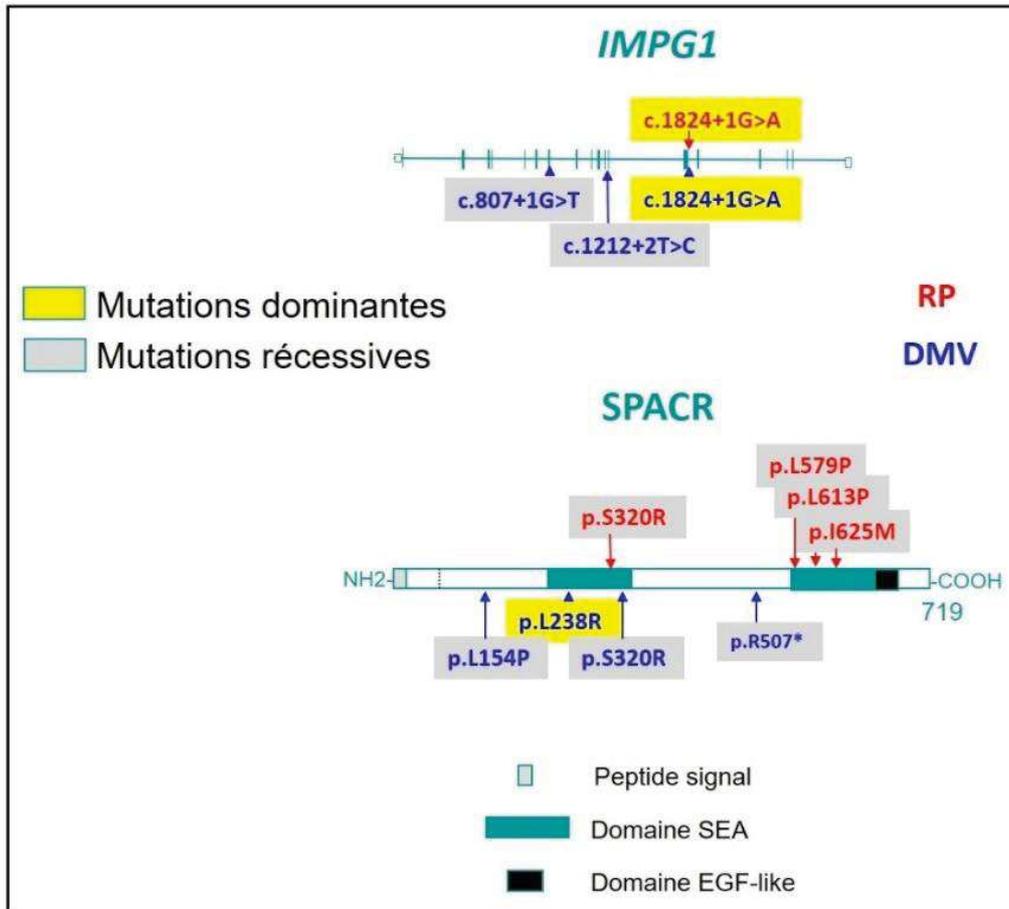


Figure 26: Représentation schématique de la protéine SPACR et gène IMPG1

Les mutations responsables de retinites pigmentaires sont en rouge.  
 Les mutations responsables de dystrophies maculaires vitelliformes sont en bleues.  
 Les transmissions dominantes sont encadrées en jaune et les récessives en gris.  
 Source: Schéma réalisé en recensent les mutations de la bibliographie scientifique

SPACR subit de nombreuses modifications post-traductionnelles. La protéine est hautement sialylée, N et O glycosylée. La masse glucidique de la protéine est estimée à 30% de sa masse totale (122). Plusieurs fonctions sont attribuées à ces modifications post-traductionnelles :

- \*la reconnaissance et l'adhésion cellulaire

- \*la modulation des activités enzymatiques

- \*le transport et l'adressage des protéines

- \*l'ajout de ces glucides permet d'assurer un maintien structural, une ossature nécessaire au bon fonctionnement de la matrice interphotoréceptrice.

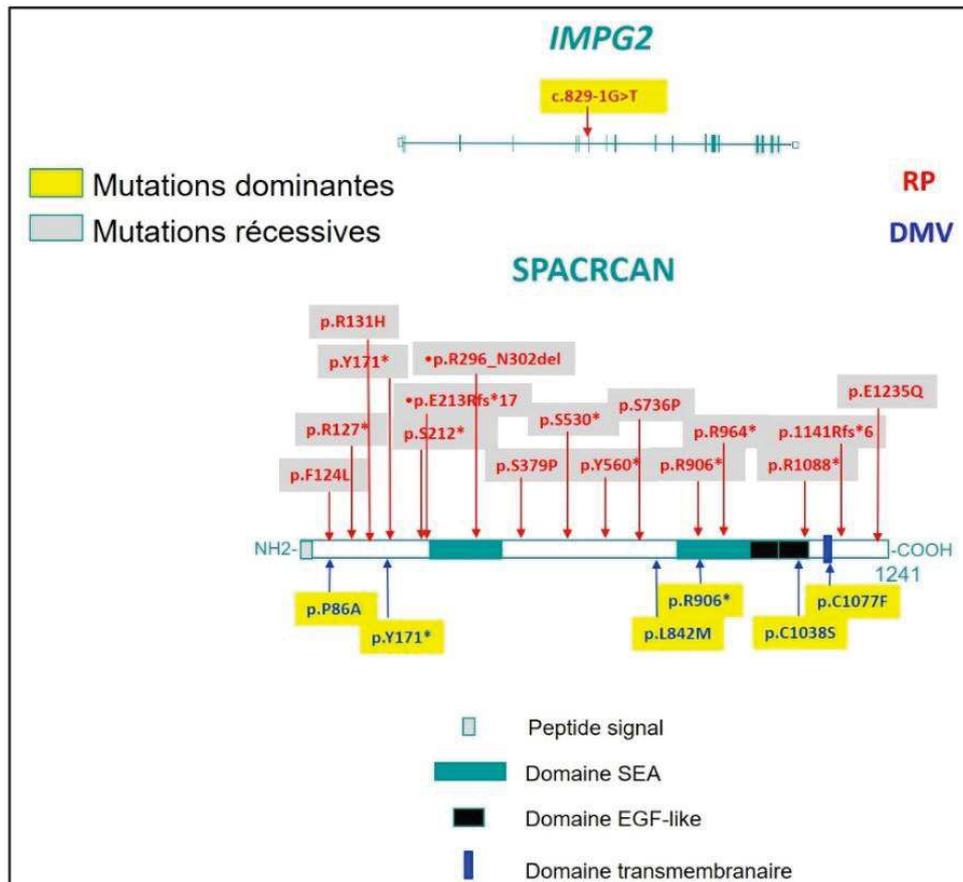
SPACR a une séquence peptide signal qui l'adresse au compartiment extracellulaire. Un domaine de liaison à l'acide hyaluronique et à l'héparine sulfate, ce qui suggère une fonction d'organisation de l'échafaudage macromoléculaire de la matrice interphotoréceptrice (**Figure 11**).

#### 3.2.2.4 La dystrophie maculaire vitelliforme adulte liée au gène *IMPG2*

Le gène *IMPG2* (Interphotoreceptor Matrix ProteoGlycan 2) fut décrit pour la première fois par HAGEMAN en 1999 (123). Des mutations du gène *IMPG2* ont tout d'abord été associées à des phénotypes de rétinites pigmentaires (124), et ensuite à des dystrophies maculaires vitelliformes de l'âge adulte (116). La pathologie impliquée par une mutation d'*IMPG2* se déclare à la quarantaine, et tout comme les DMVA causées par les gènes *PRPH2* et *IMPG1*, la neurodégénérescence est lente et modérée (117).

Les symptômes sont semblables à la DMVA associées aux mutations de *IMPG1*.

La transmission de la DMVA causée par le gène *IMPG2* est autosomique dominante. Chez l'humain, le gène *IMPG2*, est situé sur le chromosome 3. Il est composé de 8352 pb et comporte 19 exons. *IMPG2* code la protéine SPACRCAN (*SialoProtein Associated with Cones and Rods proteoglyCAN*), de 200 kDa composé de 1241 acides aminés. SPACRCAN est une protéine synthétisée et sécrétée par le PR dans la MIP mais qui reste ancrée à la membrane du PR via un domaine transmembranaire. La protéine est localisée entre les SE des PR et les microvillis du pôle apical de l'EPR: la MIP (**CHAPITRE 2**). SPACRCAN est un protéoglycane comportant de nombreux domaines fonctionnels (**Figure 26**) (119): un domaine peptide signal, deux domaines SEA, deux domaines EGF-like et un domaine transmembranaire C-terminal. Elle possède également un grand domaine mucin-like en sa partie centrale, 3 domaines consensus de liaison aux glycosaminoglycanes et un domaine de liaison au hyaluronane (125) (**Figure 26**). Des motifs de liaison HABMs (*HA binding motifs*), lui permettant d'interagir avec l'acide hyaluronique, le principal GAG de la MIP (**2.1.2**) (121). Des récepteurs RHAMM (*receptor for HA mediated motility*) présents à la surface de l'EPR lient l'acide hyaluronique permettant ainsi l'échaffaudage matriciel: PR-SPARCAN/HA-EPR (123)(126). SPACRCAN participe également à la structuration de la MIP via 3 domaines de liaison aux GAGs sulfatés: la chondroïtine sulfate ainsi que l'héparine sulfate (126).



*Figure 27: Représentation schématique de la protéine SPACRCAN*

*Les mutations responsables de rétinites pigmentaires sont en rouge.*

*Les mutations responsables de dystrophies maculaires vitelliformes sont en bleues.*

*Les transmissions dominantes sont encadrées en jaune et les récessives en gris.*

*Source: Schéma réalisé en recensant les mutations de la bibliographie scientifique*

Les modifications post-traductionnelles de SPACRCAN sont estimées à 60% de la masse de la protéine (122).

Ensemble, les gènes *IMPG1* et *IMPG2* représentent environ 8% des familles dont les tests moléculaires sont négatifs pour des variations des gènes *BEST1* et *PRPH2* (117). Ces gènes doivent être séquencés dans la dystrophie maculaire vitelliforme d'apparition tardive avec :

- (1) Une déficience visuelle modérée
- (2) Des lésions de type drusen
- (3) Une réflectivité normale de la lignée RPE sur SD-OCT
- (4) Des dépôts vitelliformes situés entre l'ellipsoïde et l'EPR

Ces caractéristiques cliniques ne sont pas observées dans les formes classiques des dystrophies vitelliformes *BEST1* ou *PRPH2*.

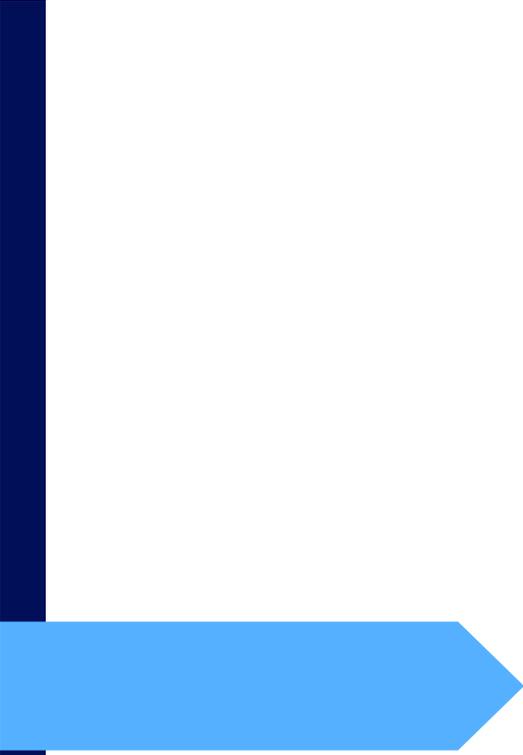
En résumé, quatre gènes, *BEST1*, *PRPH2*, *IMPG1* et *IMPG2* sont associés à la DMV.

*BEST1*, *PRPH2* et *IMPG2* ont également été associés à la RP, ce qui n'était pas le cas du gène *IMPG1* avant (**Résultat1**).

Les mécanismes physiopathologiques responsables de ces deux dystrophies de la rétine ne sont pas complètement connus. Cependant, il est probable que la MIP joue un rôle fondamental dans le développement de ces deux atteintes rétiniennes.

Comment expliquer que ces gènes donnent deux atteintes visuelles et des modes de transmission (récessifs ou dominants) différents, avec des variations de sévérité importante.

Il est donc nécessaire d'explorer cette matrice, et les gènes codant les protéines SPACR (**Résultat2**) et SPACRCAN.



# PROJET DE THESE



« Je me suis rendu compte à quel point j'étais loin de mon rêve quand je m'en suis approché. »  
Bienvenue à Gattaca

La RP et la DMV sont deux sous types de dystrophie héréditaire de la rétine et des causes majeures de déficience visuelle chez les adultes. Malgré l'identification de plus de 90 gènes associés à ces deux atteintes visuelles, le séquençage de ces gènes ne permet d'identifier un variant pathogène causal que dans environ 70% des cas. Il existe donc une lacune importante dans notre connaissance génétique de ces affections.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse vous seront présentés dans 2 articles scientifiques qui constitueront les chapitres **Résultat 1 (Olivier et al 2020a)** et **Résultat 2 (en cours de soumission)** de ce manuscrit de thèse.

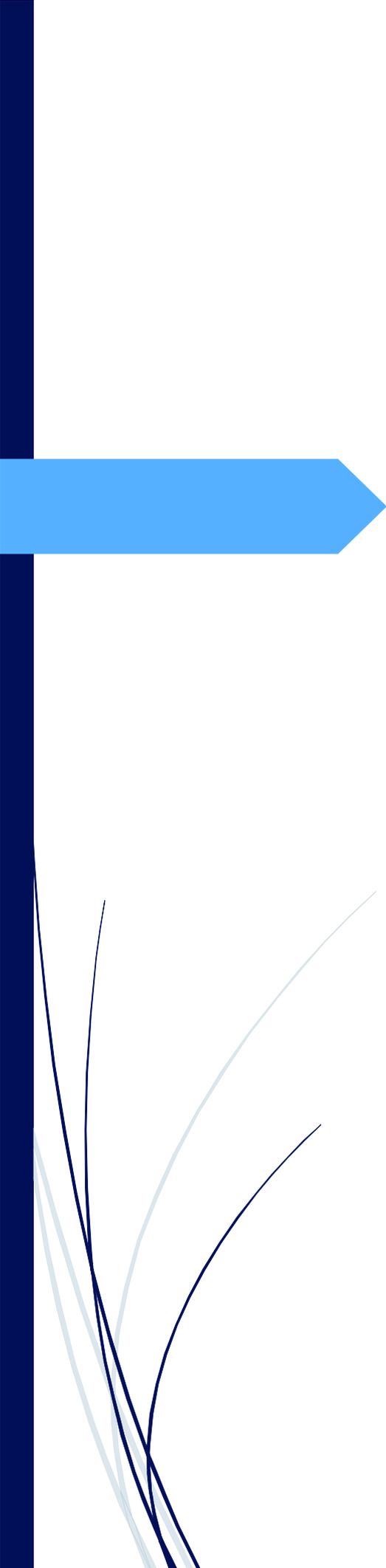
Le premier article, publié dans *Journal of Medical Genetics* en Août 2020, traite de la découverte du diagnostic moléculaire d'une grande famille Française atteinte de rétinite pigmentaire autosomique dominante. L'utilisation du séquençage de l'exome (technique NGS) a permis de révéler la mutation hétérozygote du site donneur d'épissage c.1824 + 1G> A dans le gène *IMPG1*, mutation responsable de la rétinite pigmentaire des patients. Les données d'études rétrospectives multicentriques ont permis de déterminer le diagnostic moléculaire de 8 familles qui ne connaissaient pas la mutation causale responsable de leur dystrophie rétinienne (RP ou DMV).

Tous les variants découverts sont prédits pathogènes par les bases de données et ils ségrégent avec le phénotype pathologique des patients.

Dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de génétique et de médecine de Naples (TIGEM), je me suis rendu en Italie plusieurs mois pour effectuer une seconde partie de mon étude consistant à injecter des morpholinos *Impg1* et/ou *Impg2* dans la cellule œuf du *medaka fish*. L'effet de la down régulation de la protéine SPACR et/ou SPACRCAN sur la rétine a permis de confirmer l'importance de ces gènes dans le développement et la survie des photorécepteurs. L'injection de morpholino a provoqué une déstructuration et une réduction de la longueur des segments externes des cônes et des bâtonnets chez le poisson.

Le second article (Olivier et al - en soumission – Résultat 2), présente l'étude phénotypique des fonctions visuelles d'un nouveau modèle murin transgénique *Impg1*<sup>-/-</sup>. Le modèle murin a d'abord été validé puis une analyse du fond d'œil, d'électro-rétinographie et de tomographie en cohérence optique ont permis de caractériser l'évolution de l'atteinte rétinienne causée par l'absence de la protéine SPACR chez la souris. Une étude histologique à travers des techniques d'immuno histochimie et de microscopie électronique a permis de compléter les données obtenues *in vivo* et d'apporter des informations sur le processus dégénératif au niveau cellulaire.

Ces 2 articles ont ensuite été discutés dans le chapitre **Discussion générale et Perspectives**.



# RESULTATS

*« On te dira d'être premier, jamais d'être heureux »  
Orelsan*

# I : Mutations du gène *IMPG1* impliquées dans des rétinites pigmentaires autosomiques dominantes et récessives.

## I.1: Introduction

La rétinite pigmentaire est la dystrophie rétinienne héréditaire la plus fréquente dans le monde. Cliniquement et génétiquement hétérogène, elle est caractérisée par une cécité nocturne, une constriction du champ visuel et une sévère baisse de l'acuité visuelle. Malgré l'identification de plus de 90 gènes associés à la RP, environ 1 patient sur 3 n'a pas de diagnostic moléculaire.

Dans cette étude, nous avons identifié la mutation pathogène responsable d'une rétinite pigmentaire autosomique dominante (RPaD) dans une grande famille française. Cette mutation n'avait pu être identifiée en screenant les gènes connus comme étant responsables de RP. En utilisant le séquençage de l'exome, une mutation hétérozygote du site donneur d'épissage c.1824 + 1G> A du gène *IMPG1* a été identifiée dans cette grande famille française. Puis dans 2 autres familles avec une RP ou une dystrophie maculaire adulte (DMVA). En se servant d'une étude retrospective multicentrique de patients atteints de RP et/ou DMVA; 8 familles supplémentaires avec différentes mutations faux-sens et non-sens du gène *IMPG1* ont été identifiées. La suite de l'étude consistait à observer l'effet de la down régulation des gènes *Impg1* et *Impg2* sur les PR, in vivo, chez le poisson *medaka oryzias latipes*. L'injection de morpholinos, oligonucléotides antisens, a permis de réduire la transcription des gènes *Impg1* et/ou *Impg2*; les injections ont été effectuées après fécondation au stade 1 cellule. L'injection de morpholino chez le medaka a eu des effets sur les PR, les segments externes sont destructurés et raccourcis, avec une quasi absence pour les cônes.

Notre laboratoire avait précédemment associé des mutations du gène *IMPG1* à des DMVA (116), nos travaux valident maintenant *IMPG1* comme étant un nouveau gène responsable de rétinite pigmentaire autosomique dominante et récessive.

Comme il n'est pas rare dans la génétique ophtalmologique, un même gène peut conduire à deux entités cliniques bien distinctes (RP et DMVA dans ce cas).

[I.2: Résultats](#)

# Journal of Medical Genetics

## Pathogenic variants in *IMPG1* cause autosomal dominant and autosomal recessive retinitis pigmentosa

Journal:	<i>Journal of Medical Genetics</i>
Manuscript ID	jmedgenet-2020-107150.R1
Article Type:	Original research
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Olivier, Guillaume; University of Montpellier; INSERM U1051, Institute for Neurosciences of Montpellier</p> <p>Corton, Marta; Universidad Autónoma de Madrid (IIS-FJD, UAM) – Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases -(CIBERER), . Department of Genetics &amp; Genomics, Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz University Hospital</p> <p>Intartaglia, Daniela; Telethon Institute of Genetics and Medicine, Pozzuoli (NA), and Medical Genetics, Department of Precision Medicine, University of Campania “Luigi Vanvitelli”</p> <p>Verbakel, Sanne; Radboud university medical center, Department of Ophthalmology, Donders Institute for Brain, Cognition and Behavior</p> <p>Sergouniotis, Panagiotis; Central Manchester NHS Foundation Trust, Manchester Royal Eye Hospital, Manchester Royal Eye Hospital, Manchester Academic Health Science Centre</p> <p>Le Meur, Guylène; CHU Nantes, Nantes Université, Service Ophtalmologie</p> <p>DHAENENS, Claire-Marie; INSERM U837, University Lille-Nord de France; LiINCog, Lille Neuroscience &amp; Cognition</p> <p>Naacke, Hélène; Clinique Saint Joseph</p> <p>Avila-Fernández, Almudena; Universidad Autónoma de Madrid (IIS-FJD, UAM) – Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases - (CIBERER), Department of Genetics &amp; Genomics, Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz University Hospital</p> <p>Hoyng, Carel; Radboud University Medical Center; Nijmegen, the Netherlands, Department of Ophthalmology, Donders Institute for Brain, Cognition and Behavior</p> <p>Klevering, Jeroen; Radboud University Medical Center, Department of Ophthalmology, Donders Institute for Brain, Cognition and Behavior</p> <p>Bocquet, Béatrice; University of Montpellier; INSERM U1051, Institute for Neurosciences of Montpellier</p> <p>Roubertie, Agathe; CHU Montpellier, Hôpital Gui de Chauliac, Département de Neuropédiatrie; INSERM U1051, Institute for Neurosciences of Montpellier</p> <p>Sénéchal, Audrey; INSERM U1051, Institute for Neurosciences of Montpellier; University of Montpellier</p> <p>Banfi, Sandro; Telethon Institute of Genetics and Medicine, Department of Precision Medicine, University of Campania “Luigi Vanvitelli”</p> <p>Muller, Agnès; University of Montpellier; INSERM U1051, Institute for Neurosciences of Montpellier</p>

	<p>Hamel, Christian; Hôpital Gui de Chauliac, CHU Montpellier, Service d'ophtalmologie          Black, Graeme; University of Manchester, Department of Genetic Medicine          Conte, Ivan; Telethon Institute of Genetics and Medicine, Pozzuoli (NA), and Medical Genetics, Department of Precision Medicine, University of Campania "Luigi Vanvitelli"; University of Naples Federico II, Department of Biology          Roosing, Susanne; Radboud University Medical Center, Department of Ophthalmology, Donders Institute for Brain, Cognition and Behavior          Zanlonghi, Xavier; Eye Clinic Jules Verne          Ayuso, Carmen; Universidad Autónoma de Madrid (IIS-FJD, UAM) – Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases -(CIBERER), Department of Genetics &amp; Genomics, Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz University Hospital ; Centro de Investigación Biomedica en Red (CIBER) de Enfermedades Raras, ISCIII,            Meunier, Isabelle; CHU Montpellier, National centre in rare diseases, Genetics of Sensory Diseases; University of Montpellier          Manes, Gaël; University of Montpellier; INSERM U1051, Institute for Neurosciences of Montpellier</p>
Keywords:	Genetics, Sequence Analysis, Ophthalmology, Eye Diseases





*I, the Submitting Author has the right to grant and does grant on behalf of all authors of the Work (as defined in the below author licence), an exclusive licence and/or a non-exclusive licence for contributions from authors who are: i) UK Crown employees; ii) where BMJ has agreed a CC-BY licence shall apply, and/or iii) in accordance with the terms applicable for US Federal Government officers or employees acting as part of their official duties; on a worldwide, perpetual, irrevocable, royalty-free basis to BMJ Publishing Group Ltd ("BMJ") its licensees and where the relevant Journal is co-owned by BMJ to the co-owners of the Journal, to publish the Work in this journal and any other BMJ products and to exploit all rights, as set out in our [licence](#).*

*The Submitting Author accepts and understands that any supply made under these terms is made by BMJ to the Submitting Author unless you are acting as an employee on behalf of your employer or a postgraduate student of an affiliated institution which is paying any applicable article publishing charge ("APC") for Open Access articles. Where the Submitting Author wishes to make the Work available on an Open Access basis (and intends to pay the relevant APC), the terms of reuse of such Open Access shall be governed by a Creative Commons licence – details of these licences and which [Creative Commons](#) licence will apply to this Work are set out in our licence referred to above.*

*Other than as permitted in any relevant BMJ Author's Self Archiving Policies, I confirm this Work has not been accepted for publication elsewhere, is not being considered for publication elsewhere and does not duplicate material already published. I confirm all authors consent to publication of this Work and authorise the granting of this licence.*

## Pathogenic variants in *IMPG1* cause autosomal dominant and autosomal recessive retinitis pigmentosa

Guillaume Olivier<sup>1,2</sup>, Marta Corton<sup>3</sup>, Daniela Intartaglia<sup>4</sup>, Sanne K. Verbakel<sup>5</sup>, Panagiotis I. Sergouniotis<sup>6</sup>, Guylène Le Meur<sup>7</sup>, Claire-Marie Dhaenens<sup>8</sup>, Hélène Naacke<sup>9</sup>, Almudena Avila-Fernández<sup>3</sup>, Carel B. Hoyng<sup>5</sup>, B. Jeroen Klevering<sup>5</sup>, Béatrice Bocquet<sup>1,2</sup>, Agathe Roubertie<sup>1,2,10,11</sup>, Audrey Sénéchal<sup>1,2</sup>, Sandro Banfi<sup>4</sup>, Agnès Muller<sup>1,2</sup>, Christian P. Hamel†, Graeme Black<sup>6</sup>, Ivan Conte<sup>4,12</sup>, Susanne Roosing<sup>5</sup>, Xavier Zanlonghi<sup>13</sup>, Carmen Ayuso<sup>3</sup>, Isabelle Meunier<sup>1,2,11</sup> and Gaël Manes<sup>1,2,\*</sup>

1. University of Montpellier, Montpellier, France

2. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM U1051, Montpellier, France

3. Department of Genetics & Genomics, Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz University Hospital – Universidad Autónoma de Madrid (IIS-FJD, UAM) – Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases -(CIBERER), Madrid, 28040, Spain.

4. Telethon Institute of Genetics and Medicine, Pozzuoli (NA), and Medical Genetics, Department of Precision Medicine, University of Campania “Luigi Vanvitelli”, Naples, Italy

5. Department of Ophthalmology, Donders Institute for Brain, Cognition and Behavior, Radboud University Medical Center, Nijmegen, the Netherlands

6. The University of Manchester, Manchester M13 9WL, UK

7. CHU Nantes, Nantes Université, Service Ophtalmologie, F-44000 Nantes, France

8. University of Lille, Inserm, CHU Lille, U1172 - LiNCog - Lille Neuroscience & Cognition, F-59000 Lille, France

9. Clinique Saint Joseph, Angoulême, France

10. Département de Neuropédiatrie, CHU Gui de Chauliac, Montpellier, France

11. National centre in rare diseases, Genetics of Sensory Diseases, University Hospital, Montpellier, France.

12. Department of Biology, University of Naples "Federico II", Naples, Italy

13. Eye Clinic Jules Verne, Nantes, France

†Deceased August 2017

\* Corresponding author.

Gaël Manes, Inserm U1051, Genetics and therapy of retinal and optic nerve blindness, Institute for Neurosciences of Montpellier, Hôpital Saint Eloi, 80 avenue Augustin Fliche, 34091 Montpellier cedex 05, France.

Email: gael.manes@inserm.fr

ORCID identifier number: 0000-0003-1871-0636

## ABSTRACT

**Background** Inherited retinal disorders are a clinically and genetically heterogeneous group of conditions and a major cause of visual impairment. Common disease subtypes include vitelliform macular dystrophy (VMD) and retinitis pigmentosa (RP). Despite the identification of over 90 genes associated with RP, conventional genetic testing fails to detect a molecular diagnosis in about one third of RP patients.

### Methods

Exome sequencing was carried out for identifying the disease-causing gene in a family with autosomal dominant RP. Gene panel testing and exome sequencing were performed in 596 RP and VMD families to identify additional *IMPG1* variants. *In vivo* analysis in the medaka fish system by knockdown assays was performed to screen *IMPG1* possible pathogenic role.

**Results** Exome sequencing of a family with RP revealed a splice variant in *IMPG1*. Subsequently, the same variant was identified in individuals from two families with either RP or VMD. A retrospective study of patients with RP or VMD revealed eight additional families with different missense or nonsense variants in *IMPG1*. In addition, the clinical diagnosis of the *IMPG1* retinopathy-associated variant, originally described as benign concentric annular macular dystrophy, was also revised to RP with early macular involvement. Using morpholino-mediated ablation of *Impg1* and its paralog *Impg2* in medaka fish, we confirmed a phenotype consistent with that observed in the families, including a decreased length of rod and cone photoreceptor outer segments.

**Conclusion** This study discusses a previously unreported association between monoallelic or biallelic *IMPG1* variants and RP. Notably, similar observations have been reported for *IMPG2*.

## INTRODUCTION

Retinitis pigmentosa (RP, MIM #268000) is the most common inherited retinal disorder with a worldwide prevalence of approximately 1/3,500.[1] Typical signs and symptoms of RP include bone spicule deposits, attenuated retinal blood vessels, night blindness, and progressive visual field loss in a concentric pattern; central vision tends to be preserved until the later stages of the disease process.[2] RP exhibits remarkable genetic heterogeneity: over 90 genes are currently known to be associated with this condition (RetNet, [www.sph.uth.tmc.edu/retnet](http://www.sph.uth.tmc.edu/retnet)). Importantly, pathogenic variants in these known RP-implicated genes explain approximately 70% of cases, highlighting a significant gap in our knowledge of the molecular pathology of this condition.[3]

The retina is divided into several cell layers with specific functions including the photoreceptors that convert light into electrical signal and the retinal pigment epithelium (RPE) that plays a role in the maintenance and survival of the photoreceptors.[4] Important interactions between the RPE and the photoreceptors occur at the level of the interphotoreceptor matrix (IPM), a thin layer of extracellular material that mediates the interaction between the photoreceptor outer segments and the apical microvilli of the RPE. The IPM is the place where nutrients and retinoids of the visual cycle are exchanged between the RPE and photoreceptors.[5] IMPG1 (Interphotoreceptor Matrix ProteoGlycan 1) and its paralog IMPG2 encode SPACR (SialoProtein Associated with photoreceptor Cones and Rods) and SPACRCAN (SialoProtein Associated with photoreceptor Cone and Rod proteoglyCANs) respectively, two major components of the IPM.[6, 7] SPACR is a 150 kDa secreted glycoprotein that contains a central mucin-like domain, a carboxy C-terminal EGF-like (Epidermal Growth Factor) domain, and two SEA (Sea Urchin Sperm Protein, Enterokinase and Agrin) domains. Although the exact function of the SEA domain remains to be elucidated, it may play a role in cleavage and might contribute to the adaptive ability of the extracellular matrixes.[8] SPACR is highly homologous to SPACRCAN, a 200 kDa transmembrane photoreceptor proteoglycan.[6, 7] SPACR and SPACRCAN play several functional roles, including organizing the IPM and regulating the growth and maintenance of the photoreceptor outer segment.[6, 7, 9] IMPG1 (MIM \*602870) has been previously associated with autosomal dominant and autosomal recessive vitelliform macular dystrophy

(VMD), an inherited retinal disorder that is distinct from RP and is predominantly associated with central visual loss.[10] IMPG1 has been suggested to cause cone-rod dystrophy in a single patient with unknown mode of transmission.[11] Notably, the term benign concentric annular macular dystrophy (BCAMD) has been used to describe what was thought to be a distinct autosomal dominant IMPG1-related disorder.[12] In contrast, IMPG2, was initially associated with autosomal recessive RP with early macular involvement.[13] Thereafter, a case of autosomal dominant VMD was described in a patient with a missense IMPG2 variant. [14]

In the present study, we report seven IMPG1 disease-associated variants (including five that have not been previously reported) in eleven families with either autosomal dominant RP, autosomal recessive RP, or autosomal dominant VMD. In addition, the clinical diagnosis of a twelfth family with IMPG1 retinopathy-associated variant, originally described as BCAMD, is revised to RP with early macular involvement. Functional analysis of the medaka fish ortholog of the human IMPG1 gene indicates that SPACR plays an important role both in early retinal development and during later retinal maintenance. Altogether, we demonstrate that monoallelic and biallelic IMPG1 variants are a previously unreported cause of RP, extending the phenotypic spectrum associated with this gene.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Patients**

The study (# 2008-A01238-47) received the authorization from the Sud Méditerranée IV ethical board committee (# 08 10 05 from 04/11/2008), was approved by the French regulation agency for medication (AFSSAPS # B81319-70) and by the Research Ethics Committee of the Fundación Jimenez Diaz University Hospital. The investigators followed the tenets of the Declaration of Helsinki. An initial French cohort of 300 autosomal dominant RP families was studied and several international RP and VMD cohorts of different sizes were analyzed.

### **Clinical investigations**

Patients underwent standard ophthalmologic examination (including visual acuity assessment, slit-lamp examination, and funduscopy). Macular optical coherence tomography (OCT) was performed using a spectral domain OCT (Heidelberg, Germany). Fundus autofluorescence imaging, color fundus photography and Goldmann kinetic perimetry were performed in a subset of patients. Full-field electroretinograms (ERG) was recorded according to the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV) protocols. Visual acuity was measured with Snellen charts in decimals.

### **Exome sequencing**

Genomic DNA was extracted from leucocytes using the MagNA Pure system (Roche Life Science, Meylan, France). Exome capture was performed with the SureSelect Human All Exon kit from Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) either the 54Mb Clinical Research Exome version or the Exome V6, 58 Mb. The SureSelect libraries were prepared as recommended by the manufacturer. Barcoded exome libraries were pooled and sequenced with a HiSeq2500 system (Illumina, Inc. San Diego, CA), generating paired-end reads (130 +130 bases). After demultiplexing, sequences were mapped onto the human genome reference (NCBI build 37, hg19 version) with Burrows-Wheeler Aligner (BWA). Downstream processing was carried out with the Genome Analysis Toolkit (GATK), SAMtools, and Picard following documented best practices (<http://www.broadinstitute.org/gatk/guide/topic?name=best-practices>). The annotation process was based on the latest release of the Ensembl database. Variants were annotated and analyzed using the Polyweb internal software designed by the Bioinformatics platform of Paris Descartes University and Imagine Institute. NCBI BioProject Sequence Read Archive (SRA) accession: PRJNA636189.

### **Disease-associated variant confirmation**

Coding exons and adjacent intronic sequences of *IMPG1* (RefSeq accession number NM\_001563; primer pairs and PCR conditions are available on request) were sequenced with an Applied Biosystems 3130XL genetic analyzer using a BigDye Terminator cycle sequencing ready reaction kit V3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) following manufacturer's instructions. SIFT, PROVEAN, PolyPhen2, aGVGD, Varsome, Mutation taster and CADD were

used to predict possible impacts of missense variants. The genomic sequence environment of putative splice-site variant was analyzed using Human Splicing Finder and MaxEnt.

### **Genotyping of microsatellite markers and linkage analysis**

Four different microsatellite markers, D6S1622, D6S456, D6S1589, and D6S251, spanning 7.2 Mb surrounding *IMPG1*, were genotyped with fluorescent primers (6-FAM). Results were analyzed with GeneMapper software (version 4.0, Applied Biosystems, Foster City, CA).

### **Medaka stocks and morpholino injection**

The Cab-strain of both wild type (wt) and transgenic medaka fish (*Oryzias latipes*) was maintained following standard conditions.[15] Embryos were staged according to the method proposed by Iwamatsu et al.[16] All animal treatments were reviewed and approved in advance by the Ethics Committee at the TIGEM Institute, (Pozzuoli (NA), Italy).

Morpholinos (Mo, Gene Tools, LLC, Oregon, USA) were designed against the functional exon 2 splice acceptor site of the *IMPG1* gene medaka ortholog (*Impg1a-201*, Mo-*Impg1*: 5'-GTCTTGCTAGTGTGTCAGGAGGCTG-3') and the functional exon1 splice donor site of the *IMPG2* gene medaka ortholog (*Impg2-2 of 2-201*, Mo-*Impg2*: 5'-TGGATGTGGAGTCAGGTTGGTTCTC-3'). Mo were injected into one-cell fertilized embryos, as previously described.[17] Off-target effects of the morpholino injections were excluded by repeated experiments with control Mo or by co-injection with a p53 morpholino as previously described.[18]

### **Generation of Rho:GFP and TαC:GFP transgenic lines**

The human proximal Rhodopsin or *olGnat2* promoters were cloned into the pSKII-ISceI-eGFP vector to create the *phRHO:eGFP* or *pTαC:eGFP* constructs to drive eGFP reporter expression in rods or cones respectively. Transgenic fish were generated as described.[19] Both *Tg(hRHO:eGFP)* and *Tg(TαC:eGFP)* transgenic F1 fish were identified by GFP expression and PCR genotyping. Transgenic expression (*hRHO:eGFP* and *TαC:eGFP*) in embryos was analyzed in living embryos under UV fluorescent stereo-microscopy (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

### **Immunofluorescence analysis and detection of apoptotic cell death**

Medaka embryos were cryostat-sectioned (12- $\mu$ m), and immuno-labeling was performed using mouse monoclonal antibodies to Rhodopsin (1:2,000; Sigma) and Zpr-1 (1:2,000; ZIRC) as previously described.[20] For photoreceptor outer and inner segment measurements, the retina sections of medaka transgenic lines were imaged by confocal microscopy using a Leica TCS SPE 40x objective, using Z-stacks in the wavelength of DAPI. Subsequently the images were used to calculate the photoreceptor outer and inner segment length. The extent and distribution of apoptotic cell death was determined by TUNEL, using the In Situ Cell Death Detection Kit, POD (Roche, Mannheim, Germany), following the manufacturer's protocol. In all experiments the significance of differences between groups was evaluated by Student's t-test,  $p \leq 0.05$  was considered significant. Error bars indicate SEM.

## RESULTS

### ***IMPG1* splice variant identified in three families with either RP or VMD**

Members of a large French family (Family A) were diagnosed with autosomal dominant RP (Figure 1). No pathogenic variants were identified during the initial screening using panel-based genetic testing focusing on genes associated with RP. Further testing using exome sequencing of four affected patients and one healthy individual (II:1, II:2, II:3, III:3 and III:4) was therefore initiated. Initially, common variants with a frequency  $>0.1\%$  in public genetic databases (dbSNP131, ExAC and gnomAD) were excluded. Subsequently, only coding and splice-site region heterozygous variants and those predicted pathogenic present in all four affected patients but absent from the healthy individual were retained. These variants were further filtered against our in-house control database of 13,621 exomes provided by Imagine platform (Necker hospital, Paris, France), reducing the number of candidate variants to only six (Supplemental table 1), including c.1824+1G>A, a heterozygous donor splice-site variation in intron 13 of *IMPG1*. This splice-site change is present in the public human database gnomAD with an allele frequency of  $1/241,072$  ( $4.15e-6$ ) which is compatible with the dominant mode of inheritance. Further segregation analysis in family A revealed 10 patients carrying this *IMPG1* variant (Figure 1). The RP ranged from severe for the index (III:3) and her brother (III:4), to mild for the patients II:2, II:3, III:1 and IV:1 (Figure1, supplemental table 2). Four patients from the youngest generation (IV:4, IV:5, IV:7 and IV 8) were described as preclinical as they had no symptoms of the disease and their fundus

examination was grossly normal. However, a subtle non-physiological autofluorescence ring and few drusen-like lesions in the posterior pole could be observed for patients IV:7 and IV:8 (Figure 1).

Inspection of an in-house patient database revealed an additional sporadic case (Figure 1, family B) carrying the *IMPG1* c.1824+1G>A variant.[10] The affected proband was a 47 year old French female who had a diagnosis of VMD (Figure 1, II:2); intriguingly her two reportedly unaffected sisters and her mother were also heterozygous for this *IMPG1* variant. Additional screening of *IMPG1* was undertaken using gene panel testing in an external cohort including 96 unrelated probands with either RP or VMD. The *IMPG1* c.1824+1G>A variant was identified in a third family (Figure 1, family C). The proband was from Spain and was initially diagnosed with moderate RP at the age of 48 (Supplemental table 2). Fundus showed a typical appearance of bone spicules in the mid-peripheral retina and slightly attenuated retinal vessels (Figure 1, II:1). The *IMPG1* variant was also present in the proband's asymptomatic mother who at 70 years of age only had a few small macular drusen-like deposits on fundoscopy (Figure 1, I:1).

To test the origin of the c.1824+1G>A change in the three families (Families A, B and C), we genotyped the microsatellite markers D6S1622, D6S456, D6S1589, and D6S251, which spanned the 7.2 Mb surrounding *IMPG1*. We identified that all affected members of two of the three families shared the same haplotype suggesting that these two families (Families A and B) were likely to be distantly related (Figure 1).

### **Additional *IMPG1* variants in eight families with RP and/or VMD phenotypes**

*IMPG1* screening in additional RP and VMD cohorts using gene panel testing or exome sequencing revealed five missense and one nonsense variants in eight more families (Figure 2, supplemental tables 2 and 3).

In two siblings from a Spanish family with autosomal recessive RP (Figure 2; family D), a homozygous c.1875A>G, p.Ile625Met variant was identified. There was no known parental consanguinity but the family originates from a small village in Spain. The two affected siblings (II:2, age 58 and II:3, age 51) had clinical and fundoscopic signs of RP; neither had macular edema or macular deposits (Table 1, Figure 3, II:2 and II:3). Their unaffected sister (II:1) carried the p.Ile625Met variant in heterozygous state.

In two affected siblings from a French family with autosomal dominant RP (Figure 2; family E, II:2 and II:7, supplemental table 2), a heterozygous c.1838T>C, p.Leu613Pro was identified. Fundoscopy was in keeping with RP (Figure 3). Notably, the son of the proband (III:1) also carried the p.Leu613Pro variant and was asymptomatic at age 40 years.

In a British family, including an affected proband and her mother (Figure 2; family F), the c.960T>A, p.Ser320Arg variant was identified. The proband (II:1) was initially found to have abnormal macular appearance on a routine eye test at age 26 years. She was subsequently diagnosed with VMD and fundoscopy at age 27 years revealed a single macular vitelliform lesion in each eye (Figure 3, II:1). Electro-oculography revealed a normal light peak:dark trough; full field and pattern ERG responses were also normal. The proband's mother remained asymptomatic at age 58 years despite carrying the same *IMPG1* variant. Notably, she had no macular deposits but fundoscopy revealed bone spicule pigmentation, predominantly in the inferior retina and thinning of the outer retinal layers in the periphery (Figure 3, I:1).

The same missense variant (p.Ser320Arg) was detected in another, unrelated, British family (Figure 2; family G). An abnormal macula appearance was detected on routine eye examination in the proband at the age of 36. She subsequently developed problems with central vision and was diagnosed with VMD. Fundoscopy at age 42 years revealed a single macular vitelliform lesion in the right eye and a single macular atrophic lesion in the left eye (Figure 3, II:1). Electro-oculography revealed a normal light peak:dark trough; full field and pattern ERGs were also normal. The proband's mother was diagnosed with VMD at age 27 years. At the age of 64 years, bilateral multifocal retinal lesions were visible (Figure 3, I:1). In a French sporadic case with maculopathy (Figure 2; family H), a heterozygous c.2083G>T, p.Glu695\* variant was identified; this change was present in his unaffected brother (II:2). The proband was diagnosed with maculopathy at the age of 53 (Supplemental table 2).

Fundoscopy, OCT and fundus autofluorescence imaging were in line with macular atrophy (Figure 3, II:1).

In a Spanish sporadic case with RP (Figure 2; family I, supplemental table 2), a heterozygous c.1876C>T, p.Leu626Phe variant, was identified. Fundoscopy revealed a typical appearance of bone spicule pigmentation in the periphery, slight pallor of the optic disc, narrowed retinal vessels, and macular atrophy.

Finally, the variant c.1982G>A, p.Arg661His was found at the heterozygous state or at the homozygous state in two families with cone-dystrophy and RP respectively (Figure 2, families J and K). These two families are, as far as we know, not related, though they come from the same Spanish village. This variant was previously reported at heterozygous state in an 83 years old patient with multifocal geographical atrophy and some intermediate drusen.[21] The proband of family J died during this study and no additional clinical data were available. In the family K, the proband (II:3) presented at the age of 43 years with night blindness and funduscopy revealed atrophic patches and bone spicule pigmentation in the mid-peripheral retina. No clinical data were available for the affected sister (II:1).

These six *IMPG1* variants were absent from the human gnomAD database or present at a low allelic frequency and the missense variants were predicted damaging overall by the pathogenicity prediction software used (Supplemental table 3).

### **Reassessment of patients originally diagnosed with the BCAMD**

*IMPG1* has also been previously associated with what was assumed to be a distinct autosomal dominant *IMPG1*-related disorder and referred to as BCAMD.[12] Ten affected family members of the Dutch family carrying the heterozygous variant c.1736T>C, p.Leu579Pro, were recently re-examined (Figure 2, family L; supplemental table 2). While the *IMPG1* variant was suggested as a cause at initial publication, other suggested variants were never excluded. To date, using exome sequencing in two patients (IV:1 and IV:3), we identified only one remaining variant within the locus: the previously identified p.Leu579Pro missense change in *IMPG1*. In two patients (II:3 and II:6, at the age of 83 and 84, respectively) visual function was reduced to light perception. Patient III:3 and IV:3 were diagnosed with RP during screening, respectively 9 and 3 years before the disease became symptomatic. In the first four decades of life, funduscopy revealed fundus alterations ranging from macular pigment alterations to a bull's eye maculopathy, in few occasions accompanied by sparse bone spicule pigmentation, pallor of the optic disc and attenuation of the retinal arterioles (Figure 3). When available, SD-OCT and FAF images revealed the loss of the outer retinal layers with sparing of the foveal photoreceptors (Figure 3, II:11, III:2). An extensive overview of the clinical characteristics from 1974 to 2002 is provided in Van Lith-Verhoeven et al.[12]

### **Knockdown of medaka fish *Impg1* results in alteration of photoreceptors morphology**

To further prove the pathogenic effect of the *IMPG1* variants in patients, we carried out an *in vivo* analysis in the medaka fish (*Oryzias latipes*) model system by knockdown assays and assessed the consequences in the differentiated retina. We also included *IMPG2* in the analysis. Both *Impg1* and *Impg2* morphants appeared morphologically normal and viable. However, comparison of the morphology of the differentiated retina of control and morpholinos (Mo) Mo-*Impg1* or Mo-*Impg2* injected embryos revealed that morphant retinas displayed significant alteration in photoreceptors morphology. This reflected a moderate length reduction of outer segments of the rhodopsin-positive mature rod photoreceptors in representative frontal eye sections of stage 40 (St40) of Mo-*Impg1* (Figure 4, B and B') and Mo-*Impg2* (Figure 4, C and C') morphant compared with control (Figure 4, A and A') RHO:eGFP transgenic lines. No further damage was detected in the rod morphology by the co-injection of the two Mo compared to the damage caused by each single Mo (Figure 4, D and D'). We quantified approximately 20% decrease of rod outer segment photoreceptor length after Mo injection (Figure 4, I).

Furthermore, comparison of the morphology of the differentiated retina of control (Figure 4, E and E'), Mo-*Impg1* (Figure 4, F and F') and Mo-*Impg2* (Figure 4, G and G') injected  $T\alpha C:eGFP$  medaka fish embryos revealed that morphants displayed significant alteration in cone photoreceptors, which was more evident in the ventral regions. In particular, we observed a reduction of 90% of outer segment length of cone photoreceptors (Figure 4, J). As for the rods, no further cone damage was detected by co-injection of the two Mo compared to the damage caused by each single Mo (Figure 4, H and H').

Despite dramatic morphological changes, we did not find any apoptotic cells in the photoreceptor layer as determined by TUNEL staining (data not shown). Taken together, these results demonstrate that both *Impg1* and *Impg2* are necessary for proper photoreceptor morphology.

## **DISCUSSION**

### ***IMPG1* variants cause RP**

Mutations in the *IMPG1* gene have previously been described in patients with VMD. In the present study, we describe seven variants in *IMPG1* (including five new) in 11 families and provide two additional *IMPG1*-associated diagnoses: autosomal dominant and autosomal recessive RP.

The heterozygous splice-site *IMPG1* variant c.1824+1G>A was identified in three families (A, B, and C). All the affected members of the families A and B shared the same haplotype suggesting that they could be distantly related. However, the phenotype of these two families appears differently; RP for family A and VMD for family B. The proband of the third family (family C) with the same variant was diagnosed with RP. Similarly, a mixed phenotype was observed within the British family F. Mother and daughter, both carriers of the heterozygous p.Ser320Arg variant, had different retinal dystrophies, RP and VMD respectively. In family G, mother and daughter, also carrier of the same p.Ser320Arg variant, were both diagnosed with VMD. These results suggest that the same variant in *IMPG1* can lead to different phenotypes, RP or VMD, even within the same family. The four other *IMPG1* missense variants presented in this study were only associated with RP and not with VMD. Finally, the nonsense variant p.Glu695\* leads to a maculopathy. Several other genes responsible for RP or VMD (*BEST1*, *PRPH2*, *PROM1* and *HK1*) have also been found mutated in patients with maculopathy.[22–25]

### **Phenotypes ranging from VMD to RP**

VMD represents the second most common cause of inherited maculopathy after Stargardt disease.[26] VMD is a maculopathy with a characteristic deposit of a yellowish material, like egg yolk, in the macula.[27] *BEST1* is the first gene identified involved in this disease, mainly responsible for the autosomal dominant juvenile VMD form, Best disease, and only few variants are implicated in the autosomal recessive form.[28] *PRPH2* variants are associated with the autosomal dominant adult-onset VMD form in about 2% to 18% of patients.[29, 30] We previously showed that *IMPG1* is the third gene involved in VMD.[10] Later, one *IMPG2* variant was also associated with autosomal dominant adult-onset VMD.[14] Altogether *IMPG1* and *IMPG2* account for approximately 8% of families with VMD negative for *BEST1* and *PRPH2* variants.[14] *BEST1*, *PRPH2*, *IMPG1* and *IMPG2* can also be associated with RP phenotype in addition to VMD. Indeed, a *BEST1* variant was associated with RP,[31] variants in *PRPH2* cause a wide range of autosomal dominant retinal dystrophies including RP,[32]

and variants in *IMPG2* were firstly associated with early-onset RP.[13] In summary, as for *BEST1* and *PRPH2*, variants in *IMPG1* and *IMPG2* are also found in RP as well as in VMD, emphasizing the role of the interphotoreceptor matrix in the pathophysiology of inherited retinal dystrophies.

### **Incomplete penetrance**

Asymptomatic heterozygous carriers of *IMPG1* variants with normal clinical exams were observed in this study, and have been described previously.[10] The incomplete penetrance observed among patients with c.1824+1G>A remains unclear as this variant completely disrupts the strong splice-donor site of exon 13. Indeed, all algorithms used predicted high splice scores (94.1 and 10.1 for Human Splicing Finder and MaxEnt respectively; values range from 0 to 100 for HSF, -20 to +20 for MaxEnt). However, the presence of alternative donor site could not be ruled out, as well as implication of the alternative transcript of *IMPG1* gene (NM\_001282368.1, exon 2 skipped but exon 13 retained) for which variable expression level among individuals could explain phenotypic discrepancies.

Incomplete penetrance and variable expression is common among patients with *BEST1*-associated VMD.[28] The other VMD associated gene (*PRPH2*) and several RP associated genes (*PRPH2*, *RP1*, *PROM1*, *HK1* and splice factor genes *PRPF31*, *PRPF8*, *SNRNP200*) are also often associated with incomplete penetrance and variable clinical expressivity.[22, 33, 34] However, the exact mechanisms of the incomplete penetrance and variable expression are yet to be discovered. It is likely that the incomplete penetrance of *IMPG1*-associated RP and VMD results from genetic modifiers. Therefore, intra- and inter-familial phenotypic variations should be carefully considered when variants of uncertain significance are found in *IMPG1*.

### **Revision of the BCAMD phenotype to RP**

*IMPG1* has also previously been associated with BCAMD.[12] In the present study, we re-analyzed this large Dutch family. The follow-up data show that, although the visual acuity is preserved in the initial stage of disease, progression certainly occurs from the fourth to fifth decade. In view of the natural history, which is far from benign, and the generalized character of the disorder, we propose to reject the term BCAMD and revise the diagnosis to RP with relative early macular involvement. Although RP typically manifests in the

midperiphery, early macular abnormalities have been described in other genetic subtypes of RP, including *CERKL*, *IMPG2* and *RP2* associated RP.[35–37]

### ***In vivo* studies**

A decrease in the rod and cone photoreceptor outer segment length of about 20% and 90% respectively in the morpholino-injected medaka fish retina was observed. The *Impg1* and *Impg2* morpholinos gave the same results and surprisingly, no cumulative effect was observed by the co-injection of the two morpholinos. This indicates that *IMPG1* and *IMPG2* play a key role in either development or maintenance of the photoreceptor outer segment and that the cones appear to be more sensitive to alterations of the IPM than the rods. The absence of a cumulative effect of the two morpholinos could be explained by the fact that both *SPACR* and *SPACRCAN* bind to hyaluronan, a glycosaminoglycan molecule that is essential for the organization of the IPM. Therefore, absence of only one of the two paralogues might destabilize the IPM scaffold. These data also confirm that *SPACR* and *SPACRCAN* are necessary for the differentiation and normal function of photoreceptors in vertebrates. The results in medaka fish as model system exhibits disorganization of the photoreceptors and reproduces some characteristics of RP but not VMD. The detection of vitelliform material is a cumulative process that takes time and probably does not appear at the stage 40 (10 days) of analysis. However, the mechanism explaining macular or peripheral involvement in human remains to be elucidated.

In conclusion, this study extends the clinical spectrum of disorders caused by pathogenic variants in *IMPG1*. In addition to dominant and recessive forms of VMD, *IMPG1* can also cause autosomal dominant and recessive RP. The present study also highlights the importance of screening and monitoring asymptomatic carriers of *IMPG1* variants in order to better understand the inheritance pattern, penetrance, expressivity and the expected existence of genetic modifiers associated with pathogenic variants in the *IMPG1* gene.

**Acknowledgements** We sincerely thank the family members involved in this study. We acknowledge the staff of the Institute Imagine (Necker hospital, Paris, France) for the exome sequencing analysis. We thank Francesco Salierno for technical assistance at TIGEM Medaka Fish Facility.

**Contributors** GO, MC, CMD, AAF, BB, AS performed sequencing analyses. GO, DI, IC performed the *in vivo* studies. SKV, PIS, GLM, HN, AR, GB, CLH, JK, XZ, IM collected clinical cases and performed clinical examinations of patients. GM, SR, IC, SB, AM, CA, CPH designed the study. GM, IM, SR, PIS, SKV, CMD drafted the manuscript. All authors revised the manuscript.

### **Funding**

The work of GM is supported by SOS Rétinite Pigmentaire foundation (#20142016/1051). The work of GO was funded by the associations Valentin Haüy/Retina France fellowship (#RAK18006FFA). This project was funded by the French Foundation for Rare Disease (#201607), by grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) from the Spanish Ministry of Health, including CIBERER (06/07/0036), IIS-FJD Biobank (PT13/0010/0012), and FIS (PI16/00425); and from the regional government of Madrid, RAREGenomics-CM (CAM, B2017/BMD-3721). MC is supported by the Miguel Servet Program (CP12/03256) from ISCIII. This research was supported by the Laboratory of Excellence GENMED-Medical Genomics (ANR-10-LABX-0013) managed by the National Research Agency (ANR) part of the Investment for the Future program. We would like to thank the French Institute of Bioinformatics (IFB, ANR-11-INBS-0013) for providing storage and computing resources on its national life science Cloud. IFB acknowledges funding by the call “Infrastructures in Biology and Health” in the framework of the French “Investments for the Future” (ANR-11-INBS-0013) initiative, and EU H2020 projects CYCLONE (644925), EXCELERATE (676559) and EGI-Engage (654142). IFB is the French ELIXIR node. The work of S.R. is supported by the Foundation Fighting Blindness USA Project Program Award ( PPA-0517-0717-RAD), the Rotterdamse Stichting Blindenbelangen, the Stichting Blindenhulp, the Stichting tot Verbetering van het Lot der Blinden, and the Stichting Blinden- Penning. Acknowledgement is also made to the donors of the MDR, a program of the BrightFocus Foundation (Grant M2015317) and the Italian Telethon Foundation for support of IC research.

Competing interests None declared.

## REFERENCES

- 1 Anasagasti A, Irigoyen C, Barandika O, López de Munain A, Ruiz-Ederra J. Current mutation discovery approaches in Retinitis Pigmentosa. *Vision Res* 2012;**75**:117–29.
- 2 Verbakel SK, van Huet RAC, Boon CJB, den Hollander AI, Collin RWJ, Klaver CCW, Hoyng CB, Roepman R, Klevering BJ. Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res* 2018;**66**:157–86.
- 3 Wang F, Wang H, Tuan H-F, Nguyen DH, Sun V, Keser V, Bowne SJ, Sullivan LS, Luo H, Zhao L, Wang X, Zaneveld JE, Salvo JS, Siddiqui S, Mao L, Wheaton DK, Birch DG, Branham KE, Heckenlively JR, Wen C, Flagg K, Ferreyra H, Pei J, Khan A, Ren H, Wang K, Lopez I, Qamar R, Zenteno JC, Ayala-Ramirez R, Buentello-Volante B, Fu Q, Simpson DA, Li Y, Sui R, Silvestri G, Daiger SP, Koenekoop RK, Zhang K, Chen R. Next generation sequencing-based molecular diagnosis of retinitis pigmentosa: identification of a novel genotype-phenotype correlation and clinical refinements. *Hum Genet* 2014;**133**:331–45.
- 4 Palczewski K. Chemistry and biology of the initial steps in vision: the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;**55**:6651–72.
- 5 Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 2005;**85**:845–81.
- 6 Acharya S, Rayborn ME, Hollyfield JG. Characterization of SPACR, a sialoprotein associated with cones and rods present in the interphotoreceptor matrix of the human retina: immunological and lectin binding analysis. *Glycobiology* 1998;**8**:997–1006.
- 7 Acharya S, Foletta VC, Lee JW, Rayborn ME, Rodriguez IR, Young WS 3rd, Hollyfield JG. SPACRCAN, a novel human interphotoreceptor matrix hyaluronan-binding proteoglycan synthesized by photoreceptors and pinealocytes. *J Biol Chem* 2000;**275**:6945–55.
- 8 Palmai-Pallag T, Khodabukus N, Kinarsky L, Leir S-H, Sherman S, Hollingsworth MA, Harris A. The role of the SEA (sea urchin sperm protein, enterokinase and agrin) module in cleavage of membrane-tethered mucins. *FEBS J* 2005;**272**:2901–11.
- 9 Foletta VC, Nishiyama K, Rayborn ME, Shadrach KG, Young WS, Hollyfield JG. SPACRCAN in the developing retina and pineal gland of the rat: spatial and temporal pattern of gene expression and protein synthesis. *J Comp Neurol* 2001;**435**:354–63.
- 10 Manes G, Meunier I, Avila-Fernández A, Banfi S, Le Meur G, Zanlonghi X, Corton M, Simonelli F, Brabet P, Labesse G, Audo I, Mohand-Said S, Zeitz C, Sahel J-A, Weber M, Dollfus H, Dhaenens C-M, Allorge D, De Baere E, Koenekoop RK, Kohl S, Cremers FPM, Hollyfield JG, Sénéchal A, Hebrard M, Bocquet B, Ayuso García C, Hamel CP. Mutations in IMPG1 cause vitelliform macular dystrophies. *Am J Hum Genet* 2013;**93**:571–8.
- 11 Zhang Q, Xu M, Verriotto JD, Li Y, Wang H, Gan L, Lam BL, Chen R. Next-generation sequencing-based molecular diagnosis of 35 Hispanic retinitis pigmentosa probands. *Sci Rep* 2016;**6**:32792.

- 12 van Lith-Verhoeven JJC, Hoyng CB, van den Helm B, Deutman AF, Brink HMA, Kemperman MH, de Jong WHM, Kremer H, Cremers FPM. The benign concentric annular macular dystrophy locus maps to 6p12.3-q16. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;**45**:30–5.
- 13 Bandah-Rozenfeld D, Collin RWJ, Banin E, van den Born LI, Coene KLM, Siemiatkowska AM, Zelinger L, Khan MI, Lefeber DJ, Erdinest I, Testa F, Simonelli F, Voeselek K, Blokland EAW, Strom TM, Klaver CCW, Qamar R, Banfi S, Cremers FPM, Sharon D, den Hollander AI. Mutations in IMPG2, encoding interphotoreceptor matrix proteoglycan 2, cause autosomal-recessive retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 2010;**87**:199–208.
- 14 Meunier I, Manes G, Bocquet B, Marquette V, Baudoin C, Puech B, Defoort-Dhellemmes S, Audo I, Verdet R, Arndt C, Zanlonghi X, Le Meur G, Dhaenens C-M, Hamel CP. Frequency and Clinical Pattern of Vitelliform Macular Dystrophy Caused by Mutations of Interphotoreceptor Matrix IMPG1 and IMPG2 Genes. *Ophthalmology* 2014;**121**:2406–14.
- 15 Avellino R, Carrella S, Pirozzi M, Risolino M, Salierno FG, Franco P, Stoppelli P, Verde P, Banfi S, Conte I. miR-204 targeting of Ankrd13A controls both mesenchymal neural crest and lens cell migration. *PLoS One* 2013;**8**:e61099.
- 16 Iwamatsu T. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mech Dev* 2004;**121**:605–18.
- 17 Carrella S, Barbato S, D'Agostino Y, Salierno FG, Manfredi A, Banfi S, Conte I. TGF- $\beta$  Controls miR-181/ERK Regulatory Network during Retinal Axon Specification and Growth. *PLoS One* 2015;**10**:e0144129.
- 18 Eisen JS, Smith JC. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Dev Camb Engl* 2008;**135**:1735–43.
- 19 Conte I, Bovolenta P. Comprehensive characterization of the cis-regulatory code responsible for the spatio-temporal expression of *olSix3.2* in the developing medaka forebrain. *Genome Biol* 2007;**8**:R137.
- 20 Conte I, Hadfield KD, Barbato S, Carrella S, Pizzo M, Bhat RS, Carissimo A, Karali M, Porter LF, Urquhart J, Hateley S, O'Sullivan J, Manson FDC, Neuhaus SCF, Banfi S, Black GCM. MiR-204 is responsible for inherited retinal dystrophy associated with ocular coloboma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;**112**:E3236-3245.
- 21 Kersten E, Geerlings MJ, Pauper M, Corominas J, Bakker B, Altay L, Fauser S, de Jong EK, Hoyng CB, den Hollander AI. Genetic screening for macular dystrophies in patients clinically diagnosed with dry age-related macular degeneration. *Clin Genet* 2018;**94**:569–74.
- 22 Yuan Z, Li B, Xu M, Chang EY, Li H, Yang L, Wu S, Soens ZT, Li Y, Wong L-JC, Lewis RA, Sui R, Chen R. The phenotypic variability of HK1-associated retinal dystrophy. *Sci Rep* 2017;**7**:7051.
- 23 Seddon JM, Afshari MA, Sharma S, Bernstein PS, Chong S, Hutchinson A, Petrukhin K, Allikmets R. Assessment of mutations in the Best macular dystrophy (VMD2) gene in

- patients with adult-onset foveomacular vitelliform dystrophy, age-related maculopathy, and bull's-eye maculopathy. *Ophthalmology* 2001;**108**:2060–7.
- 24 Essilfie JO, Sanfilippo CJ, Sarraf D. BULL'S EYE MACULOPATHY WITH MUTATIONS IN RDS/PRPH2 AND ROM-1. *Retin Cases Brief Rep* 2018;**12 Suppl 1**:S55–8.
- 25 Del Pozo-Valero M, Martin-Merida I, Jimenez-Rolando B, Arteche A, Avila-Fernandez A, Blanco-Kelly F, Riveiro-Alvarez R, Van Cauwenbergh C, De Baere E, Rivolta C, Garcia-Sandoval B, Corton M, Ayuso C. Expanded phenotypic spectrum of retinopathies associated with autosomal recessive and dominant mutations in PROM1. *Am J Ophthalmol* Published Online First: 23 May 2019. doi:10.1016/j.ajo.2019.05.014
- 26 Bitner H, Schatz P, Mizrahi-Meissonnier L, Sharon D, Rosenberg T. Frequency, genotype, and clinical spectrum of best vitelliform macular dystrophy: data from a national center in Denmark. *Am J Ophthalmol* 2012;**154**:403–412.e4.
- 27 Johnson AA, Guziewicz KE, Lee CJ, Kalathur RC, Pulido JS, Marmorstein LY, Marmorstein AD. Bestrophin 1 and retinal disease. *Prog Retin Eye Res* 2017;**58**:45–69.
- 28 Boon CJF, Klevering BJ, Leroy BP, Hoyng CB, Keunen JEE, den Hollander AI. The spectrum of ocular phenotypes caused by mutations in the BEST1 gene. *Prog Retin Eye Res* 2009;**28**:187–205.
- 29 Boon CJF, den Hollander AI, Hoyng CB, Cremers FPM, Klevering BJ, Keunen JEE. The spectrum of retinal dystrophies caused by mutations in the peripherin/RDS gene. *Prog Retin Eye Res* 2008;**27**:213–35.
- 30 Meunier I, Sénéchal A, Dhaenens C-M, Arndt C, Puech B, Defoort-Dhellemmes S, Manes G, Chazalette D, Mazoir E, Bocquet B, Hamel CP. Systematic screening of BEST1 and PRPH2 in juvenile and adult vitelliform macular dystrophies: a rationale for molecular analysis. *Ophthalmology* 2011;**118**:1130–6.
- 31 Davidson AE, Millar ID, Urquhart JE, Burgess-Mullan R, Shweikh Y, Parry N, O'Sullivan J, Maher GJ, McKibbin M, Downes SM, Lotery AJ, Jacobson SG, Brown PD, Black GCM, Manson FDC. Missense mutations in a retinal pigment epithelium protein, bestrophin-1, cause retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 2009;**85**:581–92.
- 32 Kajiwara K, Hahn LB, Mukai S, Travis GH, Berson EL, Dryja TP. Mutations in the human retinal degeneration slow gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nature* 1991;**354**:480–3.
- 33 Martínez-Gimeno M, Gamundi MJ, Hernan I, Maseras M, Millá E, Ayuso C, García-Sandoval B, Beneyto M, Vilela C, Baiget M, Antiñolo G, Carballo M. Mutations in the pre-mRNA splicing-factor genes PRPF3, PRPF8, and PRPF31 in Spanish families with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;**44**:2171–7.
- 34 Benaglio P, McGee TL, Capelli LP, Harper S, Berson EL, Rivolta C. Next generation sequencing of pooled samples reveals new SNRNP200 mutations associated with retinitis pigmentosa. *Hum Mutat* 2011;**32**:E2246–2258.

- 35 Verbakel SK, van Huet RAC, Boon CJF, den Hollander AI, Collin RWJ, Klaver CCW, Hoyng CB, Roepman R, Klevering BJ. Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res* 2018;**66**:157–86.
- 36 van Huet RAC, Collin RWJ, Siemiatkowska AM, Klaver CCW, Hoyng CB, Simonelli F, Khan MI, Qamar R, Banin E, Cremers FPM, Theelen T, den Hollander AI, van den Born LI, Klevering BJ. IMPG2-associated retinitis pigmentosa displays relatively early macular involvement. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;**55**:3939–53.
- 37 Avila-Fernandez A, Riveiro-Alvarez R, Vallespin E, Wilke R, Tapias I, Cantalapiedra D, Aguirre-Lamban J, Gimenez A, Trujillo-Tiebas M-J, Ayuso C. CERKL mutations and associated phenotypes in seven Spanish families with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;**49**:2709–13.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Pedigrees of families with retinitis pigmentosa (RP) or vitelliform macular dystrophy (VMD) and with the c.1824+1G>A variant (M) in *IMPG1* identified in this study. The variant cosegregates with the disease phenotype. Haplotypes at the *IMPG1* locus showing the common variant and surrounding microsatellite markers. The common haplotype is shown in black. Filled symbols represent affected, unfilled unaffected and dotted asymptomatic individuals; squares: males; circles: females; arrows indicate probands. Multimodal images of the three families with *IMPG1* c.1824+1G>A variant. Color pictures are fundus photographs, and black and white pictures are autofluorescence fundus imaging.

Family A: Fundus photograph showed attenuated retinal arterioles and no bone spicule pigmentation of patient III:3. The fundus autofluorescence (FAF) image revealed a hyperautofluorescent ring in patient IV:1. Spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT) image showing preserved photoreceptor layers at the fovea and outer retinal layers loss in periphery. Macular hypoautofluorescence and outer retinal layers loss with sparing of the foveal photoreceptors was observed for the patient III:4. The FAF of patients IV:7 and IV:8 was grossly normal, although a subtle non-physiological autofluorescence ring (insert) and few drusen-like lesions (arrows) in the posterior pole were observed.

Family B: In patient II:2, a small round macular deposit which was autofluorescent was observed. SD-OCT revealed the foveal dome-shaping accumulation of vitelliform material.

Family C: fundus photograph showed bone spicules in mid-periphery, pale papilla and slightly narrowed retinal vessels in patient II:1 but not in I:1, her mother carrier of the variant. SD-OCT revealed thinning of outer retinal layers in periphery. Fundus photograph showed hard drusen-like deposits in the macula in the asymptomatic carrier I:1 (Fundus photograph magnification of the macula area).

## Figure 2

Pedigrees of nine families with five new and two referenced variants in *IMPG1*. The variants cosegregate with the disease phenotype. Filled symbols represent affected, unfilled unaffected and dotted asymptomatic individuals; squares: males; circles: females; arrows indicate probands.

### Figure 3

#### Multimodal images of the families with different *IMPG1* variants

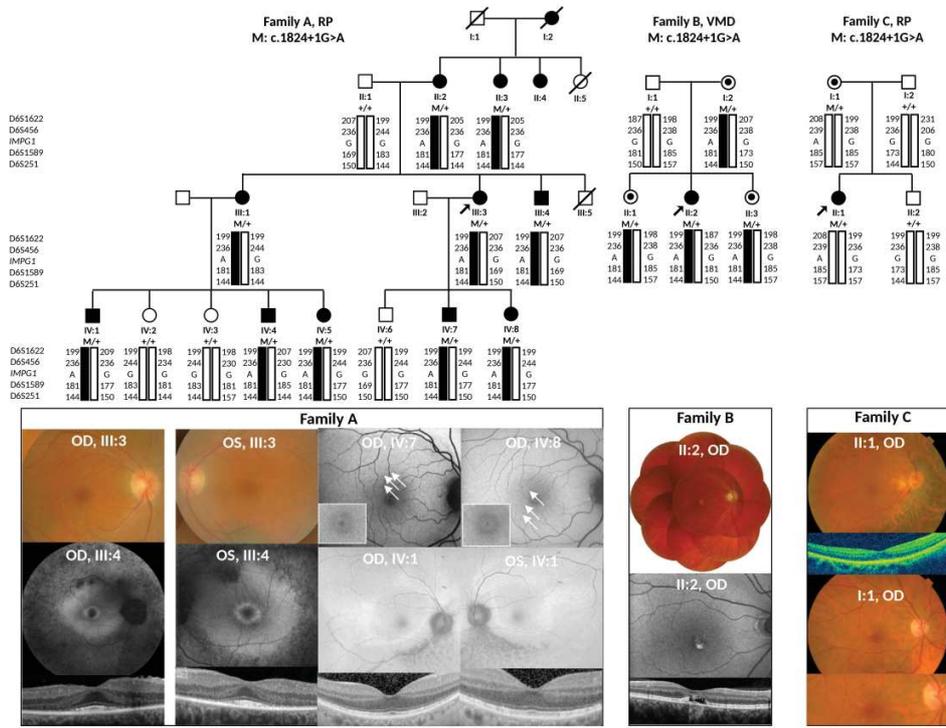
Codes for family names and member numbers refer to the family trees from Figure 2. Family D: Fundus photograph and fundus autofluorescence (FAF) of the two siblings II:2 and II:3 showing pigmentary bone spicules in periphery 360°, retinal vessel attenuation and hyperautofluorescent ring. Family E: Fundus photograph and SD-OCT of II:2 and II:7 showing pigmentary bone spicules in periphery, retinal vessel attenuation and outer retinal layers loss. Family F: Fundus photograph, FAF and SD-OCT showing a single macular vitelliform lesion for the proband II:1 and bone spicule pigmentation localized in the inferior sector of the retina and outer retinal layers thinning in periphery for the proband's mother I:1. Family G: Fundus photograph, FAF and SD-OCT showing a single macular atrophic lesion in the left eye for the proband II:1 and multifocal lesions affecting the central retina and the vascular arcades for the mother's proband I:2. Family H: Fundus photograph, FAF and SD-OCT showing retinal discoloration with relative preservation of retinal vessel diameter, fine bone spicule-like pigmentary changes and a macular atrophy for the sporadic case II:1. Family L: Fundus photograph, FAF and SD-OCT showing macular atrophy with foveal sparing, bone spicule pigmentation in the mid-periphery, attenuated retinal vessels, and pallor of the optic disc for II:11, III:2 and IV:1.

### Figure 4

#### Injection of Mo *Impg1* and *Impg2* in medaka fish has a deleterious effect on photoreceptor outer segment length.

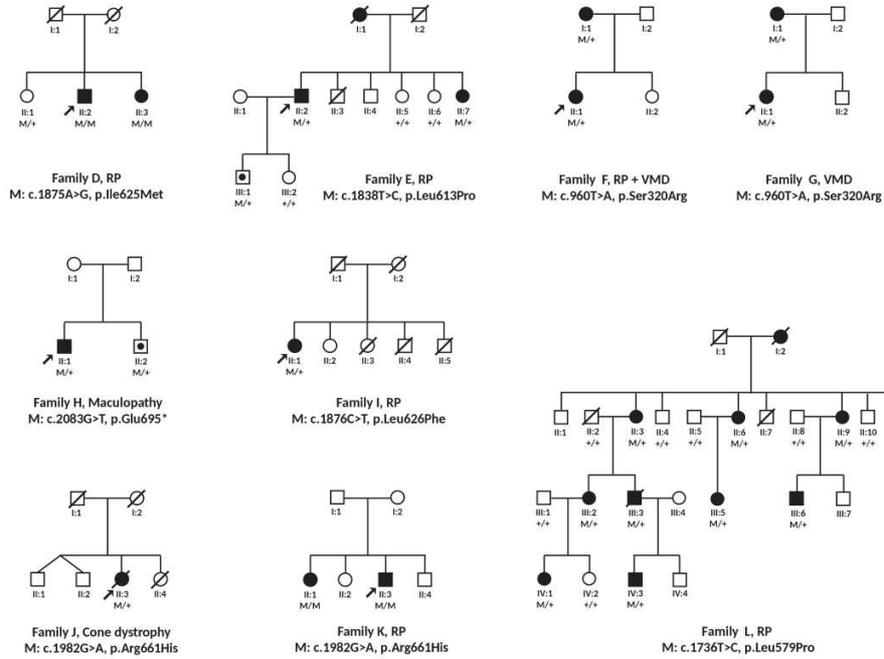
Representative frontal eye sections of st-40 medaka fish transgenic Rho:eGFP (A-D') and TaC:eGFP (E-H') embryos from control (A-A' and E-E'), Mo-*Impg1* (B-B' and F-F'), Mo-*Impg2* (C-C' and G-G'), and co-Mo-*Impg1*-*Impg2* (D-D' and H-H') injected larvae. Sections are counterstained with DAPI (blue). A'-H' are higher magnifications of the areas marked by the white dashed boxes in A-H respectively. We observed a reduction in outer segments in Mo-*Impg1* and *Impg2*-injected medaka fish, more pronounced in cones than in rods, as compared with control animals (I-J). These damages were not more severe in co-Mo-injected animals as compared with single Mo injection. Bar graphs represent mean values  $\pm$  s.e.m. of independent experiments (n=10 Medaka larvae). Student's t-test \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p$

$\leq 0.005$ . Other abbreviations: ONL, Outer Nuclear Layer; OS, Outer Segment; RPE, Retinal Pigment Epithelium. Scale bars, white lines: 50  $\mu\text{m}$  and 15  $\mu\text{m}$ .



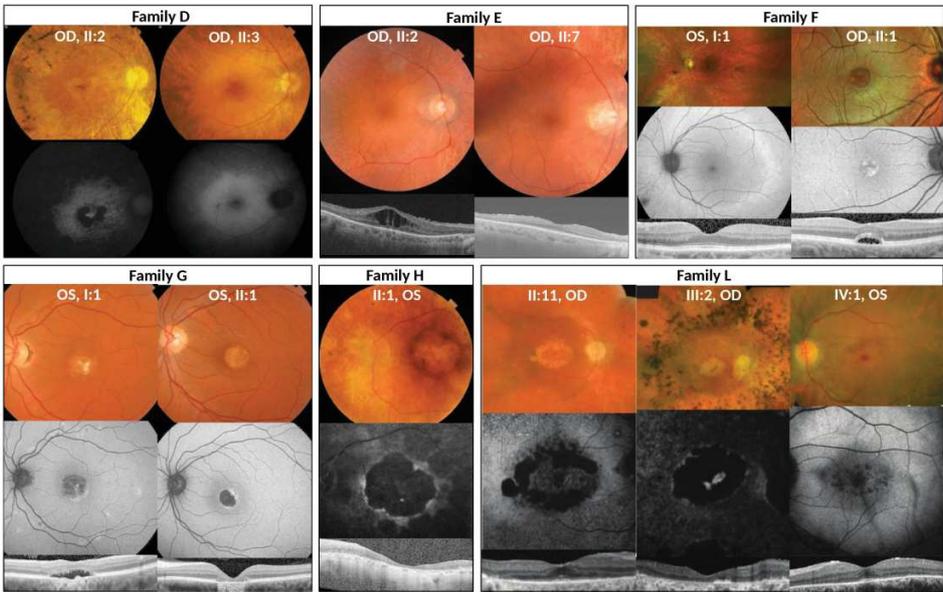
Pedigrees and multimodal images of families with RP or VMD and with the c.1824+1G>A variant (M) in IMPG1

254x190mm (400 x 400 DPI)



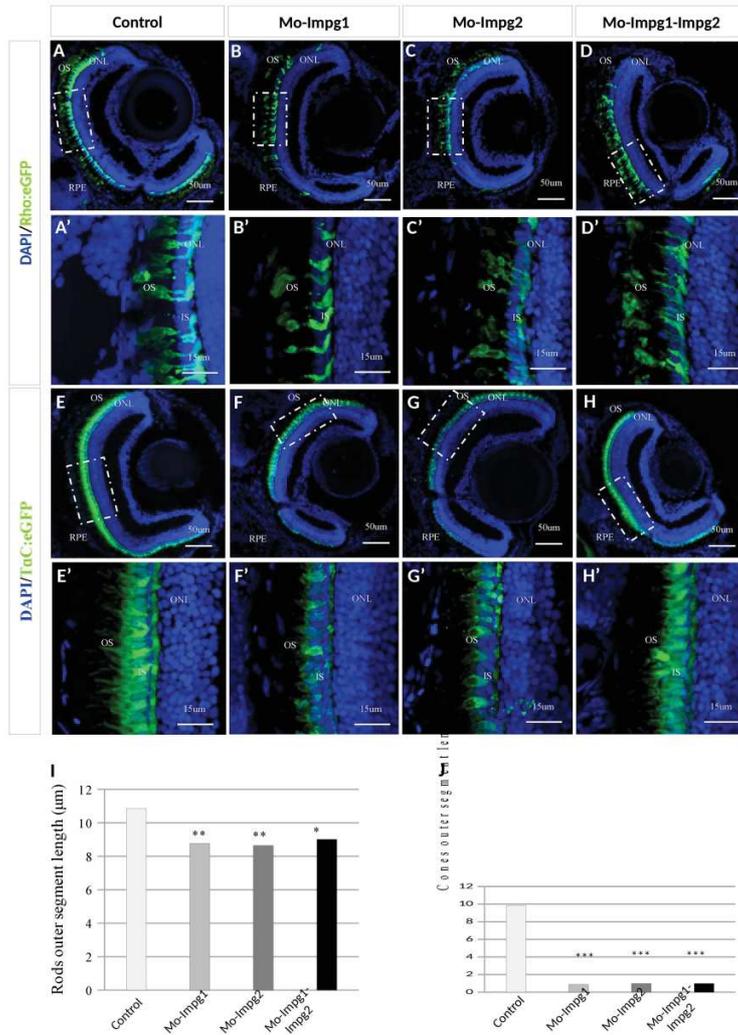
Pedigrees of nine families with five new and two referenced variants in IMPG1

254x190mm (400 x 400 DPI)



Multimodal images of the families with different IMPG1 variants

254x190mm (400 x 400 DPI)



Injection of Mo Impg1 and Impg2 in medaka fish has a deleterious effect on photoreceptor outer segment length

190x254mm (400 x 400 DPI)

**Supplemental table 1.** Filtered heterozygous variants common to affected patients within family A (GrCH37/hg19)

Gene	Chromosome	Position	Type of change	Nucleotide change	Protein change
<i>IMPG1</i>	6	76660278C>T	Splice site	c.1824+1G>A	Presumed fs
<i>UBE3D</i>	6	83767583A>T	Missense	c.236T>A	p.Leu79Gln
<i>GNB5</i>	15	52446151C>T	Missense	c.361G>A	p.Val121Met
<i>C16orf62</i>	16	19567035G>A	Missense	c.251G>A	p.Gly84Asp
<i>CHD3</i>	17	7804612G>C	Missense	c.3348G>C	p.Lys1116Asn
<i>CHRNA4</i>	20	61992502G>A	Missense	c.16C>T	p.Pro6Ser

**Supplemental table 2.** Clinical features of patients with *IMPG1* variants

Patient	Sex, age	VA RE VA LE	Fundus	FAF	OCT	Symptoms	ERG	Clinical diagnosis
<b>Family A (PHRC134), HET c.1824-1G&gt;A, presumed fs</b>								
II:2	F, 84	0.7 0.5	Some pigmentary changes in the macula in both eyes	N/A	N/A	Moderate VA loss	N/A	RP with macular changes
II:3	F, 75	0.5 0.5	Some pigmentary changes in the macula in both eyes	N/A	N/A	Visual loss	N/A	RP with macular changes

III:1	F, 59	1.0 1.0	Pigmentary bone spicules in nasal and inferior mid peripheral retina	Annular ring in the mid peripheral retina, multiple hypoautofluorescent spots in the far peripheral retina, few drusen like lesions in the posterior pole	Foveolar outer nuclear layer expansion, granular EZ and IZ lines without disruption	Photophobia, no night blindness	Dark adapted responses, b wave (3cd/s/m <sup>2</sup> ) 85% of normal values	RP
III:3	F, 50	0.5 0.06	Rare pigmentary bone spicules, and in LE a peripheral vascular pseudotumor in inferior and temporal part of the retina	Large annular ring along the temporal arcades, hypoautofluorescent spots in the mid peripheral retina	Foveolar outer nuclear layer expansion, EZ and IZ only visible beneath the foveola	Night blindness at the age of 20, cataract surgery LE at the age of 45	No rod responses and reduced cone responses	RP
III:4	M, 58	0.79 0.79	Pigmentary bone spicules in periphery 360°, retinal vessel attenuation	Perifoveal annular ring, hypoautofluorescent spots in the peripheral retina and inside the vascular arcades	Foveolar outer nuclear layer expansion, EZ and IZ only visible beneath the foveola	Night blindness at the age of 20, photophobia at the age of 30, clumsy noted at the age of 20 (bicycle accident)	No rod and cone responses	RP
IV:1	M, 43	1.0 1.0	Retinal vessel attenuation	Large annular ring along the vascular temporal arcades, hypoautofluorescent spots in the inferior and nasal mid peripheral retina	Foveolar outer nuclear layer expansion, normal thickness of the ONL in the macular zone, EZ and IZ preserved in the foveal zone	No night blindness	Reduced rod (17% of normal value) and cone responses (33% of normal values)	RP
IV:4	M, 31	1.0 1.0	No retinal vessel attenuation, no pigmentary bone spicule changes, no macular vitelliform deposit.	Few drusen like lesions in the posterior pole	Foveolar outer nuclear layer expansion, integrity of the EZ and IZ lines	No night blindness	Preserved rod and cone responses	Preclinical with drusen like deposits

IV:5	F, 22	1.3 1.0	No retinal vessel attenuation, no pigmentary bone spicule changes, no macular vitelliform deposit.	Few drusen like lesions in the posterior pole	Foveolar outer nuclear layer expansion, integrity of the EZ and IZ lines	No night blindness	Preserved rod and cone responses	Preclinical with drusen like deposits
IV:7	M, 28	1.3 1.3	No retinal vessel attenuation, no pigmentary bone spicule changes, no macular vitelliform deposit.	Few drusen like lesions in the posterior pole	Foveolar outer nuclear layer expansion, integrity of the EZ and IZ lines	No night blindness	Preserved rod and cone responses	Preclinical with drusen like deposits
IV:8	F, 27	1.0 1.0	No retinal vessel attenuation, no pigmentary bone spicule changes, no macular vitelliform deposit.	Few drusen like lesions in the posterior pole	Foveolar outer nuclear layer expansion, integrity of the EZ and IZ lines	No night blindness	Preserved rod and cone responses	Preclinical with drusen like deposits
<b>Family B (NAX1), HET c.1824-1G&gt;A, presumed fs</b>								
II:2	F, 47	0.3 0.3	Small yellow round macular disk	Heterogeneous hypo-hyper autofluorescent lesions	RE: hyperreflective deposit LE: non active choroidal neovascularization	VA loss	Preserved rod and cone responses, normal Arden ratio	VMD
II:1	F, 50	N/A	Normal	N/A	N/A	None	N/A	Asymptomatic carrier
II:3	F, 45	N/A	Normal	N/A	N/A	None	N/A	Asymptomatic carrier
I:2	F, 70	Low vision	N/A	N/A	N/A	None	N/A	Carrier with visual deficiency
<b>Family C (RP1066), HET c.1824+1G&gt;A, presumed fs</b>								

I:1	F, 70	0.9 0.9	Hard drusen-like deposits in the macula	N/A	N/A	None	N/A	Asymptomatic carrier
II:1	F, 49	0.9 0.9	Bone spicules in mid-periphery, optic disc pallor and slightly narrowed retinal vessels	N/A	Outer retinal layers thinning in periphery	Night blindness, central visual field restricted to <30°	N/A	RP
<b>Family D (RP1576), HOM c.1875A&gt;G, p.Ile625Met</b>								
II:2	M, 58	N/A	Pigmentary bone spicules in periphery 360°, retinal vessel attenuation	Hyperautofluorescent ring	N/A	Night blindness, constriction of the visual field	N/A	RP
II:3	F, 51	0.8 0.8	Some pigmentary bone spicules in periphery 360°, retinal vessel attenuation	Hyperautofluorescent ring	N/A	Night blindness	N/A	RP
<b>Family E (PHRC290), HET c.1838T&gt;C, p.Leu613Pro</b>								
II:2	M, 68	0.8 0.8	Pigmentary bone spicules in periphery, retinal vessel attenuation	N/A	Outer retinal layers loss, small intra-retinal cysts	VA loss, constriction of the visual field, night blindness	No rod and cone responses	RP
II:7	F, 72	0.8 1.0	Pigmentary bone spicules in periphery, retinal vessel attenuation	N/A	Outer retinal layers loss	Constriction of the visual field, night blindness	N/A	RP
III:1	M, 40	1.0 1.0	Normal	N/A	slightly less visible EZ in the macular periphery	None	N/A	Asymptomatic carrier
<b>Family F, HET c.960T&gt;A, p.Ser320Arg</b>								

I:1	F, 58	0.7 0.9	Bone spicule localized in the inferior sector of the retina	N/A	Outer retinal layers thinning in periphery	None	N/A	RP
II:1	F, 27	0.9 0.6	Macular vitelliform lesion	Single macular lesion with mixed autofluorescence	Material between the photoreceptor and RPE layers	Mild central visual loss	Normal	VMD
<b>Family G, HET c.960T&gt;A, p.Ser320Arg</b>								
I:1	F, 64	0.6 R 0.1 L	Multifocal lesions affecting the central retina and the vascular arcades	Hyper- and hypo-autofluorescent macular lesions	Material between the photoreceptor and RPE layers	Central visual loss	N/A	VMD
II:1	F, 42	0.5 R 0.1 L	Macular vitelliform lesion	Single macular lesion with mixed autofluorescence	Material between the photoreceptor and RPE layers, right eye; macular atrophy, left eye	Central visual loss	Normal	VMD
<b>Family H, HET c.2083G&gt;T, p.Glu695*</b>								
II:1	M, 53	0.14 CF	Retinal discoloration with relative preservation of retinal vessel caliber, fine osteoblasts and a macular atrophy	Macular hypo-autofluorescence	Atrophy of the macular retina with disruption of the EZ outside the fovea	Night blindness, VA loss, cataract surgery in OS	N/A	Maculopathy
II:2	M, 62	N/A	N/A	N/A	N/A	None	N/A	Asymptomatic carrier
<b>Family I (RP2147), HET c.1876C&gt;T, p.Leu626Phe</b>								
II:1	F, 75	0.7 0.8	Pigmentary bone spicules in periphery 360°, retinal vessel attenuation, slight optic disc	N/A	N/A	10° tunnel vision, VA loss, high myopia	No scotopic responses with low amplitudes in	RP

			pallor, macular and peripapillary atrophy					photopic responses	
<b>Family J (RP1138), HET c.1982G&gt;A, p.Arg661His</b>									
III:3	F, 55	N/A	N/A		N/A			VA loss, constriction of the visual field, no night blindness	N/A CD
<b>Family K (RP2038), HOM c.1982G&gt;A, p.Arg661His</b>									
III:1	F, 57	N/A	N/A		N/A			N/A	N/A RP
III:3	M, 47	0.6 0.6	Atrophic patches in periphery with pigmentary bone spicules and retinal vessels attenuation	N/A		Preserved macula with mild staphyloma and small parafoveal cysts	Night blindness, VA loss and small corneal scotoma	Reduced scotopic and photopic responses	RP
<b>Family L, HET c.1736T&gt;C, p.Leu579Pro</b>									
II:3	F, 83	LP LP	Bull's eye maculopathy, attenuated retinal vessels, and pallor of the optic disc	N/A		N/A	Night blindness, visual acuity loss, constriction of the visual field, with a centrocoecal scotoma RE	No rod and cone responses	RP
II:6	F, 84	LP LP	Macular atrophy with foveal sparing, abundant bone spicule pigmentation, attenuated retinal vessels, and waxy pallor of the optic disc	N/A		N/A	Night blindness, VA loss, constriction of the visual field to 10-20°	No rod and cone responses	RP
II:9	F, 60	0.8	Bull's eye maculopathy, slightly	N/A		N/A	Night blindness,	No rod and cone	RP

		0.8	attenuated retinal vessels, and normal aspect of the optic disc			constriction of the visual field	responses	
II:11	M, 67	0.5 0.63	Macular atrophy with foveal sparing, bone spicule pigmentation in the mid-periphery, attenuated retinal vessels, and pallor of the optic disc	Speckled changes of hypo- and hyperautofluorescence in the posterior pole, with macular hypofluorescence with foveal sparing	Preserved photoreceptor layers at the fovea, parafoveal photoreceptor and RPE atrophy	Night blindness, constriction of the visual field	No rod and cone responses	RP
III:2	F, 61	0.05 0.2	Macular and peripapillary atrophy, abundant bone spicule pigmentation, attenuated retinal vessels, and waxy pallor of the optic disc	Central hypofluorescence in BE with foveal hyperfluorescence in the LE. Hypoautofluorescent spots inside the vascular arcades	Generalized loss of outer retinal layers with preservation of the foveal EZ layer in the LE	Night blindness, VA loss, constriction of the visual field <10° (RE) and <5° (LE)	No rod and cone responses	RP
III:3	M, 41	1.25 0.5	Central atrophy in a bull's eye pattern, pallor of the optic disc, peripapillary atrophy, and attenuated retinal vessels	N/A	N/A	Metamorphopsia	No scotopic and normal photopic responses, normal 30Hz flickers	RP
III:5	F, 39	1.0 1.25	Macular pigment alterations, sparse bone spicule pigmentations, and mild peripapillary atrophy. Lattice degeneration in the LE	N/A	N/A	Night blindness, partial ring scotoma	No rod and cone responses	RP
III:6	F, 33	1.0 1.0	Bull's eye maculopathy, some peripheral bone spicules,	N/A	N/A	Night blindness	No scotopic and severely reduced	RP

			attenuated retinal vessels, and pallor of the optic disc				photopic responses	
IV:1	F, 34	1.0 1.0	Red foveal zone surrounded by a ring of hypopigmentation, bone spicule pigmentation, attenuated retinal vessels, and pallor of the optic disc	Speckled hypoautofluorescence in the macular region and outside of the vascular arcades	Preservation of the EZ layer in the fovea	Night blindness	No scotopic and severely reduced photopic responses	RP
IV:3	M, 33	1.0 1.0	Macular pigment alterations, sparse bone spicule pigmentation (LE>RE), and slightly attenuated retinal vessels	Speckled hypoautofluorescence in the macular region and outside of the vascular arcades	Parafoveal loss of the EZ layer	Night blindness	Severely reduced scotopic and normal photopic	RP

The identification of the families by the institutes is in brackets when available.

Abbreviations are as follows: M, male; F, female; VA, visual acuity; RE, right eye; LE, left eye; BE, both eyes; RP, retinitis pigmentosa; VMD, vitelliform macular dystrophy; CD, cone dystrophy.

VA, visual acuity; N/A, not available, HET, heterozygous; HOM, homozygous. FAF, fundus autofluorescence; OCT, optical coherence tomography; EZ, ellipsoid line zone; IZ, interdigitation zone; CF, counting fingers; LP, light perception; ERG, full-field electroretinography; AD, autosomal dominant; AR, autosomal recessif

**Supplemental table 3.** Summary of *IMPG1* (NM\_001563, GrCH37/hg19) variants present in the study

Nucleotide change	Exon Intron	Protein change	Protein region	gnomAD (frequency)	Zygotity	VarSome				aGVGD	Mut. Taster	CADD	Clinical diagnosis	Inheritance	Reference
						ACMG	PPhen	SIFT	PROVEAN						
c.960T>A	Ex. 10	p.Ser320Arg	SEA1	0	HET	VUS 0.9961	POS	TOL	NEU	C65	POL	18.94	RP, VMD	AD	Present study
c.1736T>C	Ex. 13	p.Leu579Pro	SEA2	0	HET	VUS 0.9993	PRO	DAM	DEL	C65	DIS	31	RP	AD	Present study, [12]
c.1824+1G>A	In. 13	Presumed fs		1/241,072 (4.148e-6)	HET	PAT 0.9955	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	34	RP, VMD	AD, sporadic	Present study, [10]
c.1838T>C	Ex. 14	p.Leu613Pro	SEA2	0	HET	VUS 0.999	PRO	DAM	DEL	C65	DIS	27.1	RP	AD	Present study
c.1875A>G	Ex. 14	p.Ile625Met	SEA2	0	HOM	VUS 0.9969	PRO	DAM	DEL	C0	DIS	24.1	RP	AR	Present study
c.1876C>T	Ex. 14	p.Leu626Phe	SEA2	1/251,068 (3.983e-6)	HET	VUS 0.9991	PRO	DAM	DEL	C15	DIS	30	RP	sporadic	Present study
c.1982G>A	Ex. 14	p.Arg661His	SEA2	4/282,702 (1.411e-5)	HET/HOM	VUS 0.9986	PRO	TOL	NEU	C25	DIS	24.2	CD, RP	sporadic	Present study, [21]
c.2083G>T	Ex. 15	p.Glu695*	EGF-like	0	HET	PAT 0.9877	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	DIS	36	MD	AD	Present study

Ex., exon; Int., intron; fs, frameshift, HET, heterozygous; HOM, homozygous

gnomAD, Genome Aggregation Database

RP, retinitis pigmentosa; VMD, vitelliform macular dystrophy; MD, macular dystrophy

VarSome, American College of Medical Genetics (ACMG) score: PAT for pathogenic, VUS for variant of uncertain significance, BEN for likely benign, DANN  
Score range from 0 to 1, with 1 given to the variants predicted to be the most damaging.

PPhen, PolyPhen2, POS for possibly damaging, PRO for probably damaging, BEN for benign

SIFT, TOL for tolerated, DAM for damaging

PROVEAN (Prediction with cutoff= -2.5), DEL for deleterious, NEU for neutral

Mutation taster, POL for Polymorphism and DIS for Disease Causing.

CADD, Combined Annotation Dependent Depletion

### [I.3: Discussion](#)

#### **Le gène *IMPG1* responsable de RP**

Précédemment, des mutations du gène *IMPG1* avaient été associées à des dystrophies maculaires viteliformes de l'âge adulte (DMVA) et à des dystrophies maculaires annulaires concentriques bénignes, à transmission autosomique dominante et récessive (127) (128).

Cette étude a permis d'associer 7 nouvelles mutations du gène *IMPG1*, à des phénotypes de rétinite pigmentaire (ce gène n'avait jamais été relié aux RP jusqu'ici).

Les 7 mutations ont été identifiées dans 10 familles d'origine différente.

\*La mutation hétérozygote du site donneur d'épissage de l'exon 13 c.1824+1G>A a été identifiée dans 3 familles (PHRC134, NAX1 et RP1066) (Figure 1). Les familles PHRC134 et NAX1 partagent le même haplotype muté ce qui suggère un ancêtre commun.

Les familles PHRC134 et RP1066 présentent une RPaD avec des variations intrafamiliales, allant du patient asymptomatique (PHRC134 IV:4, IV:5, IV:7 and IV:8 et famille RP1066 1:1) à des phénotypes de RP très sévères (PHRC134 III:4). La famille NAX1 (ayant le même haplotype que la famille PHRC134), présente un cas sporadique de DMVA (NAX1 II:2). La mère et les 2 sœurs de ce dernier cas ne présentent pas de signes cliniques, ce qui suggère une pénétrance incomplète.

\*La famille Britannique PHRC400 (Figure 2), est un cas similaire à la famille NAX1. La même mutation faux-sens p.Ser320Arg chez la mère et la fille donne deux dystrophies différentes: RP et DMVA respectivement.

\*Les 5 autres mutations présentées dans l'article sont associées à un phénotype de RP autosomique dominante ou récessive mais pas de DMVA. Dans la famille RP1576, la mutation homozygote p.Ile625Met conduit à une RP tardive. Les mutations hétérozygotes p.Leu613Pro (PHRC290) and p.Leu626Phe (RP2147) donnent une RP. La mutation faux-sens p.Arg661His hétérozygote de la famille RP1138 et homozygote de la famille RP2038 est responsable d'une

dystrophie des cônes chez cette première famille, et d'une RP chez cette seconde. La mutation hétérozygote p.Glu695\* est responsable de maculopathie sporadique dans la famille PHRC410.

Ces résultats démontrent qu'un même variant du gène *IMPG1* peut donner différents phénotypes (RP ou DMVA), au sein d'une même famille, ou de familles éloignées. Des individus sont porteurs de mutations hétérozygotes avec des examens cliniques normaux, ils sont totalement asymptomatiques. En ce qui concerne la mutation d'épissage, un site alternatif donneur d'épissage ne peut être exclu. Un transcrit alternatif avec différents niveaux d'expression pourrait expliquer ces variations phénotypes.

Les mécanismes exacts de ces pénétrances incomplètes et de ces expressions variables ne sont pas encore compris.

Le déséquilibre d'expression allélique de plusieurs SNP, de différents gènes, pourrait avoir un impact potentiel sur les maladies rétiniennes héréditaires. La régulation de l'expression des transcrits par les gènes modificateurs pourrait également être une des causes de ces variations de pénétrance.

Comme les gènes *BEST1* et *PRPH2*, des mutations des gènes *IMPG1* et *IMPG2* sont associées à des RP et à des DMV. *IMPG1* et *IMPG2* étant des protéines de la matrice interphotoréceptrice, on pense que la matrice possède un rôle majeur dans la physiopathologie des dystrophies rétiniennes héréditaires.

## Etude In vivo

La dernière partie de cet article démontre l'efficacité du modèle poisson médaka en recherche génétique. C'est un outil biologique pertinent et rapide pour screener les potentiels rôles physiopathologiques d'un gène candidat.

Le knock down des gènes *Impg1* et *Impg2*, par injection de morpholinos chez le médaka, a permis d'observer une diminution de 20% de la longueur des segments externes des bâtonnets et de 90% de celle des cônes. Etonnamment, la co-injection des 2 morpholinos n'a pas produit d'effet cumulatif.

Les résultats démontrent l'importance des gènes *IMPG1* et *IMPG2* dans le développement des segments externes des photorécepteurs, au sein de la matrice interphotoréceptrice. Les cônes semblent plus sensibles à la sous expression de ces gènes. L'absence d'effet cumulatif de la coinjection des 2 morpholinos, suggère que les 2 gènes pourraient avoir des fonctions redondantes au sein de la matrice interphotoréceptrice.

Le gène *IMPG1* doit être ajouté à la liste des gènes qui, lorsqu'ils sont mutés, peuvent provoquer des formes autosomiques dominantes et récessives de RP. L'étude souligne également l'importance du dépistage et de la surveillance des porteurs asymptomatiques de variations d'*IMPG1*; afin de mieux comprendre le modèle d'hérédité. Nous pensons que la pénétrance, l'expressivité et l'existence probable de modificateurs génétiques associés aux variants du gène *IMPG1* sont les responsables de ces variations phénotypiques.

## II : Phénotypage du modèle murin *Impg1*-KO

### [II.1: Introduction](#)

La matrice interphotoréceptrice (MIP) est une structure hautement organisée avec des domaines interconnectés entourant les cellules photoréceptrices et les microvillies de l'épithélium pigmentaire rétinien (**CHAPITRE 2**). La découverte de l'implication de mutations des gènes *IMPG1* (127) (Olivier et al 2020a – Résultat 1) et *IMPG2* (129) (117) dans des dystrophies rétiniennes confirme le rôle important de la MIP dans la neurodégénérescence rétinienne.

Le gène *IMPG1* code pour la glycoprotéine SPACR chez l'humain (**3.2.2.4**), elle est un protéoglycane dans l'espèce murine. Le gène *IMPG2* code pour le protéoglycane majeur de la matrice interphotoréceptrice: SPACRCAN (**3.2.2.3**). Les patients avec des mutations des gènes *IMPG1* ou *IMPG2* présentent des déficits visuels causés soit par une dégénérescence périphérique des photorécepteurs avec des dépôts pigmentaires en aspect d'ostéoblastes (la rétinite pigmentaire), soit par une accumulation de matériel maculaire vitelliforme (la dystrophie maculaire vitelliforme adulte).

Malgré l'absence de macula, la souris reste le modèle le plus couramment utilisé en ophtalmologie: l'anatomie histologique de la rétine reste proche de l'humain et le génie génétique murin est bien maîtrisé. Nous avons généré un modèle murin *Impg1*<sup>-/-</sup> pour comprendre les mécanismes pathologiques liés à ce gène (nous n'avons pas pu obtenir le modèle *Impg2*<sup>-/-</sup> pour des raisons financières).

Dans cet article (**en cours de soumission**), nous avons étudié la physiopathologie de ce nouveau modèle murin *Impg1*<sup>-/-</sup> à travers une première partie d'exploration fonctionnelle ophtalmologique in vivo.

Une étude histologique a permis d'approfondir ces résultats par différentes techniques histochimiques, immunohistochimiques et par le visionnage de l'ultrastructure rétinienne via la microscopie électronique à transmission.

## [II.2: Résultats](#)

### ***Impg1* is essential for photoreceptor survival by interplaying between the interphotoreceptor matrix and the retinal pigment epithelium**

Guillaume Olivier<sup>1,2</sup>, Philippe Brabet<sup>2</sup>, Vasiliki Kalatzis<sup>2</sup>, Melanie Quiles<sup>1</sup>, Laurent Guillou<sup>2</sup>, Emmanuelle Sarzi, Nelly Pirot<sup>2</sup>, Morgane Broyon<sup>2</sup>, Ervan Andreo<sup>1</sup>, Isabelle Meunier<sup>1,2,3</sup>, Agnès Muller<sup>1,2</sup>, Christian P. Hamel<sup>†1,2,3</sup>, and Gaël Manes<sup>1,2,\*</sup>

1. University of Montpellier, Montpellier, France

2. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM U1051, Montpellier, France

3. CHU Montpellier, Centre de référence maladies sensorielles génétiques, Montpellier, France

†Deceased August 2017

\* Corresponding author.

Gaël Manes, Inserm U1051, Genetics and therapy of retinal and optic nerve blindness, Institute for Neurosciences of Montpellier, Hôpital Saint Eloi, 80 avenue Augustin Fliche, 34091 Montpellier cedex 05, France.

Email: gael.manes@inserm.fr

ORCID identifier number: 0000-0003-1871-0636

## ABSTRACT

Inherited retinal disorders are a clinically and genetically heterogeneous group of conditions, which collectively, are a major cause of visual impairment in working-age adults. Common disease subtypes include vitelliform macular dystrophy (VMD) and retinitis pigmentosa (RP). *IMPG1* and *IMPG2* encode two proteoglycans, SPACR and SPACRCAN, respectively, which are the main components of the interphotoreceptor matrix (IPM), the extracellular matrix surrounding the photoreceptor cells. Although the function of the IPM is not understood, patients with mutations in *IMPG1* or *IMPG2* develop visual deficits leading to VMD or RP. However, the underlying molecular mechanisms remain elusive due to a lack of suitable disease models. The aim of this study was to decipher the role of *Impg1* and the pathological mechanisms that lead to vision loss, by generating mice lacking *Impg1*. *Impg1*-deficient mice show abnormal accumulation of autofluorescent deposits visible by funduscopy imaging and optical coherence tomography (OCT), and attenuated electroretinogram responses from 9 months of age. OCT shows a degeneration of the photoreceptor layer maybe due to these deposits. Transmission electron microscopy examination of *Impg1*<sup>-/-</sup> mice shows a total disruption of the IPM leading to epithelial cell burst. In conclusion, our results demonstrate the essential role of SPACR in maintaining photoreceptors. *Impg1*<sup>-/-</sup> mice provide a novel model for mechanistic investigations and development of therapies for DMV and RP caused by *IMPG1* mutations.

**Keywords:** retina / vitelliform macular dystrophy / retinitis pigmentosa / *IMPG1* / SPACR / interphotoreceptor matrix / Retinal pigment epithelium / photoreceptor survival.

## INTRODUCTION

Within the central nervous system, the extracellular matrix (ECM) is a highly organized structures that surrounds neuronal cells, and plays a prominent role in development and homeostasis (Song and Dityatev 2018). The so-called interphotoreceptor matrix (IPM) is the ECM surrounding the cone and rod photoreceptor cells of the retina and the IPM extends throughout the subretinal space to the apical surface of the underlying retinal pigment epithelium (RPE) (Ishikawa, Sawada, et Yoshitomi 2015). The IPM has numerous functions including the regulation of retinoid transport, oxygen and nutrient exchange, as well as photoreceptor disk turnover, and also contributes to retinal adhesion, cell interactions and photoreceptor alignment and maintenance (Ishikawa, Sawada, and Yoshitomi 2015).

The *IMPG1* (Interphotoreceptor Matrix ProteoGlycan 1) gene and its paralog *IMPG2*, encode SPACR (SialoProtein Associated with Cones en Rods) and SPACRCAN (SialoProtein Associated with Cones en Rods proteoglyCANs) respectively, two major components of the IPM (Acharya et al. 1998; Kuehn et Hageman 1999). SPACR is a 150-kDa secreted glycoprotein that contains a central mucin-like domain, a carboxy terminal EGF-like (Epidermal Growth Factor) domain, and two SEA (Sea Urchin Sperm Protein, Enterokinase and Agrin) domains (Zhao et al. 2008). Although the exact function of the SEA domains remains to be elucidated, they may play a role in cleavage and might contribute to the adaptive ability of the IPM (Palmai-Pallag et al. 2005).

SPACR is highly homologous to SPACRCAN, a 200-kDa transmembrane photoreceptor proteoglycan (Acharya, Rayborn, et Hollyfield 1998; Kuehn et Hageman 1999; Acharya et al. 2000a). SPACR and SPACRCAN are synthesized by the photoreceptors and play an important role in the maturation of the photoreceptor outer segment (OS) (Felemban et al. 2018). Both proteins bind to two of the main glycosaminoglycan molecules essential for IPM organization : chondroitin sulfate and hyaluronan (Acharya et al. 2000b), (Chen et al. 2003).

The IPM also plays an important role in the etiology of retinal degenerations (Ishikawa, Sawada, and Yoshitomi 2015). Mutations in *IMPG1* and *IMPG2* has been previously associated with two clinically distinct inherited retinal dystrophies (IRDs), vitelliform macular dystrophy (VMD), and retinitis pigmentosa (RP) (Meunier et al. 2014) (Manes et al. 2013a) (Bandah-Rozenfeld et al. 2010a) (Olivier et al.2020). VMD is predominantly characterized by central visual loss and accumulation of fluorescent material in the macula subretinal space (Querques et al. 2014). RP, the most prevalent IRD, is characterized by bone spicule deposits, attenuated retinal blood vessels, night blindness, and progressive visual field loss in a concentric pattern; central vision tends to be preserved until the later stages of disease evolution (Bandah-Rozenfeld et al. 2010b, 2), (Olivier et al.2020).

Until recently, the role of SPACR and SPACRCAN in the pathophysiology of these two IRDs was unclear due to the lack of disease-specific animal models. In an effort to circumvent this limitation, we recently investigated the role of both proteins in medaka fish following morpholino-mediated ablation of *Impg1* and *Impg2*. We observed a decrease in the length of rod and cone photoreceptor outer segments, which could be consistent with the clinical

phenotype of affected patients, (Olivier and al.2020). Similarly, a knock-out *Impg2*<sup>-/-</sup> mice model was recently generated and shown to mimic the clinical phenotype observed in RP patients (Xu et al. 2020). Lastly, while this manuscript was in preparation, another team created three murine models: *Impg1*<sup>-/-</sup>, *Impg2*<sup>-/-</sup> and a double knockout *Impg1*<sup>-/-</sup>/*Impg2*<sup>-/-</sup>. Surprisingly, no pathological signs were detected in the *Impg1*<sup>-/-</sup> model or in the double knockout model. The *Impg1*<sup>-/-</sup> phenotype is slow and late, discernible from around 9 months and fundus examination is a main exam to detect the phenotype, the author however didn't perform this and stop study at 8 months. By contrast, *Impg2*<sup>-/-</sup> mice showed retinal lesions that were visible by spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT) and histochemical studies, as well as decreased electrophysiological responses at 8 months of age (Salido et Ramamurthy 2020).

In this study, we generated and characterized an *Impg1*<sup>-/-</sup> mouse model. *Impg1*<sup>-/-</sup> mice exhibited progressive accumulation of autofluorescent material forming vitelliform deposits between the RPE and photoreceptor outer segments, a thinning of the outer nuclear layer, and late signs of photoreceptor degeneration as determined by attenuated scotopic and photopic electroretinogram (ERG) responses. Thus, in our animal model, absence of *Impg1* impairs the IPM, leading to the death of photoreceptors and the underlying RPE, and results in a progressive loss of visual function.

## RESULTS

### Generation of an *Impg1*<sup>-/-</sup> murine model

To investigate the role of *Impg1* in retinal function, we generated an *Impg1*<sup>-/-</sup> mouse model by gene targeting. To this end, exon 6 of *Impg1* was floxed in C57BL/6J embryonic stem cells so that the open reading frame would be disrupted in the presence of the Cre recombinase. After successive crossings with a CMV-CRE mouse model, we obtained an *Impg1*<sup>-/-</sup> allele. This allele was then selected by animal crossings to obtain homozygous *Impg1*<sup>-/-</sup> mice. The *Impg1*<sup>-/-</sup> mice had no physical or behavioural traits that distinguished them from wild mice. To confirm the invalidation of *Impg1*, immunoblotting analysis was performed using an anti-SPACR antibody. SPACR protein was detected in the retina of wild type mice, a noticeable dose-dependent decrease in its expression was detected in heterozygous mice, whereas no SPACR expression was detected in *Impg1*<sup>-/-</sup> mice. (**Fig. 1**).

### Autofluorescent material accumulates subretinally in *Impg1*<sup>-/-</sup> mice

As *IMP*G1 was first associated with VMD and, more recently with RP (Meunier et al. 2014), (Manes et al. 2013a), (Olivier et al. 2020), we first used *in vivo* fundus imaging to visualize the retina, the vasculature from the central optic nerve, and the pigmentation of the RPE and choroid (**Figs. 2A and B**). Furthermore, we developed specific filters that could be used to detect lipofuscin autofluorescence, which has an excitation spectrum close to 480 nm and an emission spectrum to 575 nm. Starting at 9 months of age, we detected weakly fluorescent white spots throughout the fundus of all *Impg1*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. 2A**). These spots represented the accumulation of material deposits, and increased in size and number with age. At 14 months, the spots were intensely fluorescent and covered a large part of the fundus (**Fig. 2B**). These deposits were situated above the RPE and resembled the autofluorescent material in the subretinal vitelliform lesions described in patients (Manes et al. 2013b, 1). The autofluorescent spots were also visible by SD OCT. The *Impg1*<sup>-/-</sup> mice developed hyperreflective clumps localized between photoreceptors OS and the RPE (**Fig. 2C**), but situated closer to the RPE. Similar to the fundus images, the multifocal lesions accumulated across the entire retinal surface from 9 months, without a preferential localization. Moreover, the size and number of the lesions increased with age (**Fig. 2C**). One mouse had a particular notable phenotype, a localized large dome (**Fig. 2D**), which closely resembled the vitelliform deposits seen in patients.

### Subretinal lesions lead to a decrease in photoreceptor function

To assess whether the subretinal lesions altered photoreceptor function, we performed ERG recordings. After the animals were dark adapted, we measured changes in the retinal response to light flash stimulation under scotopic or photopic conditions. (**Fig. 3**). No significant change were observed in the scotopic ERG response of the *Impg1*<sup>-/-</sup> versus *Impg1*<sup>+/+</sup> at 2 months; slight difference 9 months of age (only a 7% decrease in a-wave

amplitude was observed for maximum flash intensity in older mice) (**Fig. 3A**). However, photoreceptor dysfunction was observed at 14 months of age with a 36% decrease in a-wave amplitude at maximum light stimulation (**Fig. 3B**).

Under photopic conditions, the flicker responses were significantly reduced in *Impg1*<sup>-/-</sup> compared to littermate controls. In addition, we compared the response of S-opsin and M-opsin to maximum flash intensity. Decreased responses were only detected in *Impg1*<sup>-/-</sup> mice after 14 months of age (**Fig. 3B**). Rods and cone functions were decreased from 14 months onwards. We thus evaluated photoreceptor cell death by measuring the thickness of the outer retinal layer (composed of the RPE and photoreceptors cells) as a function of the inner retinal layer (as an internal standard) (**Fig. 3C**). This ratio decreased by 18% at 9 months of age to 26% at 14 months in *Impg1*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. 3C**).

Taken together, this significant decrease in the thickness of the outer retinal layer confirmed a photoreceptor degeneration in *Impg1*<sup>-/-</sup> mice, consistent with ERG recordings and SD-OCT measurements.

### **Material accumulation in the IPM leads to photoreceptor death**

Histologic examination showed a disorganization of the IPM (**Fig. 4A**). Retinal sections (3 μm) were stained to highlight the cellular structure such as nuclei, cytoplasm and connective tissue (Hematoxylin/Eosin/Saffron), polysaccharides such as glycogen, glycoproteins, glycolipids and mucins (Periodic Acid Schiff), collagens (Sirius Red), and glycosaminoglycans such as heparan sulfate, proteoglycans, keratan sulfate, hyaluronic acid of the IPM (Alcian Blue pH 2,6). Sirius Red staining revealed collagen around vacuoles inside the IPM (**Fig. 4B**). Alcian blue staining showed that the photoreceptors of the *Impg1*<sup>-/-</sup> mice photoreceptors were totally disorganized. Furthermore, the apical microvilli of the RPE appeared less dense than in wild type mice and the Bruch's membrane was abnormal. The microfibrils of Bruch's membrane were stained, but appeared disturbed in *Impg1*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. 4B**).

We also performed ultrastructure studies using transmission electron microscopy (TEM) on the retinas of *Impg1*<sup>-/-</sup> mice aged 14 months. TEM analysis confirmed that the subretinal debris were located between the OS of the photoreceptors and the microvilli of the RPE, mainly in the vicinity of the RPE (**Fig. 4C**). Numerous melanosomes were observed within the debris, suggesting that the apical membrane of the RPE may have been ruptured. Furthermore, many lipid droplets accumulated inside the RPE cells close to where the debris were located (**Fig. 4A**). Taken together, these results show that material accumulation in the retina of *Impg1*<sup>-/-</sup> mice is a key element in the cell death.

Lastly, we assessed whether the retinal lesions that we detected led to an inflammatory response. Consistently, immunofluorescence studies using an anti-Iba1 antibody demonstrated the presence of a reactive gliosis and microglial migration into the photoreceptor layer and subretinal space in *Impg1*<sup>-/-</sup> mice as compared to controls (**Supplemental data**).

## DISCUSSION

### ***Impg1*<sup>-/-</sup> retinas accumulate autofluorescent material subretinally**

Mutations in the *IMPG1* gene have previously been described in patients with either vitelliform macular dystrophy (Manes et al. 2013b, 1) or retinitis pigmentosa (Olivier et al. 2020). The underlying molecular mechanisms are very different and particularly complex in these neuropathologies. The lack of pre-existing animal models made it difficult to unravel the underlying physiopathological mechanisms associated with *IMPG1* mutations. Thus, in this study, we generated an *Impg1*<sup>-/-</sup> knock out mouse model to assess the *in vivo* function of the encoded protein SPACR within the interphotoreceptor matrix.

Histological and physiological characterisations indicate that homozygous *Impg1*<sup>-/-</sup> mice developed a late onset and slowly evolving retinal degeneration. Specific funduscopic features were observed from 9 months of age. Multifocal lesions were present over the entire surface of the retina without preference for specific retinal quadrants. Conversely, these lesions (or deposits) were always located in the subretinal space. By SD-OCT, we precisely determined that the deposits were localized within the IPM, between the photoreceptors OS and the RPE apical microvilli.

The SPACR deficiency in *Impg1*<sup>-/-</sup> mice generated subretinal lesions comparable to those associated with VMD in patients, which likely result in photoreceptor dysfunction (Manes et al. 2013b, 1). By contrast, RP patients were characterized by bone spicule pigmentation (Schuerch et al. 2016). Furthermore, although adult vitelliform macular dystrophy (AVMD) patients present with a similar subretinal material accumulation (above the RPE), it should be noted that in juvenile form (JVMD) caused by *BEST1* mutation, the deposits are localized under the RPE, between the Bruch's membrane and the RPE (Tripathy et Salini 2020).

Interestingly, as is the case for AVMD (Manes et al. 2013b, 1) and JDMV (Campa et al. 2020), the deposits observed in *Impg1*<sup>-/-</sup> mice were autofluorescent and the autofluorescence increased strongly with age. Degradation products classically accumulate within the retina with age. The main autofluorescent component of this accumulation is lipofuscin, which, in the human ocular fundus has a broad band of emission between 500 and 750 nm, a maximum of approximately 630 nm, and optimal excitation of approximately 510 nm (Delori et al. 1995).

### **Subretinal material leads to moderate physiological impairment**

The *Impg1*<sup>-/-</sup> mice showed a weakened ERG response. A comprehensive electrophysiology study showed that, although in general the photoreceptors are only slightly affected, both rods and cones are impacted. In addition, both cone subtypes, S-opsin and M-Opsin, are affected and they showed similarly decreased responses. We believe that photoreceptor dysfunction in the *Impg1*<sup>-/-</sup> mice is not cell-type dependent but depends on the localization of the accumulated material.

In parallel, *in vivo* studies on the *Impg2*<sup>-/-</sup> mouse model showed weakened ERG responses, with a retinal lesions similar from those detected in our *Impg1*<sup>-/-</sup> model (Salido et Ramamurthy

2020) and (Xu et al. 2020). Moreover, Ramamurthy and colleagues compared *Impg1*<sup>-/-</sup>, *Impg2*<sup>-/-</sup> and double mutant mice and found no evidence of morphological or functional deficits in the *Impg1*<sup>-/-</sup> model, and only small deficits in the double mutant mice. We think that the author didn't perform study long enough.

The relative decrease in rod and cone ERG responses in our *Impg1*<sup>-/-</sup> model was correlated with photoreceptor degeneration as SD-OCT measures showed a 26% decrease in the thickness of the photoreceptor layer at 14 months. Furthermore, the subretinal lesions resembled those associated with human AVMD, with the exception that the rod photoreceptors were also impacted in the *Impg1*<sup>-/-</sup> mice.

### **IPM disorganisation leads to RPE degeneration**

Histological studies of the *Impg1*<sup>-/-</sup> retina showed a disordered arrangement of photoreceptors cells and visible vacuoles within the IPM. We performed four stainings to characterize the vacuoles detected in the *Impg1*<sup>-/-</sup> retina. Hematoxylin, Heosin, Saffron (HES) staining provided a general overview of the tissue's structure. Hematoxylin stained cell nuclei blue, and eosin stained the extracellular matrix and cytoplasm pink, with other structures taking on different shades, hues, and combinations of these colors. Periodic acid–Schiff (PAS) is a staining method used to detect polysaccharides such as glycogen, and mucosubstances. Although both HES and PAS did not allow us to characterize the material present within the vacuoles.

Sirius Red is an azo dye mainly used to colour collagen fibers. Consistently, this stain colored the collagen fibers present in the Bruch's membrane and the RPE, and, interestingly, we detected fibers inside the vacuoles. These collagen fibers are physiologically present in the RPE. We therefore hypothesized that the integrity of the apical RPE membrane is perturbed in *Impg1*<sup>-/-</sup> mouse, and thus components of cytoplasm seems to be released into the IPM. Lastly, Alcian blue stains sulfated polysaccharides, carboxyl groups (such as sialic acids and uronic acids), and intensifies the staining of hyaluronic acids. Historically, the IPM was characterized by this staining (Porrello et LaVail 1986). Post-staining, it was evident that the IPM of the *Impg1*<sup>-/-</sup> mouse was totally disorganized, which seems incompatible with the small loss of physiological activity detected in the *Impg1*<sup>-/-</sup> mice. Furthermore, it could be seen that the Bruch's membrane and the RPE apical membrane also lost their integrity.

Using higher resolution TEM analysis, melanosomes were also visible inside vacuoles. This melanosome mislocalization suggests rupture of the RPE and release of cytoplasmic components. In addition, an abnormal lipid droplet accumulation was present inside the RPE cells. We think that the IPM dizorganization provokes the RPE to phagocytose abnormal IPM components. However, with age, the resulting accumulation of toxic products in the subretinal space results in RPE degeneration. Furthermore, this disturbance in the subretinal homeostasis that led to RPE degeneration was also accompanied by a subretinal inflammation as evidenced by Iba1 upregulation.

Taken together, our study shows that SPACR is not essential for the development and maturation of functional mouse rod and cone photoreceptors in mice but that it is important for photoreceptor maintenance with age.

In summary, *Impg1*<sup>-/-</sup> mice exhibit subretinal lesions from 9 months accompanied by a disorganised arrangement of the photoreceptors. This is due to an impaired ECM surrounding the photoreceptor cells, which is a consequence of the absence of SPACR, the *Impg1*-encoded protein that is a scaffold component of the matrix. Thus, the *Impg1*<sup>-/-</sup> mouse model is an informative model for deciphering the mechanisms underlying *IMPG1*-associated IRDs. Furthermore, this model could also be informative for studying the fragile balance photoreceptors, RPE Bruch's membrane and the underlying choriocapillaris, which when disturbed can underlie other retinal dystrophies, such as Age related Macular Degeneration (Bhutto et Luty 2012).

## MATERIALS AND METHODS

### Generation of the *Impg1*<sup>-/-</sup> mouse model

The *Impg1*<sup>-/-</sup> mouse model was generated by gene targeting. The exon 6 of *Impg1* was floxed in C57Bl/6J embryonic stem cells to disrupt the open reading frame. After successive crossings with a CMV-CRE mouse model, followed by backcrossing with the C57Bl/6J strain (Jackson Laboratory), we obtained the *Impg1*<sup>-/-</sup> colony. The mice were maintained under 12h light (90 lux) /dark cycles with food and water provided ad libitum at INM animal facility. The housing conditions were pathogen free, kept at a constantly controlled humidity (82%), and at a regulated temperature (22°C). Both sexes were used in all experiments. All experimental procedures involving mice in this study were approved by the National Institute of Health and Medical Research (*registration number*: C34 172 36)

### Western blotting analysis

Whole retinae dissected from wild type or *Impg1*<sup>-/-</sup> mice were grinded and lysed in RIPA buffer (cat. 89900, Thermo Fisher) containing protease and phosphatase inhibitor cocktail tablets (cat # Roche Inc.). An Enhanced BCA Protein Assay kit (cat. #P0010S, Beyotime Biotechnology, Shanghai, China) was used for protein quantification. Proteins (20 µg) were loaded onto a 10% polyacrylamide gel and analyzed by immunoblotting after transfer onto nitrocellulose (NC) membranes. Membranes were saturated within blocking buffer 5% milk for 2 hours, then incubated with primary antibodies (diluted in blocking buffer) overnight at 4°C. The NC membranes were washed three times with 1× TBST buffer for 10 min, and incubated with secondary antibodies (diluted in 5% milk) for 1.5 hours at room temperature. Antibodies used for western blotting were anti-SPACR (cat. G-11 : Santa Cruz-377366 , 2 µg/ml dilution), and anti-GAPDH (cat. #8795, Sigma-Aldrich, 0,05 µg/ml dilution).

### In vivo imaging

Eyes were dilated with 0.5% tropicamide. Mice were anaesthetized prior to imaging with a ketamine and xylazine solution (80 mg/kg ketamine, 16 mg/kg xylazine). An ophthalmic gel (Lacryvisc; Alcon®, Novartis; Fort Worth, USA) was applied to keep the cornea moist and minimize the refraction of light. Mice were kept on heating plate throughout the procedures. Fundus imaging were performed using a Retinal Imaging System (Phoenix Micron III, California, USA). Images were obtained with the Discover software (Phoenix research lab; Phoenix, United States). Autofluorescence filters were developed with excitation range of 444-564 nm and an emission range above 568 nm. SD-OCT was performed on 9- and 14-month-old mice using an EnVisu R2200 imaging (Biotigen, Leica Microsystems; Wetzlar, Germany), as previously described (Jagodzinska et al. 2017). The images covered a surface area of 1.4 x 1.4 mm centered on the optic nerve with 100 b-scans per eye with 1000 points

resolution per b-scan. For quantitative data, we performed an average of the ratios of outer to inner retinal layer thickness (10 measures per retina; n=5 mice per group).

### **Electroretinogram (ERG)**

Electroretinogram recordings were performed on mice aged 2, 9 and 14 months. Age-matched control and mutant mice were dark-adapted overnight, and all subsequent procedures were performed under dim red light. Following anaesthesia, the pupils of the mice were dilated with a drop of 0.5% tropicamide, 0.4% oxybuprocaine hydrochloride and 10% phenylephrine. Eyes were moistened regularly throughout the procedure to avoid dryness (Lacryvisc; Alcon®, Novartis; Fort Worth, USA) and to maintain low impedances. Mice were placed on a heating plate with a rectal temperature control probe. The reference electrodes were placed subcutaneously, behind the ears and at the lower back of the mouse. ERGs were recorded with cotton electrodes soaked in physiological saline, as previously described (Chekroud et al. 2011), using Visiosystem equipment (SIEM Bio-Médicale; Nimes; France). Full scotopic flash intensity ERG was performed in response to light flashes (5 ms) with intensities ranging from -1 to 2 log cd.s.m<sup>-2</sup>. The measurements corresponded to the average of 7 light flashes with a frequency of 0.3 Hz. For photopic ERG, a white background light of 2 log cd.s.m<sup>-2</sup> was used to light adapt mice for 5 minutes. The same scotopic protocol was initially used: blue flashes at 2 log cd.s.m<sup>-2</sup> intensities and green flashes at 2 log cd.s.m<sup>-2</sup>, and the last phase corresponded to the flicker protocol: achromatic flashes of 2 log cd.s.m<sup>-2</sup> at a frequency of 10 Hz. For flicker recordings, measurements corresponded to the average of the amplitudes of the 3 waves visible on a window of 300 ms. Data were analyzed with the Vision System software, only the best value of the 2 eyes was exploited. For each group, six control mice and six mutant mice were tested.

### **Transmission electron microscopy (TEM)**

Mice aged 14 months were euthanized, and the eyes carefully enucleated. By microdissection, the cornea was removed from the eye. The posterior part of the eye was fixed overnight in 2.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences; Hatfield, USA) and 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences; Hatfield, USA) diluted in PHEM buffer, pH 7.4. Following fixation, the eyes were washed in PHEM buffer, the lens removed, and the eyecups were contrast stained with a solution containing 0.5% osmium tetroxide (Electron Microscopy Sciences; Hatfield, USA) at room temperature for 2 hours in the dark. The eyes were rinsed with PHEM buffer and successively underwent ethanol dehydration baths (30-100%; Sigma-Aldrich, Merck; St. Louis, USA). The eyes were then embedded in resin (EmBed 812 Resin; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) according to the supplier's protocol, with the automated microwave for tissue management (EM AMW; Leica; Wetzlar, Germany). After embedding, sagittal sections of 70 nm were cut using an ultra-microtome (Ultracut E; Leica-Reichert; Wetzlar, Germany). The sections were collected and stained with 1.5% uranyl acetate (Electron Microscopy Sciences; Hatfield, USA) in 70% ethanol and lead citrate

(Electron Microscopy Sciences; Hatfield, USA). The sections were observed using a transmission electron microscope (Tecnai G2 F20 Spirit BioTWIN TEM; FEI, Thermo Fisher Scientific; Hillsboro, USA) and photographed with an Eagle 4K HS camera, optimal for high data acquisition resolution. A qualitative comparison, without statistical analyses, was performed between the *Impg1*<sup>-/-</sup> mice and age-matched control mice of the same genetic background.

## Histochemistry

After sacrifice, the mice was enucleated; the eye was immersed in a 4% paraformaldehyde fixative solution (Electron Microscopy Sciences; Hatfield, USA) diluted in PBS (Sigma-Aldrich; Merck; St. Louis; USA) with stirring overnight at 4°C. The eyes were washed with cold PBS, depigmented with 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution (VWR 23619.264) 30mn and placed in a 70% EtOH (VWR 83804.360) solution. Samples were collected and fixed 24 hours in neutral buffered formalin 10%, dehydrated, and embedded in paraffin. Paraffin-embedded tissue was cut into 3- $\mu$ m-thick sections, mounted on slides, and dried at 37°C overnight. Tissue sections were stained with hematoxylin (Sigma-H3136), eosin (Merck-E4382), saffron (VWR 11507737) (HES) with HMS 740 autostainer (MM France) for preliminary analysis. Collagen fibers were stained by Sirius Red (Merck-365548), carbohydrate macromolecules by PAS (Merck-3952016) or sulphated and non-sulphated acidic carbohydrates by Alcian Blue (Merck-A3157). All stainings was performed like these methods (Sweet, Puchtler, et Rosenthal 1964).

## Statistics

Statistical analyses were performed using Excel Software (version 2016). The data of two samples were first analyzed with the Shapiro–Wilk normality test, and then two-tailed P-values were determined using an unpaired Student's t test. A p-value of <0.05 was considered significant. All analyses was performed on age-matched mutant mice and wild-type littermates. No sex-dependent differences in the phenotypes were noted.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We address special thanks to the Valentin Haüy and Retina France associations, which supported Guillaume OLIVIER. This project was funded by the French Foundation for Rare Disease (Fondation Maladies Rares). We would like to thank all the technical facilities : Montpellier Experimental Histology Network (RHEM), Montpellier Imagery Resources (MRI) and Transmission Electronic Microscopy (COMET). Finally, we thank Pascal BOUFFI, Jérôme SARNIGUET and all staff of the animal facility at the INM.

## **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- Acharya, S, V C Foletta, J W Lee, M E Rayborn, I R Rodriguez, W S Young 3rd, et J G Hollyfield. 2000a. « SPACRCAN, a novel human interphotoreceptor matrix hyaluronan-binding proteoglycan synthesized by photoreceptors and pinealocytes ». *The Journal of biological chemistry* 275 (10): 6945-55.
- Acharya, S., V. C. Foletta, J. W. Lee, M. E. Rayborn, I. R. Rodriguez, W. S. Young, et J. G. Hollyfield. 2000b. « SPACRCAN, a Novel Human Interphotoreceptor Matrix Hyaluronan-Binding Proteoglycan Synthesized by Photoreceptors and Pinealocytes ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (10): 6945-55. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.10.6945>.
- Acharya, S, M E Rayborn, et J G Hollyfield. 1998. « Characterization of SPACR, a Sialoprotein Associated with Cones and Rods Present in the Interphotoreceptor Matrix of the Human Retina: Immunological and Lectin Binding Analysis ». *Glycobiology* 8 (10): 997-1006.
- Acharya, S, I R Rodriguez, E F Moreira, R J Midura, K Misono, E Todres, et J G Hollyfield. 1998. « SPACR, a Novel Interphotoreceptor Matrix Glycoprotein in Human Retina That Interacts with Hyaluronan ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (47): 31599-606.
- Bandah-Rozenfeld, Dikla, Rob W. J. Collin, Eyal Banin, L. Ingeborgh van den Born, Karlien L. M. Coene, Anna M. Siemiatkowska, Lina Zelinger, et al. 2010a. « Mutations in IMPG2, Encoding Interphotoreceptor Matrix Proteoglycan 2, Cause Autosomal-Recessive Retinitis Pigmentosa ». *American Journal of Human Genetics* 87 (2): 199-208. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.07.004>.
- Bandah-Rozenfeld, Dikla, Rob W J Collin, Eyal Banin, L Ingeborgh van den Born, Karlien L M Coene, Anna M Siemiatkowska, Lina Zelinger, et al. 2010b. « Mutations in IMPG2, encoding interphotoreceptor matrix proteoglycan 2, cause autosomal-recessive retinitis pigmentosa ». *American journal of human genetics* 87 (2): 199-208. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.07.004>.
- Bhutto, Imran, et Gerard Luttj. 2012. « Understanding Age-Related Macular Degeneration (AMD): Relationships between the Photoreceptor/Retinal Pigment Epithelium/Bruch's Membrane/Choriocapillaris Complex ». *Molecular Aspects of Medicine* 33 (4): 295-317. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.04.005>.
- Campa, Claudio, Francesco Parmeggiani, Rossella Spina, Davide Ognibene, Ilaria Passerini, et Francesca Gualandi. 2020. « A Novel Mutation of BEST1 Gene in Best Disease ». *European Journal of Ophthalmology*, avril, 1120672120920536. <https://doi.org/10.1177/1120672120920536>.
- Chekroud, Karim, Carl Arndt, Danièle Basset, Christian P. Hamel, Philippe Brabet, et Marie O. Pequignot. 2011. « Simple and Efficient: Validation of a Cotton Wick Electrode for

- Animal Electroretinography ». *Ophthalmic Research* 45 (4): 174-79.  
<https://doi.org/10.1159/000321118>.
- Chen, Qiuyun, Jung Wha Lee, Kazutoshi Nishiyama, Karen G. Shadrach, Mary E. Rayborn, et Joe G. Hollyfield. 2003. « SPACRCAN in the Interphotoreceptor Matrix of the Mouse Retina: Molecular, Developmental and Promoter Analysis ». *Experimental Eye Research* 76 (1): 1-14. [https://doi.org/10.1016/s0014-4835\(02\)00273-7](https://doi.org/10.1016/s0014-4835(02)00273-7).
- Delori, F. C., C. K. Dorey, G. Staurenghi, O. Arend, D. G. Goger, et J. J. Weiter. 1995. « In Vivo Fluorescence of the Ocular Fundus Exhibits Retinal Pigment Epithelium Lipofuscin Characteristics ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 36 (3): 718-29.
- Felemban, Majed, Birthe Dorgau, Nicola Claire Hunt, Dean Hallam, Darin Zerti, Roman Bauer, Yuchun Ding, et al. 2018. « Extracellular Matrix Component Expression in Human Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Organoids Recapitulates Retinogenesis in Vivo and Reveals an Important Role for IMPG1 and CD44 in the Development of Photoreceptors and Interphotoreceptor Matrix ». *Acta Biomaterialia* 74: 207-21.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.05.023>.
- Ishikawa, Makoto, Yu Sawada, et Takeshi Yoshitomi. 2015. « Structure and Function of the Interphotoreceptor Matrix Surrounding Retinal Photoreceptor Cells ». *Experimental Eye Research*, Ocular extracellular matrix: Role in development, homeostasis and disease, 133 (avril): 3-18. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.02.017>.
- Jagodzinska, Jolanta, Emmanuelle Sarzi, Mélanie Cavalier, Marie Seveno, Volker Baecker, Christian Hamel, Marie Péquignot, et Cecile Delettre. 2017. « Optical Coherence Tomography: Imaging Mouse Retinal Ganglion Cells In Vivo ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n° 127 (22). <https://doi.org/10.3791/55865>.
- Kuehn, M H, et G S Hageman. 1999. « Expression and characterization of the IPM 150 gene (IMPG1) product, a novel human photoreceptor cell-associated chondroitin-sulfate proteoglycan ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 18 (5): 509-18.
- Manes, Gaël, Isabelle Meunier, Almudena Avila-Fernández, Sandro Banfi, Guylène Le Meur, Xavier Zanlonghi, Marta Corton, et al. 2013a. « Mutations in IMPG1 Cause Vitelliform Macular Dystrophies ». *American Journal of Human Genetics* 93 (3): 571-78.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.07.018>.
- . 2013b. « Mutations in IMPG1 Cause Vitelliform Macular Dystrophies ». *American Journal of Human Genetics* 93 (3): 571-78.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.07.018>.
- Meunier, Isabelle, Gaël Manes, Béatrice Bocquet, Virginie Marquette, Corinne Baudoin, Bernard Puech, Sabine Defoort-Dhellemmes, et al. 2014. « Frequency and Clinical Pattern of Vitelliform Macular Dystrophy Caused by Mutations of Interphotoreceptor Matrix IMPG1 and IMPG2 Genes ». *Ophthalmology* 121 (12): 2406-14.  
<https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2014.06.028>.

- Palmai-Pallag, Timea, Naila Khodabukus, Leo Kinarsky, Shih-Hsing Leir, Simon Sherman, Michael A. Hollingsworth, et Ann Harris. 2005. « The Role of the SEA (Sea Urchin Sperm Protein, Enterokinase and Agrin) Module in Cleavage of Membrane-Tethered Mucins ». *The FEBS Journal* 272 (11): 2901-11. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04711.x>.
- Porrello, K., et M. M. LaVail. 1986. « Histochemical Demonstration of Spatial Heterogeneity in the Interphotoreceptor Matrix of the Rat Retina ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 27 (11): 1577-86.
- Querques, Giuseppe, Jennyfer Zerbib, Anouk Georges, Nathalie Massamba, Raimondo Forte, Jean-Michel Rozet, Josseline Kaplan, et Eric H Souied. 2014. « Multimodal Analysis of the Progression of Best Vitelliform Macular Dystrophy ». *Molecular Vision*, 18.
- Salido, Ezequiel M., et Visvanathan Ramamurthy. 2020. « Proteoglycan IMPG2 Shapes the Interphotoreceptor Matrix and Modulates Vision ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, avril. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2994-19.2020>.
- Schuerch, Kaspar, Marcela Marsiglia, Winston Lee, Stephen H. Tsang, et Janet R. Sparrow. 2016. « MULTIMODAL IMAGING OF DISEASE-ASSOCIATED PIGMENTARY CHANGES IN RETINITIS PIGMENTOSA ». *Retina (Philadelphia, Pa.)* 36 Suppl 1 (décembre): S147-58. <https://doi.org/10.1097/IAE.0000000000001256>.
- Song, Inseon, et Alexander Dityatev. 2018. « Crosstalk between Glia, Extracellular Matrix and Neurons ». *Brain Research Bulletin* 136: 101-8. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.03.003>.
- Sweat, F., H. Puchtler, et S. I. Rosenthal. 1964. « SIRIUS RED F3BA AS A STAIN FOR CONNECTIVE TISSUE ». *Archives of Pathology* 78 (juillet): 69-72.
- Tripathy, Koushik, et Baby Salini. 2020. « Best Disease ». In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537290/>.
- Xu, Huijuan, Chao Qu, Li Gan, Kuanxiang Sun, Junkai Tan, Xuyang Liu, Zhilin Jiang, et al. 2020. « Deletion of the Impg2 Gene Causes the Degeneration of Rod and Cone Cells in Mice ». *Human Molecular Genetics* 29 (10): 1624-34. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa062>.
- Zhao, Jinsong, Masahiko Yoneda, Masayuki Takeyama, Osamu Miyaishi, Yoko Inoue, Takuya Kataoka, Akiko Ohno-Jinno, et al. 2008. « Characterization of a Motif for Specific Binding to Hyaluronan in Chicken SPACR ». *Journal of Neurochemistry* 106 (3): 1117-24. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05468.x>.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Validation of the *Impg1*<sup>-/-</sup> mouse model. (A)** The exon 6 of *Impg1* mouse was floxed in C57BL/6J embryonic stem cells to disrupt the open reading frame. **(B)** The expression of SPACR protein in wild type (*Impg1*<sup>+/+</sup>), heterozygote (*Impg1*<sup>+/-</sup>) and SPACR-deficient (*Impg1*<sup>-/-</sup>) mice was analyzed by western blotting using mouse monoclonal antibodies against SPACR (2 µg/ml dilution) and GAPDH (0,05 µg/ml dilution). GAPDH expression was used as protein loading control.

**Figure 2. *Impg1*<sup>-/-</sup> mice develop autofluorescent subretinal deposits. (A)** Fundus examination showed numerous retinal hypopigmented deposits (arrow) from 9 months of age, some of which are autofluorescent (excitation range is 444.5-564.5 nm and emission range from 568nm and upwards). Asterisks indicate the optic nerve. **(B)** Fundus examination of 14-month old mice. Retinal deposits (arrow) increase in number and autofluorescence with age. **(C)** SD-OCT localized these hyper-reflective clusters between the photoreceptor outer segment (POS) and the retinal pigment epithelium (RPE). 10 wild-type mice and 10 *Impg1*<sup>-/-</sup> mice were examined, and all 9-month and 14-month mutant mice had similar clusters (white arrow) more or less close together, which were not present in wild type mice (left image). **(D)** Funduscopy and SD-OCT imaging of an *Impg1*<sup>-/-</sup> retina with a large localized accumulation. Right panel shows 3D reconstitution.

**Figure 3. Photoreceptor degeneration of *Impg1*<sup>-/-</sup> mice. (A)** Scotopic electroretinography response of *Impg1*<sup>-/-</sup> mice (red line) compared to WT mice (blue line) as a function of flash intensity. **(B)** Removal of *Impg1* reduces the amplitude of the scotopic (upper left panel) and photopic responses at light intensity levels of 2 log cd-s.m<sup>-2</sup> and frequencies of 0.3 Hz and 10 Hz (flickers, upper right panel). Opsin S (blue light) and M (green light) responses are decreased in *Impg1*<sup>-/-</sup> mice (lower panels). Bars represent mean ± SEM, n=6 with normal distribution, Student's t-test was used. \* p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\* p<0.001. **(C)** SD-OCT analysis of *Impg1*<sup>+/+</sup> versus *Impg1*<sup>-/-</sup>. Left panel shows the retinal section of a wild-type mouse with annotated layers. The thickness of the inner retinal layer (IRL) and outer retina layer (ORL) were measured for each genotype and the ORL/IRL ratio was used to evaluate outer retina thickness in wild-type (*Impg1*<sup>+/+</sup>, blue bars) vs. KO (*Impg1*<sup>-/-</sup>, red bars) mice at 9 and 14 months of age (right panels). The ORL/IRL ratio was reduced in *Impg1*<sup>-/-</sup> mice. Bars represent the mean of ten OCT measurements per animal, 5 animals per group. Student's t-test was used. \* p<0,05, \*\*p<0.01; \*\*\* p<0.001.

**Figure 4. Abnormal accumulation of cellular material in interphotoreceptor matrix. (A)** Histological study showing the interphotoreceptor matrix disorganisation. Retinal cryosections (3 µm) were stained with Hematoxylin/Eosin/Saffron (HES), Periodic Acid Schiff (PAS), Sirius Red, (SR), and Alcian Blue (AB) to reveal the nature of the material abnormally localised in the IPM. **(B)** Sirius Red confirms the presence of collagen around the vacuoles in the IPM of *Impg1*<sup>-/-</sup> mice, compared to WT retinae (left panels). Alcian blue (pH 2,6) demonstrated total disorganization of the *Impg1*<sup>-/-</sup> photoreceptors, as well as thickening of the Bruch's membrane. **(C)** Electron microscopy images show accumulation of material in the interphotoreceptor matrix, close to the RPE in the absence of SPACR protein, in addition an accumulation of various lipid droplets was visible in RPE cells (arrows) in contact with this material.

### Supplemental Data

**Reactive gliosis and microglial migration to the subretinal space. (A)** Anti-Iba1 immunofluorescence (red) shows microglia migration, significant sub-retinal inflammation is present in *Impg1*<sup>-/-</sup> mice (age 14 months).

Figure 1

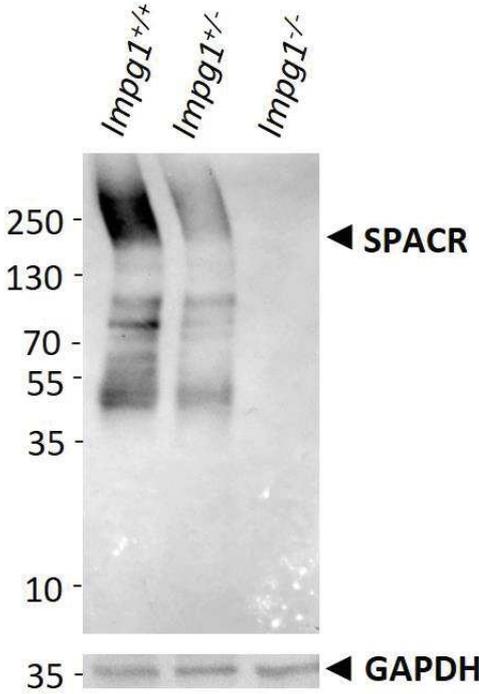
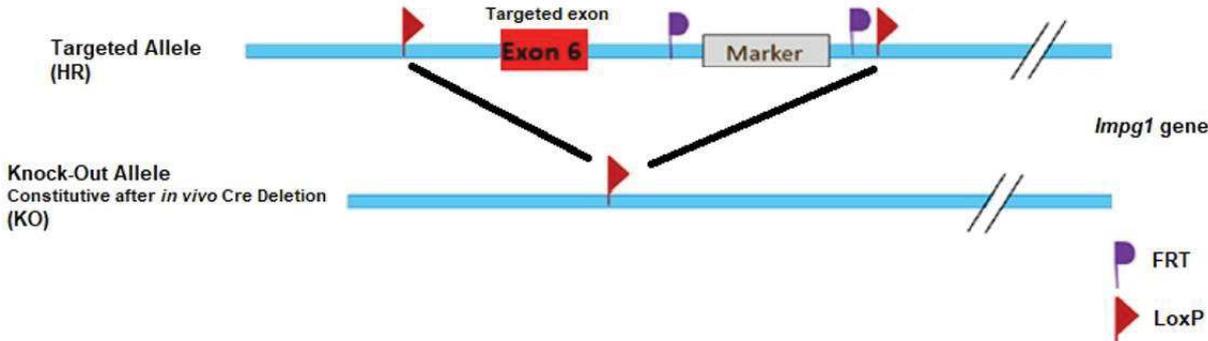


Figure 2

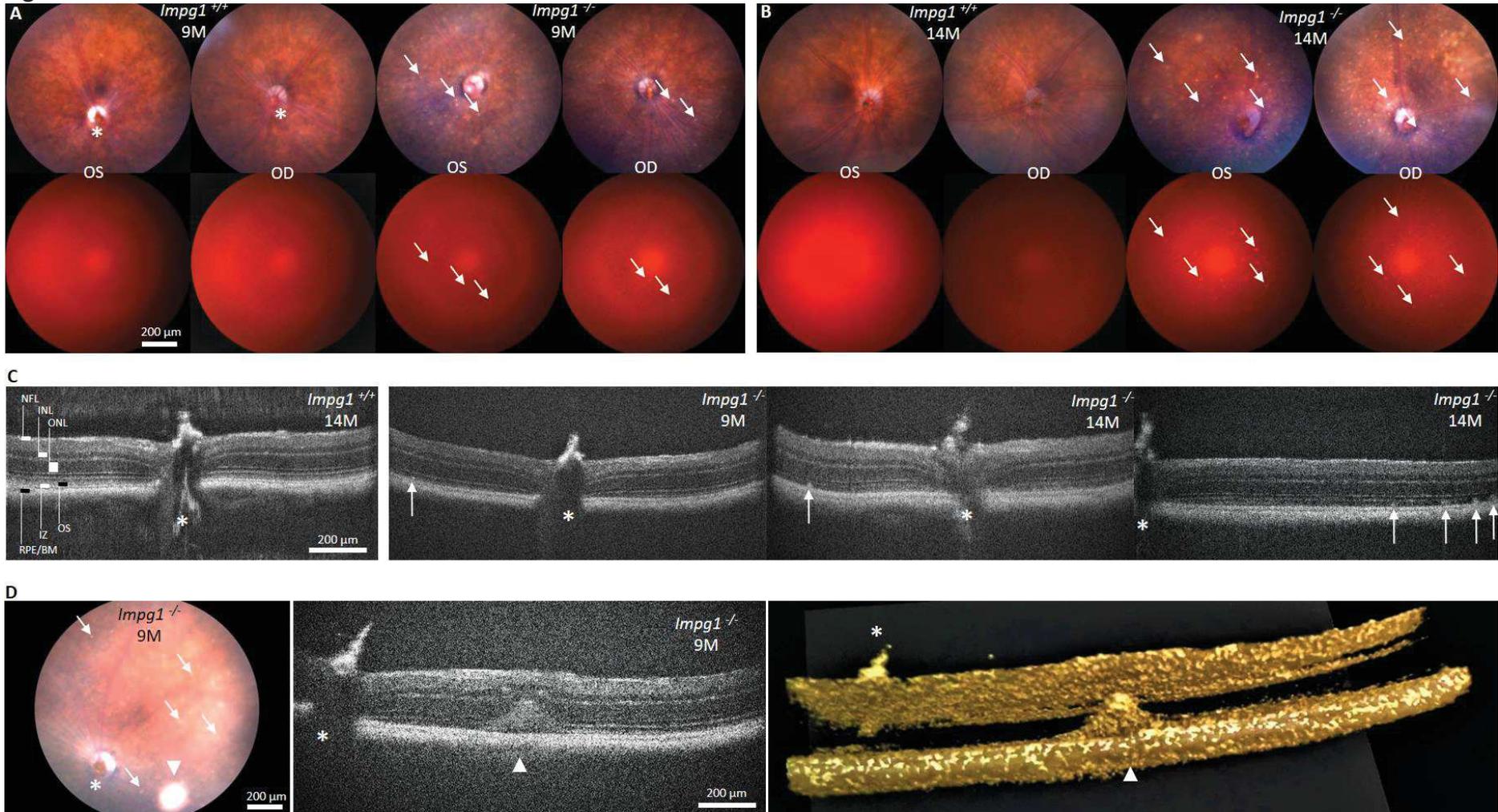


Figure 3

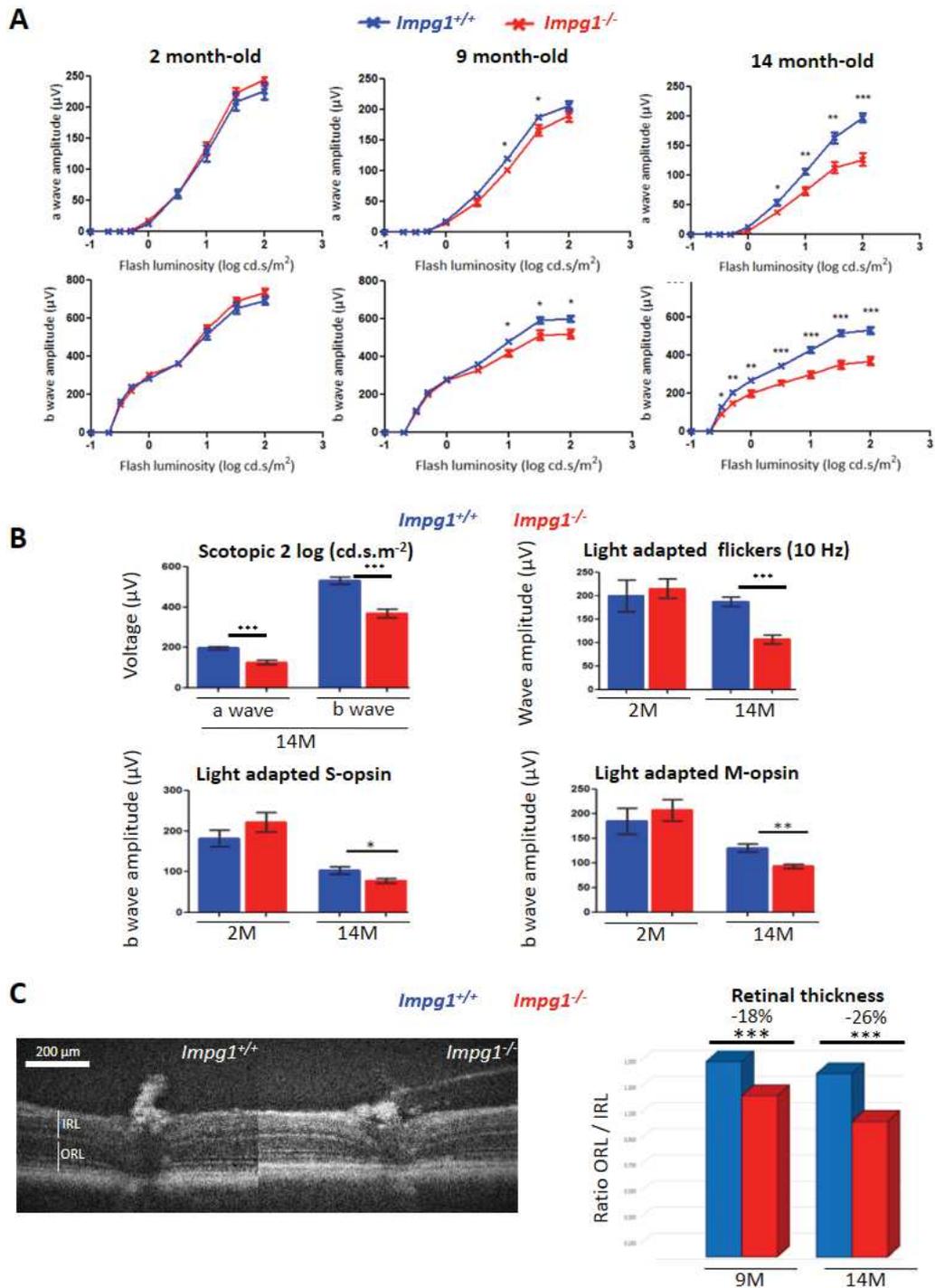
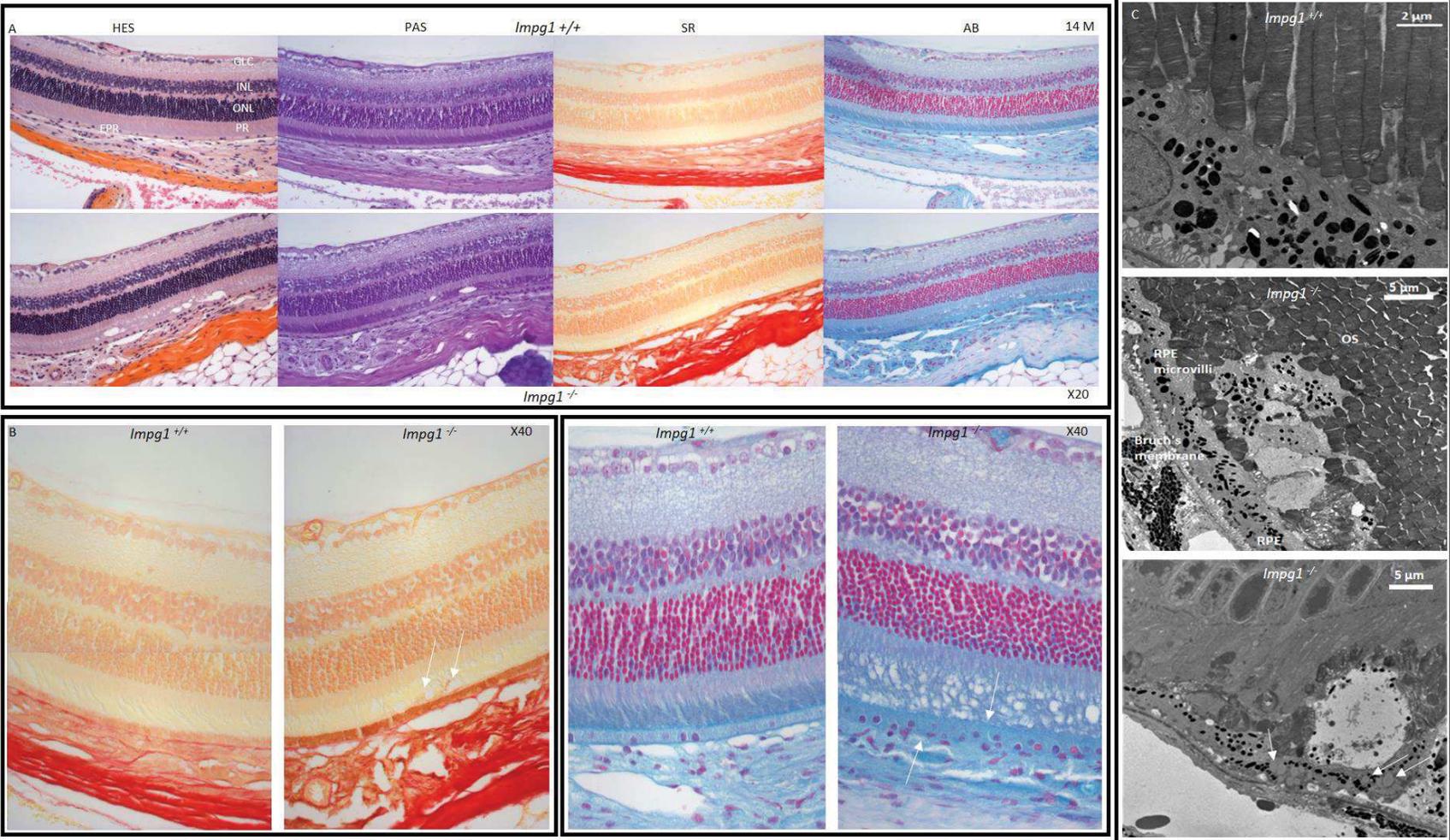
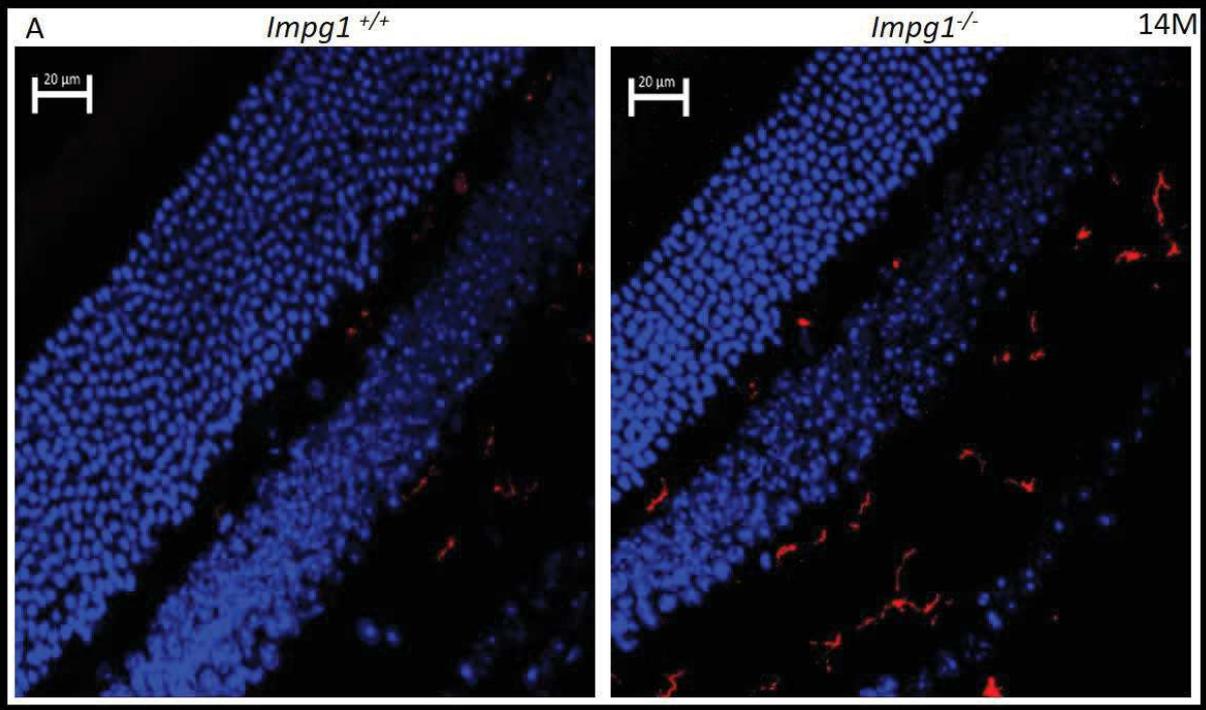


Figure 4



Supplemental Data



## [II.3: Discussion](#)

### **Le modèle *Impg1*<sup>-/-</sup> présente une accumulation de matériel autofluorescent sous rétinien**

Les mécanismes moléculaires des dystrophies rétiniennes sont très différents et particulièrement complexes dans ces neuropathologies neurodégénératives. Le manque de modèles animaux rend difficile la compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents.

Dans cette étude, nous avons généré un modèle *Impg1* knock out total pour déterminer le rôle in vivo de la protéine SPACR au sein de la matrice interphotoréceptrice. Peu de choses sont connues, elle agit comme une protéine d'échafaudage par liaison à de multiples glycosaminoglycanes (130).

La protéine SPACR interagit avec les photorécepteurs au sein de la MIP (131), nos données indiquent que les souris KO pour le gène *Impg1* présentent un phénotype de dégénérescence rétinienne à partir de 9 mois. Ce nouveau modèle de souris présente des lésions multifocales sur toute la surface rétinienne à partir de 9 mois visibles en fondoscopie, sans préférence de localisation. L'absence de la protéine SPACR génère des lésions sous-rétiniennes comparables à celles visibles chez l'homme (127). La tomographie en cohérence optique révèle leur localisation exacte. L'accumulation de matière est située dans la matrice interphotoréceptrice, entre les segments externes des photorécepteurs et les microvillosités apicales de l'épithélium pigmentaire rétinien.

La souris *Impg1*<sup>-/-</sup> semble présenter la même accumulation sous-rétinienne que la dystrophie maculaire vitelliforme adulte (DMVA) (92).

De façon intéressante, tout comme la DMVA (et la DMVJ) : ce matériel est autofluorescent chez les souris *Impg1*<sup>-/-</sup>; et cette autofluorescence augmente fortement avec l'âge (Figure 1).

De nombreux composés s'accumulent naturellement avec l'âge, le principal composé autofluorescent étant la lipofuscine. In vivo la lipofuscine présente une émission maximale à 630 nm et une excitation optimale d'environ 510 nm (132). Nous avons développé au laboratoire des filtres spécifiques pour détecter l'autofluorescence de la lipofuscine murine in vivo. En plus de son

identique localisation, nous pouvons confirmer que le matériel accumulé dans le modèle *Impg1*<sup>-/-</sup> est autofluorescent.

### **Dégénérescence des cellules en contact avec la matrice interphotoréceptrice après sa destruction**

Les souris *Impg1*-KO présentent une réponse électrophysiologique scotopique modérément affaiblie dès l'âge de 9 mois (Figure 3). Une étude approfondie d'électrophysiologie nous a permis de montrer que les 2 types de photorécepteurs étaient impactés. La diminution relative de la réponse électrophysiologique a été corrélée avec la dégénérescence des photorécepteurs. Les mesures OCT montrent une diminution statistique de la couche des photorécepteurs (-26% à 16 mois), preuve de la dégénérescence des photorécepteurs (Figure 4).

L'étude histologique montre une désorganisation des photorécepteurs au sein de la matrice interphotoréceptrice (MIP). Des vacuoles sont visibles sur des sections de la rétine au sein de la MIP. Nous avons réalisé différentes colorations histochimiques pour caractériser ces vacuoles.

Le rouge Sirius est un colorant azoïque principalement utilisé pour colorer les fibres de collagène (rouge). De manière intéressante, les fibres de collagène présentent dans la membrane de Bruch et dans l'EPR sont visibles au niveau des vacuoles (Figure 6-A2 flèche). Ces fibres de collagène sont physiologiquement présentes à l'intérieur de l'EPR, on suppose que l'intégrité de la membrane apicale de l'EPR serait perturbée chez la souris *Impg1*<sup>-/-</sup>. Les composants cytoplasmiques de l'EPR semblent être libérés dans la MIP.

Le bleu alcian colore les polysaccharides sulfatés, les groupes carboxyles (tels que les acides sialiques et les acides uroniques) et l'acide hyaluronique. Historiquement, la matrice interphotoréceptrice a été caractérisée grâce au bleu alcian à pH 2,6 (133).

La matrice interphotoréceptrice des souris *Impg1*<sup>-/-</sup> est totalement désorganisée. Cette forte destruction laisse dubitatif au vu de la perte modérée d'activité physiologique des (Figure 6-A3). De plus, la membrane de Bruch et la membrane apicale de l'EPR ont perdu leur intégrité. Ces observations font de cette souris un modèle très intéressant pour étudier la dégénérescence rétinienne.

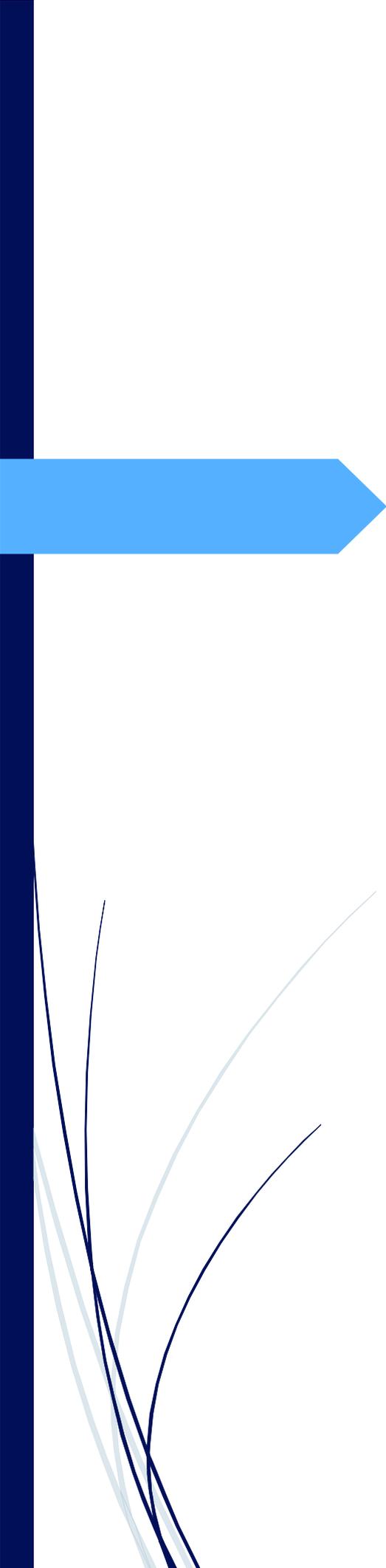
De nombreuses dystrophies rétiniennes relient l'équilibre fragile entre: les PR / l'EPR / la membrane de Bruch et la choriocapillaire, beaucoup de travaux sur la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) s'intéressent à ce fragile équilibre (134).

L'observation par microscopie électronique à transmission de ces vacuoles a révélé la présence de mélanosomes en leur intérieur (Figure 5). Cette mauvaise localisation mélanosomique sous rétinienne confirme la libération des composants cytoplasmiques de l'EPR. De plus, une accumulation anormale de gouttelettes lipidiques est présente à l'intérieur des cellules de l'EPR au niveau de ces anomalies. Nous pensons que la désorganisation de la MIP conduit à la phagocytose de composants anormalement localisés; avec le vieillissement, l'EPR ne peut continuer à phagocytter le matériel sous-rétinien et dégénère.

L'immunofluorescence anti-Iba1, révèle une importante inflammation sous-rétinienne (Figure 7). Les lésions sous-rétiniennes modifient l'environnement homéostasique de la matrice interphotoréceptrice, et entraînent une migration de la microglie.

En résumé, le modèle *Impg1*<sup>-/-</sup> est très intéressant pour dévoiler les mécanismes sous-jacents des dystrophies rétiniennes. Les souris *knock out* présentent des lésions sous-rétiniennes à partir de 9 mois, avec une désorganisation des photorécepteurs.

Notre étude montre que SPACR n'est pas essentiel pour le développement des photorécepteurs, il n'est pas un acteur clé pour le développement et la maturation des segments externes des photorécepteurs chez la souris. En revanche l'absence de la protéine SPACR perturbe l'homéostasie sous-rétinienne, et conduit à une dégénérescence tardive des photorécepteurs et de l'EPR. L'épithélium pigmentaire rétinien dégénère après phagocytose excessive de matrice extracellulaire anormale, avec une inflammation sous-rétinienne. SPACR peut jouer un rôle important dans le processus de vieillissement normal des photorécepteurs, la souris *Impg1*<sup>-/-</sup> fournit un bon modèle de maladie rétinienne-dégénératives (avec des mécanismes similaires à la DMLA par exemple).



## Discussion Générale et Perspectives

*« Les choses que l'on possède finissent par nous posséder »  
Fight Club*

Les dystrophies rétiniennes héréditaires sont des maladies classées comme rares, avec une transmission familiale pour la plupart des cas. Les dystrophies héréditaires se traduisent par un dysfonctionnement rétinien à l'origine de troubles visuels d'intensité et d'évolution pouvant être très variables. Ces affections neurodégénératives, sont classiquement bilatérales et bien souvent symétriques. La stratégie diagnostique des dystrophies héréditaires est basée sur la fondoscopie, l'ERG, l'OCT, l'anamnèse, la vision des couleurs et le mode de transmission

Les dystrophies rétiniennes héréditaires associées aux variants pathogènes du gène *IMPG1* peuvent provoquer:

\*la dystrophie maculaire vitelliforme, une affection dégénérative de la région centrale de la rétine, dystrophie maculaire principalement caractérisée par une accumulation de matériel autofluorescent visible en fond d'œil et en OCT (lésion vitelliforme) et une baisse d'acuité visuelle **(3.2.2.3)** (127).

\*La rétinite pigmentaire, une affection dégénérative en périphérie rétinienne, dystrophie principalement caractérisée par des dépôts pigmentaires en forme d'ostéoblaste visibles en fond d'œil, un ERG diminué, une héméralopie et une réduction du champs visuel **(3.1.1)** (Olivier et al 2020a).

Durant mon doctorat j'ai pu mettre en évidence l'association de plusieurs variants pathogènes du gène *IMPG1* chez 11 familles, avec des phénotypes de dystrophies maculaires vitelliformes, et des phénotypes de rétinites pigmentaires (ce qui n'avait encore jamais été montré jusque là).

Dans les cas de transmission hétérozygote, certains individus sont porteurs du variant pathogène mais ne présentent pas de signes cliniques de la pathologie, la pénétrance est donc incomplète. Le cas de la famille G nous démontre que le même variant du gène *IMPG1* peut causer différents phénotypes (RP ou DMVA) au sein d'une même famille.

Des porteurs de variants *IMPG1* ayant des examens cliniques normaux ou avec de faibles atteintes avaient déjà été mentionnés dans la littérature (127). Les mécanismes exacts de ces pénétrances incomplètes et de ces expressions variables ne sont pas encore compris.

La dystrophie maculaire vitelliforme représente la seconde cause de maculopathie après la maladie de Stargardt (**3.2.1.3**) (74,135). Le gène *BEST1* est le gène majeur associé à la dystrophie maculaire vitelliforme. Une mutation hétérozygote de type faux-sens est identifiée dans 60% des formes juvéniles (avant 40 ans) (**3.2.1.2**) (114,135,136). Une mutation hétérozygote faux-sens ou tronquante du gène *PRPH2* est présente dans 15% des formes de l'adulte (après 40 ans) (**3.2.1.2**) (104,105). Les variants des gènes *IMPG1* et *IMPG2* représentent quant à eux approximativement 8% des familles atteintes de dystrophie maculaire vitelliforme qui sont négatives pour les gènes *BEST1* et *PRPH2*.

La rétinite pigmentaire est la première cause de cécité héréditaire dans les pays développés et touche 1 personne sur 4000. Malgré l'identification de plus de 90 gènes associés à la RP, les tests génétiques conventionnels ne parviennent pas à détecter un diagnostic moléculaire chez environ un tiers des patients RP.

Les travaux de notre équipe avaient permis d'associer le gène *IMPG1* à la DMV en 2013, le gène *IMPG2* en 2014, ces gènes étaient donc désormais à considérer dans la recherche du diagnostic moléculaire de patients atteints de DMV. Ce travail doctoral permet maintenant l'ajout du gène *IMPG1* à la liste des gènes à considérer dans des cas de RP.

SPACR codée par le gène *IMPG1* est une protéine matricielle. Epaisse de seulement 50µm, la matrice interphotoréceptrice est l'espace extracellulaire située entre les segments internes des photorécepteurs et l'EPR (**Chapitre 2**).

SPACR a un rôle structural dans l'organisation de la matrice interphotoréceptrice, les précédents travaux des équipes de HAGEMAN, HOLLYFIELD et ZAKO ont permis de découvrir/caractériser le gène *IMPG1*, la protéine SPACR et ses interactions au sein de la matrice interphotoréceptrice (37,119,120,120,130,137–142). La protéine SPACR est une glycoprotéine qui interagit avec les

photorécepteurs et les glycoaminoglycanes de la matrice interphotoréceptrice, notamment l'héparine sulfate ainsi que le GAG majeur de la matrice interphotoréceptrice : l'acide hyaluronique.

Au travers d'une collaboration avec le *Telethon Institute of Genetics And Medicine* à Naples, j'ai pu procéder à une étude *in vivo* sur le modèle poisson medaka. Un modèle biologique pertinent et rapide pour screener les potentiels rôles physiopathologiques d'un gène candidat. Par l'injection de morpholinos *Impg1* et *Impg2*, le knock down a révélé une diminution de 20% de la longueur des segments externes des bâtonnets et de 90% de celle des cônes. La co-injection des 2 morpholinos n'a pas produit d'effet cumulatif. Les cônes semblent plus sensibles à la sous expression de ces gènes. L'absence d'effet cumulatif de la coinjection des 2 morpholinos laisse à penser que les 2 gènes pourraient avoir des fonctions redondantes au sein de la MIP.

Le medaka fish a été un bon moyen ; rapide, d'observer l'impact d'une diminution d'expression de SPACR et SPACRCAN sur le développement de la rétine via des techniques histologiques. Des limites subsistent cependant dans l'utilisation de morpholino en recherche génétique chez le poisson.

La concentration en morpholino étant déterminée empiriquement, les morpholinos sont injectés au stade 1 cellule puis réparties aléatoirement selon la division cellulaire. De plus l'effet du morpholino s'estompe au cours du temps, et lors du sacrifice du poisson au stade 40 (10 jours), l'expression de la protéine n'a pas été homogène au cours du temps.

Le medaka est un poisson phylogénétiquement proche du zebra fish, ils présentent tout deux des mécanismes moléculaires similaires (143). De nombreuses études ont démontré la régénération des PR chez le zebra fish, après des lésions. En effet une dégénération des cellules rétinienne peut être compensée par une activation et une différenciation des cellules de Muller chez ce type d'espèce (144–146).

Pour finir, la recherche médicale dans les dystrophies rétinienne se heurte aux différences anatomiques des humains et des animaux de laboratoire (hors primates non humain). L'organisation spatiale des photorécepteurs dans la rétine humaine est difficilement comparable à celle du poisson, cette espèce ne possédant pas de région spécifique à un type de PR. Ce manque de modèles animaux avec une zone maculaire et fovéolaire rend difficile la compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents (147).

Dans le but de poursuivre l'investigation du mécanisme physiopathologique lié à des variations du gène *IMPG1*, nous avons généré un modèle *Impg1 knock out* total pour déterminer le rôle in vivo de la protéine SPACR au sein de la matrice interphotoréceptrice.

La souris *Impg1<sup>-/-</sup>* présente un phénotype de dégénérescence rétinienne à partir de 9 mois, des accumulations multifocales autofluorescentes sur toute la surface de la rétine, localisées entre les segments externes des photorécepteurs et les microvillosités apicales de l'EPR. L'autofluorescence augmente fortement avec l'âge.

La souris *Impg1<sup>-/-</sup>* semble présenter la même accumulation sous-rétinienne que la dystrophie maculaire vitelliforme adulte humaine (DMVA). Dans le cas de variants pathogènes dans le gène *BEST1* chez l'humain, l'accumulation de matière est localisée entre la membrane de Bruch et l'EPR (92).

L'étude histologique et l'observation de l'ultrastructure par microscopie électronique démontre la présence de vacuoles au niveau de la matrice interphotoréceptrice chez les souris *Impg1<sup>-/-</sup>*, avec une présence anormale de mélanosomes à l'intérieur (**1.2**). De nombreuses gouttelettes lipidiques sont présentes à l'intérieur des cellules de l'EPR adjacentes à ces vacuoles. L'analyse histochimique de coupe de rétine d'animaux *Impg1<sup>-/-</sup>* révèle également la présence de fibres de collagènes.

Nous pensons que la dégénérescence des cellules de l'EPR, conduit à une perte de l'intégrité de leur membrane apicale, provoquant ainsi le relargage de composés cytoplasmiques de l'EPR au niveau de la MIP. La coloration au bleu alcian démontre une désorganisation structurale de la MIP, avec un désarrangement des segments externes des PR. Les membranes apicales et basales des cellules de l'épithélium rétinien ne semblent plus former de barrières intègres entre la MIP et la membrane de Bruch.

L'électrorétinogramme signe une diminution de la réponse électrophysiologique des photorécepteurs (approximativement 30%), avec une atteinte des deux types de cellules photoréceptrices. La mesure de l'épaisseur de la couche des photorécepteurs confirme leur dégénérescence.

Pour conclure sur le modèle murin *Impg1*<sup>-/-</sup>, ces souris représentent un bon modèle pour étudier les mécanismes cellulaires des dystrophies rétiniennes associées au gène *IMPG1*. L'absence de zones spécifiques de localisation des cônes et des bâtonnets ne permet pas une comparaison exacte avec les pathologies humaines. Cependant le phénotype est celui d'un processus neurodégénératif accumulatif ce qui pourrait nous laisser penser que le modèle murin s'apparente à la DMVA humaine. La multiplicité de ces amas de débris est multifocal pour la plus grande partie des souris, cependant de très rares souris ont développé une accumulation locale importante (à l'image de l'accumulation maculaire observée chez l'humain) (**Figure 26**).

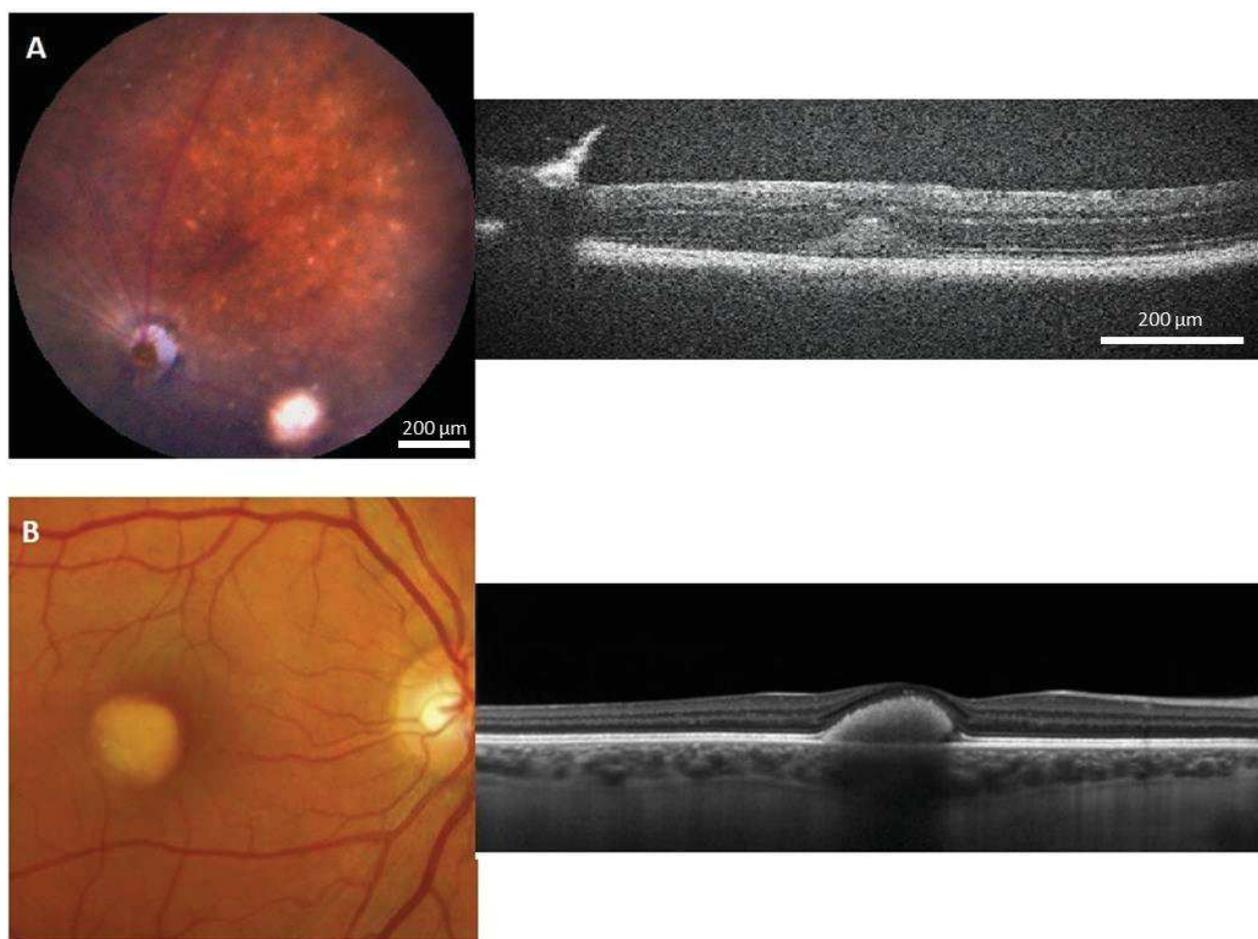


Figure 28: *Impg1*<sup>-/-</sup> versus phénotype DMVA associée à *IMPG1*:

(A) FO et OCT représentant un des phénotypes présent chez le modèle *Impg1*<sup>-/-</sup>

(B) FO et OCT d'un patient atteint de la dystrophie maculaire vitelliforme associée au gène *IMPG1*

Source (117)

Bien que cet amas de débris sous rétinien est semblable à l'humain, il ne fluoresce pas chez la souris au stade où nous l'avons observé, alors que le phénotype d'amas multifocaux présente des débris autofluorescents. L'autofluorescence rétinienne est un processus lié principalement à l'accumulation de lipofuscine. La lipofuscine est un mélange de produits (essentiellement lipidiques) de dégradation issu de la phagocytose des segments externes des photorécepteurs par l'EPR (2.2.3). La maladie de Stargardt est caractérisée par un défaut fonctionnel de la flippase ABCA4, assurant le transport du tout-trans rétinol et l'élimination du précurseur de l'A2E (3.2.1.2.), de la même façon que la DMVJ ou la DMVA, la maladie de Stargardt peut être classée dans les dystrophies maculaires à lipofuscinose.

Des immunofluorescences anti-Iba1 ont révélé une forte activation, ainsi qu'une infiltration de la microglie au niveau des couches de la rétine externe chez les animaux *Impg1*<sup>-/-</sup> (Figure supplemental data). Iba1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*), est une protéine cytoplasmique des cellules microgliales, dont l'expression est augmentée lors de dysfonctions neuronales.

Alors que j'étais en fin de rédaction de ce manuscrit de thèse, une équipe Américaine ainsi qu'une équipe Chinoise ont publié leur résultat sur leur modèle murin *ImpgX* dans la littérature scientifique.

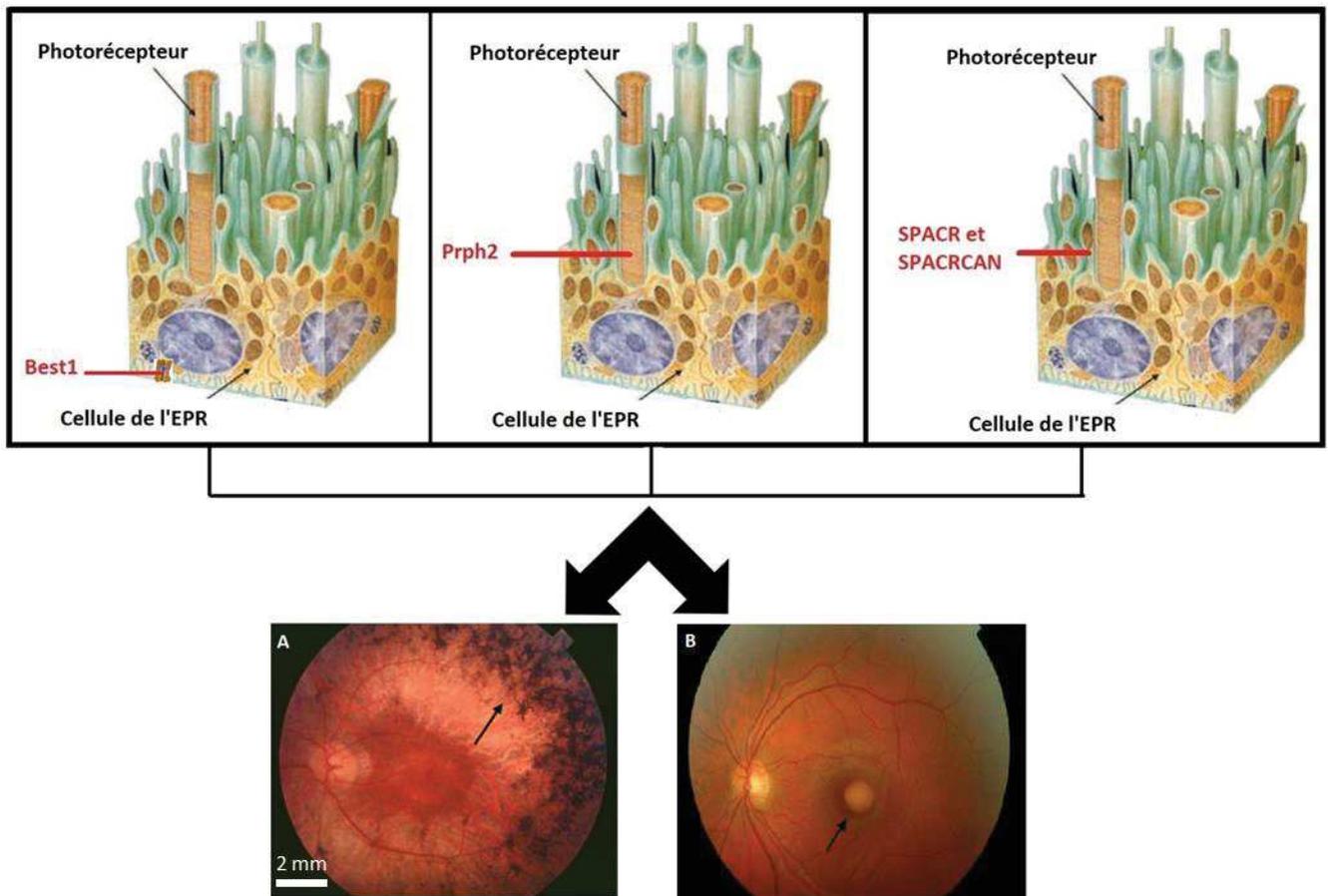
L'équipe Chinoise a développé deux modèles indépendants *Impg2*<sup>-/-</sup> par la technique de CRISPR/Cas9. Ils considèrent que leur modèle récapitule le phénotype de RP visible chez les patients. Une analyse fondoscopique révèle des dépôts pigmentaires, la réponse ERG est atténuée, une dégénérescence progressive des bâtonnets et des cônes est visible dès l'âge de 6 mois. Une analyse biochimique détecte une augmentation des marqueurs du stress, une augmentation de la microglie et de l'apoptose (148).

L'équipe Américaine a développé trois modèles murins : *Impg1*<sup>-/-</sup>, *Impg2*<sup>-/-</sup> et le double KO. Etonnamment aucun signe pathologique n'est retrouvé chez leur modèle *Impg1*<sup>-/-</sup>, et chez le double KO. La souris *Impg2*<sup>-/-</sup> présente des lésions vitelliformes visibles en OCT et en histochimie, une diminution de la réponse électrophysiologique à 8 mois et une mislocalisation de la protéine SPACR. Une accumulation anormale de SPACR est visible par immunofluorescence au niveau de

l'espace sous rétinien. Il conclue que le phénotype des souris *Impg2*<sup>-/-</sup> est dû à la mislocation, puis l'accumulation de la protéine SPACR au niveau des segments externes des PR, induisant ces lésions sous rétinienne, une activation microgliale pour finir par une dégénérescence des PR. Pour l'auteur, l'absence de la protéine SPACR dans les modèles *Impg1*<sup>-/-</sup> et chez le double KO suffirait à ne pas induire de dégénérescence chez la souris (131).

Les travaux de recherches de ces équipes sont complémentaires aux résultats de cette thèse. Le modèle mutin *Impg2*<sup>-/-</sup> présente des lésions sous rétinienne, une diminution électrophysiologique tardive et relativement faible. Ces résultats laissent suggérer que les protéines SPACR et SPACRCAN ne sont pas essentielles au bon développement des segments externes des PR, en revanche, elles participent à la survie et au maintien des PR dans le temps. Nous pensons que SPACR et SPACRCAN sont des protéines structurales de la MIP, par le biais d'interaction avec les glycoprotéines, les protéoglycanes et les énormes GAGs de la matrice. Elles jouent un rôle important dans le processus de vieillissement normal des PR.

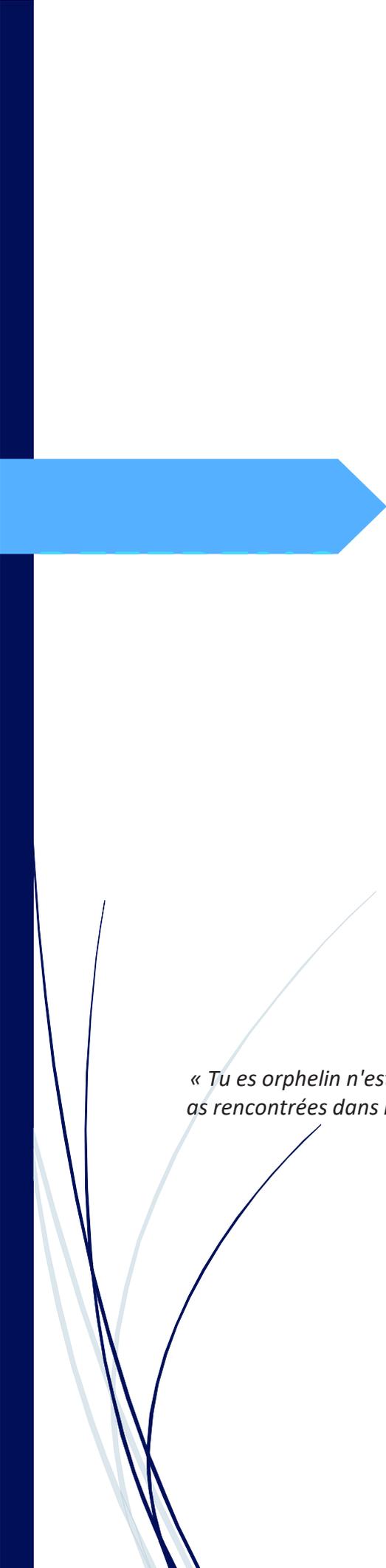
La suite de ce projet va se concentrer sur l'analyse transcriptomique du modèle *Impg1*<sup>-/-</sup>. Nous pensons que l'analyse du transcriptome va pouvoir nous guider vers le mécanisme qui conduit à l'accumulation de dépôts sous rétinien. L'analyse du transcriptome a été effectuée récemment, les résultats sont en cours d'expertise.



*Figure 29: 4 gènes à tester en cas de RP ou DMV*

(A) FO d'un individu atteint de RP. La flèche indiquant les dépôts pigmentaires  
 (B) FO d'un individu atteint de DMV. La flèche indiquant les dépôts vitelliformes  
 Source des FO (117,149)

Dans l'espèce humaine, le terme de maculopathies héréditaires s'applique aux dystrophies dont les signes cliniques se limitent à une atteinte centrale. Cependant d'un point de vue moléculaire, la dérégulation a lieu sur toute la rétine. La zone maculaire pourrait être atteinte de façon isolée, à cause d'une plus grande susceptibilité au processus de dégénérescence. La zone maculaire possède un rapport nombre de photorécepteur/cellules épithéliales plus élevé en comparaison à la rétine périphérique.



## REFERENCES

*« Tu es orphelin n'est-ce pas ? Tu crois que je sais quelque chose des difficultés que tu as rencontrées dans la vie, de ce que tu ressens, de ce que tu es, sous prétexte que j'ai lu Oliver Twist ? Est-ce que ça suffit à te résumer ? »*

*Will HUNTING*

1. Hermès, La Revue 2016/1 (n° 74) [Internet]. [cité 9 déc 2019]. Disponible sur: <https://www.cairn.info/revue-hermes-la-revue-2016-1.htm>
2. Small KW, DeLuca AP, Whitmore SS, Rosenberg T, Silva-Garcia R, Udar N, et al. North Carolina Macular Dystrophy is caused by dysregulation of the retinal transcription factor PRDM13. *Ophthalmology*. janv 2016;123(1):9-18.
3. Flaxman SR, Bourne RRA, Resnikoff S, Ackland P, Braithwaite T, Cicinelli MV, et al. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 1 déc 2017;5(12):e1221-34.
4. L'œil : structure, origine et propriétés physiques [Internet]. Planet-Vie. [cité 23 déc 2019]. Disponible sur: <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/animaux/l-oeil-structure-origine-et-proprietes-physiques>
5. Bharti K, Nguyen M-TT, Skuntz S, Bertuzzi S, Arnheiter H. The other pigment cell: specification and development of the pigmented epithelium of the vertebrate eye. *Pigment Cell Res Spons Eur Soc Pigment Cell Res Int Pigment Cell Soc*. oct 2006;19(5):380-94.
6. Perry VH, Gordon S. Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci*. juin 1988;11(6):273-7.
7. Rashid K, Akhtar-Schaefer I, Langmann T. Microglia in Retinal Degeneration. *Front Immunol* [Internet]. 20 août 2019 [cité 6 mars 2020];10. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6710350/>
8. National Library of Medicine - National Institutes of Health [Internet]. [cité 27 déc 2019]. Disponible sur: <https://www.nlm.nih.gov/>
9. Ding J-D, Salinas RY, Arshavsky VY. Discs of mammalian rod photoreceptors form through the membrane evagination mechanism. *J Cell Biol*. 9 nov 2015;211(3):495-502.
10. The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease | OMMBID | McGraw-Hill Medical [Internet]. [cité 27 déc 2019]. Disponible sur: <https://ommbid.mhmedical.com/book.aspx?bookid=2709>
11. Osterberg. Topography of the layer of rods and cones in the human retina. *Acta Ophthalmol*. 1935;
12. Tarau I-S, Berlin A, Curcio CA, Ach T. The Cytoskeleton of the Retinal Pigment Epithelium: from Normal Aging to Age-Related Macular Degeneration. *Int J Mol Sci*. janv 2019;20(14):3578.
13. Pepe IM. Recent advances in our understanding of rhodopsin and phototransduction. *Prog Retin Eye Res*. nov 2001;20(6):733-59.
14. Salesses C. Physiologie du signal visuel rétinien : de la phototransduction jusqu'au cycle visuel. /data/revues/01815512/v40i3/S0181551217300591/ [Internet]. 31 mars 2017 [cité 25 mai 2020]; Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/en/article/1109379>
15. Stryer L. Cyclic GMP cascade of vision. *Annu Rev Neurosci*. 1986;9:87-119.

16. Leskov IB, Klenchin VA, Handy JW, Whitlock GG, Govardovskii VI, Bownds MD, et al. The gain of rod phototransduction: reconciliation of biochemical and electrophysiological measurements. *Neuron*. sept 2000;27(3):525-37.
17. Rigaudière F, Le Gargasson J-F. III-2 : LA NEURORETINE : ASPECTS FONCTIONNELS [Internet]. <http://irevues.inist.fr/oeiletphysiologiedelavision>. 2013 [cité 14 janv 2020]. Disponible sur: <http://lodel.irevues.inist.fr/oeiletphysiologiedelavision/index.php?id=215#Pepe>
18. Burns ME. Deactivation mechanisms of rod phototransduction: the Cogan lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. mars 2010;51(3):1282-8.
19. Perusek L, Maeda T. Vitamin A derivatives as treatment options for retinal degenerative diseases. *Nutrients*. 12 juill 2013;5(7):2646-66.
20. Betts-Obregon BS, Gonzalez-Fernandez F, Tsin AT. Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein (IRBP) Promotes Retinol Uptake and Release by Rat Müller Cells (rMC-1) In Vitro: Implications for the Cone Visual Cycle. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. oct 2014;55(10):6265-71.
21. Batten ML, Imanishi Y, Maeda T, Tu DC, Moise AR, Bronson D, et al. Lecithin-retinol acyltransferase is essential for accumulation of all-trans-retinyl esters in the eye and in the liver. *J Biol Chem*. 12 mars 2004;279(11):10422-32.
22. Liu X, Liu L, Li H, Xu F, Jiang R, Sui R. RDH5 retinopathy (fundus albipunctatus) with preserved rod function. *Retina Phila Pa*. mars 2015;35(3):582-9.
23. Goldstein EB. Cone pigment regeneration in the isolated frog retina. *Vision Res*. oct 1970;10(10):1065-8.
24. Hood DC, Hock PA. Recovery of cone receptor activity in the frog's isolated retina. *Vision Res*. oct 1973;13(10):1943-51.
25. Wang J-S, Estevez ME, Cornwall MC, Kefalov VJ. Intra-retinal visual cycle required for rapid and complete cone dark adaptation. *Nat Neurosci*. mars 2009;12(3):295-302.
26. Morshedian A, Kaylor JJ, Ng SY, Tsan A, Frederiksen R, Xu T, et al. Light-Driven Regeneration of Cone Visual Pigments through a Mechanism Involving RGR Opsin in Müller Glial Cells. *Neuron*. 19 2019;102(6):1172-1183.e5.
27. Palczewski K, Kiser PD. Shedding new light on the generation of the visual chromophore. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18 2020;117(33):19629-38.
28. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*. 15 déc 2010;123(Pt 24):4195-200.
29. Al-Ubaidi MR, Naash MI, Conley SM. A perspective on the role of the extracellular matrix in progressive retinal degenerative disorders. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 17 déc 2013;54(13):8119-24.
30. Berman ER. Mucopolysaccharides (glycosaminoglycans) of the retina: identification, distribution and possible biological role. *Bibl Ophthalmol Suppl Ad Ophthalmol*. 1969;79:5-31.

31. Blanks JC, Johnson LV. Specific binding of peanut lectin to a class of retinal photoreceptor cells. A species comparison. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* mai 1984;25(5):546-57.
32. Sameshima M, Uehara F, Ohba N. Specialization of the interphotoreceptor matrices around cone and rod photoreceptor cells in the monkey retina, as revealed by lectin cytochemistry. *Exp Eye Res.* déc 1987;45(6):845-63.
33. Sugár D, Agócs R, Tatár E, Tóth G, Horváth P, Sulyok E, et al. The contribution of skin glycosaminoglycans to the regulation of sodium homeostasis in rats. *Physiol Res.* 14 2018;67(5):777-85.
34. Hollyfield JG, Rayborn ME, Tammi M, Tammi R. Hyaluronan in the Interphotoreceptor Matrix of the Eye: Species Differences in Content, Distribution, Ligand Binding and degradation. *Exp Eye Res.* 1 févr 1998;66(2):241-8.
35. LaVail MM, Pinto LH, Yasumura D. The interphotoreceptor matrix in rats with inherited retinal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* nov 1981;21(5):658-68.
36. Lazarus HS, Hageman GS. Xyloside-induced disruption of interphotoreceptor matrix proteoglycans results in retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1 févr 1992;33(2):364-76.
37. Hageman GS, Johnson LV. Chapter 9 Structure, composition and function of the retinal interphotoreceptor matrix. *Prog Retin Res.* 1 janv 1991;10:207-49.
38. Maeda N. Proteoglycans and neuronal migration in the cerebral cortex during development and disease. *Front Neurosci [Internet].* 2015 [cité 11 mars 2020];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2015.00098/full>
39. Abitbol MM. Homozygous Nonsense Mutations in RBP3 Gene Cause Early-Onset Retinal Dystrophies Associated With High Myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1 avr 2015;56(4):2366-2366.
40. Kolb H, Fernandez E, Nelson R, éditeurs. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet].* Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; 1995 [cité 14 mai 2020]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11530/>
41. Stamer WD, Bok D, Hu J, Jaffe GJ, McKay BS. Aquaporin-1 Channels in Human Retinal Pigment Epithelium: Role in Transepithelial Water Movement. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1 juin 2003;44(6):2803-8.
42. Tran TL, Hamann S, Heegaard S. Aquaporins in the Eye. In: Yang B, éditeur. *Aquaporins [Internet].* Dordrecht: Springer Netherlands; 2017 [cité 9 mars 2020]. p. 193-8. (*Advances in Experimental Medicine and Biology*). Disponible sur: [https://doi.org/10.1007/978-94-024-1057-0\\_12](https://doi.org/10.1007/978-94-024-1057-0_12)
43. Boulanger B, Guellati S, Hennequin D, Stehle M, Collectif. *Lumière en lumière: Lumière en lumière.* EDP Sciences; 2016. 169 p.
44. Fu Z, Löfqvist CA, Liegl R, Wang Z, Sun Y, Gong Y, et al. Photoreceptor glucose metabolism determines normal retinal vascular growth. *EMBO Mol Med.* janv 2018;10(1):76-90.

45. Punzo C, Xiong W, Cepko CL. Loss of daylight vision in retinal degeneration: are oxidative stress and metabolic dysregulation to blame? *J Biol Chem*. 13 janv 2012;287(3):1642-8.
46. Young RW. THE RENEWAL OF ROD AND CONE OUTER SEGMENTS IN THE RHESUS MONKEY. *J Cell Biol*. 1 mai 1971;49(2):303-18.
47. Jonnal RS, Besecker JR, Derby JC, Kocaoglu OP, Cense B, Gao W, et al. Imaging outer segment renewal in living human cone photoreceptors. *Opt Express*. 1 mars 2010;18(5):5257-70.
48. Neher JJ, Neniskyte U, Brown GC. Primary phagocytosis of neurons by inflamed microglia: potential roles in neurodegeneration. *Front Pharmacol*. 2012;3:27.
49. Ravichandran KS. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity*. 28 oct 2011;35(4):445-55.
50. Ruggiero L, Sarang Z, Szondy Z, Finnemann SC.  $\alpha\text{v}\beta 5$  integrin-dependent diurnal phagocytosis of shed photoreceptor outer segments by RPE cells is independent of the integrin coreceptor transglutaminase-2. *Adv Exp Med Biol*. 2012;723:731-7.
51. Nandrot EF, Kim Y, Brodie SE, Huang X, Sheppard D, Finnemann SC. Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking  $\alpha\text{v}\beta 5$  integrin. *J Exp Med*. 20 déc 2004;200(12):1539-45.
52. Duncan KG, Bailey KR, Kane JP, Schwartz DM. Human retinal pigment epithelial cells express scavenger receptors BI and BII. *Biochem Biophys Res Commun*. 12 avr 2002;292(4):1017-22.
53. Provost AC, Péquignot MO, Sainton KM, Gadin S, Sallé S, Marchant D, et al. Expression of SR-BI receptor and StAR protein in rat ocular tissues. *C R Biol*. sept 2003;326(9):841-51.
54. Nandrot EF, Anand M, Almeida D, Atabai K, Sheppard D, Finnemann SC. Essential role for MFG-E8 as ligand for  $\alpha\text{v}\beta 5$  integrin in diurnal retinal phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17 juill 2007;104(29):12005-10.
55. Burstyn-Cohen T, Lew ED, Través PG, Burrola PG, Hash JC, Lemke G. Genetic dissection of TAM receptor-ligand interaction in retinal pigment epithelial cell phagocytosis. *Neuron*. 20 déc 2012;76(6):1123-32.
56. Nandrot EF, Finnemann SC. Lack of  $\alpha\text{v}\beta 5$  integrin receptor or its ligand MFG-E8: distinct effects on retinal function. *Ophthalmic Res*. 2008;40(3-4):120-3.
57. Cremers FPM, Boon CJF, Bujakowska K, Zeitz C. Special Issue Introduction: Inherited Retinal Disease: Novel Candidate Genes, Genotype–Phenotype Correlations, and Inheritance Models. *Genes* [Internet]. 14 avr 2018 [cité 14 mai 2020];9(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5924557/>
58. Gowers WR. A Lecture on Myopathy and a Distal Form. *Br Med J*. 12 juill 1902;2(2167):89-92.
59. Anasagasti A, Irigoyen C, Barandika O, López de Munain A, Ruiz-Ederra J. Current mutation discovery approaches in Retinitis Pigmentosa. *Vision Res*. 15 déc 2012;75:117-29.

60. Verbakel SK, van Huet RAC, Boon CJF, den Hollander AI, Collin RWJ, Klaver CCW, et al. Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res.* 2018;66:157-86.
61. O'Neal TB, Luther EE. Retinitis Pigmentosa. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [cité 20 mars 2020]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519518/>
62. (12) (PDF) Unilateral retinitis pigmentosa: A proposal of genetic pathogenic mechanisms [Internet]. ResearchGate. [cité 17 juill 2020]. Disponible sur: [https://www.researchgate.net/publication/51851773\\_Unilateral\\_retinitis\\_pigmentosa\\_A\\_proposal\\_of\\_genetic\\_pathogenic\\_mechanisms](https://www.researchgate.net/publication/51851773_Unilateral_retinitis_pigmentosa_A_proposal_of_genetic_pathogenic_mechanisms)
63. Gao F-J, Zhang S-H, Chen J-Y, Xu G-Z, Wu J-H. Digenic heterozygous mutations in EYS/LRP5 in a Chinese family with retinitis pigmentosa. *Int J Ophthalmol.* 18 févr 2017;10(2):325-8.
64. Wang F, Wang H, Tuan H-F, Nguyen DH, Sun V, Keser V, et al. Next generation sequencing-based molecular diagnosis of retinitis pigmentosa: identification of a novel genotype-phenotype correlation and clinical refinements. *Hum Genet.* mars 2014;133(3):331-45.
65. Hamel CP. Cone rod dystrophies. *Orphanet J Rare Dis.* 1 févr 2007;2:7.
66. Birch DG, Peters AY, Locke KL, Spencer R, Megarity CF, Travis GH. Visual function in patients with cone-rod dystrophy (CRD) associated with mutations in the ABCA4(ABCR) gene. *Exp Eye Res.* déc 2001;73(6):877-86.
67. Boulanger-Scemama E, Mohand-Saïd S, El Shamieh S, Démontant V, Condroyer C, Antonio A, et al. Phenotype Analysis of Retinal Dystrophies in Light of the Underlying Genetic Defects: Application to Cone and Cone-Rod Dystrophies. *Int J Mol Sci.* 30 sept 2019;20(19).
68. Weleber RG, Francis PJ, Trzuppek KM, Beattie C. Leber Congenital Amaurosis. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al., éditeurs. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cité 23 mars 2020]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1298/>
69. Kumaran N, Pennesi ME, Yang P, Trzuppek KM, Schlechter C, Moore AT, et al. Leber Congenital Amaurosis / Early-Onset Severe Retinal Dystrophy Overview. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al., éditeurs. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cité 20 janv 2020]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531510/>
70. Fazzi E, Signorini SG, Scelsa B, Bova SM, Lanzi G. Leber's congenital amaurosis: an update. *Eur J Paediatr Neurol EJPN Off J Eur Paediatr Neurol Soc.* 2003;7(1):13-22.
71. RetNet: Summaries [Internet]. [cité 27 janv 2020]. Disponible sur: <https://sph.uth.edu/retnet/sum-dis.htm>
72. Hamel CP, Tsilou E, Pfeffer BA, Hooks JJ, Detrick B, Redmond TM. Molecular cloning and expression of RPE65, a novel retinal pigment epithelium-specific microsomal protein that is post-transcriptionally regulated in vitro. *J Biol Chem.* 25 juill 1993;268(21):15751-7.

73. Hamel CP, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Redmond TM. The gene for the retinal pigment epithelium-specific protein RPE65 is localized to human 1p31 and mouse 3. *Genomics*. avr 1994;20(3):509-12.
74. Michaelides M, Hunt D, Moore A. The genetics of inherited macular dystrophies. *J Med Genet*. sept 2003;40(9):641-50.
75. Delcourt C. [Epidemiology of age-related macular degeneration]. *Rev Prat*. 2017;67(1):88-91.
76. Vavvas DG, Small KW, Awh CC, Zanke BW, Tibshirani RJ, Kustra R. CFH and ARMS2 genetic risk determines progression to neovascular age-related macular degeneration after antioxidant and zinc supplementation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 2018;115(4):E696-704.
77. Zampatti S, Ricci F, Cusumano A, Marsella LT, Novelli G, Giardina E. Review of nutrient actions on age-related macular degeneration. *Nutr Res*. févr 2014;34(2):95-105.
78. Tanna P, Strauss RW, Fujinami K, Michaelides M. Stargardt disease: clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options. *Br J Ophthalmol*. janv 2017;101(1):25-30.
79. Franceschetti A, François J. [Fundus flavimaculatus]. *Arch Ophtalmol Rev Gen Ophtalmol*. sept 1965;25(6):505-30.
80. Valmaggia C, Niederberger H, Helbig H. Photodynamic therapy for choroidal neovascularization in fundus flavimaculatus. *Retina Phila Pa*. févr 2002;22(1):111-3.
81. Gass JD, Hummer J. Focal retinal pigment epithelial dysplasia associated with fundus flavimaculatus. *Retina Phila Pa*. 1999;19(4):297-301.
82. Lenis TL, Hu J, Ng SY, Jiang Z, Sarfare S, Lloyd MB, et al. Expression of ABCA4 in the retinal pigment epithelium and its implications for Stargardt macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20 2018;115(47):E11120-7.
83. Charbel Issa P, Barnard AR, Singh MS, Carter E, Jiang Z, Radu RA, et al. Fundus autofluorescence in the Abca4(-/-) mouse model of Stargardt disease--correlation with accumulation of A2E, retinal function, and histology. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 19 août 2013;54(8):5602-12.
84. Meunier I. Hérédo-dégénérescences rétinienne. Médecine Sciences Publications Lavoisier; 2014.
85. Sun D, Schur RM, Sears AE, Gao S-Q, Vaidya A, Sun W, et al. Non-viral Gene Therapy for Stargardt Disease with ECO/pRHO-ABCA4 Self-Assembled Nanoparticles. *Mol Ther*. 8 janv 2020;28(1):293-303.
86. Han Z, Conley SM, Naash MI. Gene therapy for Stargardt disease associated with ABCA4 gene. *Adv Exp Med Biol*. 2014;801:719-24.
87. Eagle RC, Lucier AC, Bernardino VB, Yanoff M. Retinal Pigment Epithelial Abnormalities in Fundus Flavimaculatus: A Light and Electron Microscopic Study. *Ophthalmology*. 1 déc 1980;87(12):1189-200.

88. Puech B. North Carolina Macular Dystrophy in 2012 (Dystrophie maculaire de la Caroline du Nord). 2012 [cité 3 févr 2020]; Disponible sur: [https://www.academia.edu/899237/North\\_Carolina\\_Macular\\_Dystrophy\\_in\\_2012\\_Dystrophie\\_maculaire\\_de\\_la\\_Caroline\\_du\\_Nord\\_](https://www.academia.edu/899237/North_Carolina_Macular_Dystrophy_in_2012_Dystrophie_maculaire_de_la_Caroline_du_Nord_)
89. Yang Z, Tong Z, Chorich LJ, Pearson E, Moore A, Hunt DM, et al. Clinical characterization and genetic mapping of North Carolina Macular Dystrophy. *Vision Res.* févr 2008;48(3):470-7.
90. Manes G, Joly W, Guignard T, Smirnov V, Berthemey S, Bocquet B, et al. A novel duplication of PRMD13 causes North Carolina macular dystrophy: overexpression of PRDM13 orthologue in drosophila eye reproduces the human phenotype. *Hum Mol Genet.* 15 2017;26(22):4367-74.
91. Meunier I. Maculopathies héréditaires vitelliformes : rationnel du criblage des gènes BEST1 et PRPH2 : identification de nouveaux gènes [Internet] [thesis]. Montpellier 1; 2013 [cité 3 févr 2020]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/2013MON1T003>
92. Tripathy K, Salini B. Best Disease. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [cité 3 févr 2020]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537290/>
93. Gao T, Tian C, Hu Q, Liu Z, Zou J, Huang L, et al. Clinical and Mutation Analysis of Patients with Best Vitelliform Macular Dystrophy or Autosomal Recessive Bestrophinopathy in Chinese Population. *BioMed Res Int* [Internet]. 18 oct 2018 [cité 26 mai 2020];2018. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6220750/>
94. Rigaudière F. V-2 : L'ELECTRO-OCULOGRAMME [Internet]. <http://irevues.inist.fr/oeiletophysiologiedelavision>. Rigaudière (Florence); 2013 [cité 26 mai 2020]. Disponible sur: <http://lodel.irevues.inist.fr/oeiletophysiologiedelavision/index.php?id=112>
95. Petrukhin K, Koisti MJ, Bakall B, Li W, Xie G, Marknell T, et al. Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy. *Nat Genet.* juill 1998;19(3):241-7.
96. Oh S-J, Lee CJ. Distribution and Function of the Bestrophin-1 (Best1) Channel in the Brain. *Exp Neurobiol.* juin 2017;26(3):113-21.
97. Lin Y, Li T, Ma C, Gao H, Chen C, Zhu Y, et al. Genetic variations in Bestrophin-1 and associated clinical findings in two Chinese patients with juvenile-onset and adult-onset best vitelliform macular dystrophy. *Mol Med Rep.* 1 janv 2018;17(1):225-33.
98. Reichhart N, Strauß O. Ion channels and transporters of the retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res.* 1 sept 2014;126:27-37.
99. Vaisey G, Long SB. An allosteric mechanism of inactivation in the calcium-dependent chloride channel BEST1. *J Gen Physiol.* 5 nov 2018;150(11):1484-97.
100. Johnson AA, Guziewicz KE, Lee CJ, Kalathur RC, Pulido JS, Marmorstein LY, et al. Bestrophin 1 and retinal disease. *Prog Retin Eye Res.* 2017;58:45-69.
101. Démant P, Iványi D, Nie R van. The Map Position of the rds Gene on the 17th Chromosome of the Mouse. *Tissue Antigens.* 1979;13(1):53-5.

102. Ding X-Q, Stricker HM, Naash MI. Role of the Second Intradiscal Loop of Peripherin/rds in Homo and Hetero Associations. *Biochemistry*. 29 mars 2005;44(12):4897-904.
103. Wells J, Wroblewski J, Keen J, Inglehearn C, Jubb C, Eckstein A, et al. Mutations in the human retinal degeneration slow (RDS) gene can cause either retinitis pigmentosa or macular dystrophy. *Nat Genet*. mars 1993;3(3):213-8.
104. Boon CJF, den Hollander AI, Hoyng CB, Cremers FPM, Klevering BJ, Keunen JEE. The spectrum of retinal dystrophies caused by mutations in the peripherin/RDS gene. *Prog Retin Eye Res*. 1 mars 2008;27(2):213-35.
105. Meunier I, Sénéchal A, Dhaenens C-M, Arndt C, Puech B, Defoort-Dhellemmes S, et al. Systematic Screening of BEST1 and PRPH2 in Juvenile and Adult Vitelliform Macular Dystrophies: A Rationale for Molecular Analysis. *Ophthalmology*. 1 juin 2011;118(6):1130-6.
106. Stuck MW, Conley SM, Naash MI. PRPH2/RDS and ROM-1: historical context, current views and future considerations. *Prog Retin Eye Res*. mai 2016;52:47-63.
107. Steinberg RH, Fisher SK, Anderson DH. Disc morphogenesis in vertebrate photoreceptors. *J Comp Neurol*. 1980;190(3):501-18.
108. Kevany BM, Tsybovsky Y, Campuzano IDG, Schnier PD, Engel A, Palczewski K. Structural and functional analysis of the native peripherin-ROM1 complex isolated from photoreceptor cells. *J Biol Chem*. 20 déc 2013;288(51):36272-84.
109. Bascom RA, Manara S, Collins L, Molday RS, Kalnins VI, McInnes RR. Cloning of the cDNA for a novel photoreceptor membrane protein (rom-1) identifies a disk rim protein family implicated in human retinopathies. *Neuron*. juin 1992;8(6):1171-84.
110. Moritz OL, Molday RS. Molecular cloning, membrane topology, and localization of bovine rom-1 in rod and cone photoreceptor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. févr 1996;37(2):352-62.
111. Wroblewski JJ, Wells JA, Eckstein A, Fitzke FW, Jubb C, Keen TJ, et al. Ocular findings associated with a 3 base pair deletion in the peripherin-RDS gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol*. nov 1994;78(11):831-6.
112. Apfelstedt-Sylla E, Theischen M, Rütger K, Wedemann H, Gal A, Zrenner E. Extensive intrafamilial and interfamilial phenotypic variation among patients with autosomal dominant retinal dystrophy and mutations in the human RDS/peripherin gene. *Br J Ophthalmol*. janv 1995;79(1):28-34.
113. Gill JS, Georgiou M, Kalitzeos A, Moore AT, Michaelides M. Progressive cone and cone-rod dystrophies: clinical features, molecular genetics and prospects for therapy. *Br J Ophthalmol*. mai 2019;103(5):711-20.
114. Boon CJF, Klevering BJ, Leroy BP, Hoyng CB, Keunen JEE, den Hollander AI. The spectrum of ocular phenotypes caused by mutations in the BEST1 gene. *Prog Retin Eye Res*. mai 2009;28(3):187-205.

115. Felbor U, Gehrig A, Sauer CG, Marquardt A, Köhler M, Schmid M, et al. Genomic organization and chromosomal localization of the interphotoreceptor matrix proteoglycan-1 (IMPG1) gene: a candidate for 6q-linked retinopathies. *Cytogenet Cell Genet.* 1998;81(1):12-7.
116. Manes G, Meunier I, Avila-Fernández A, Banfi S, Le Meur G, Zanlonghi X, et al. Mutations in IMPG1 cause vitelliform macular dystrophies. *Am J Hum Genet.* 5 sept 2013;93(3):571-8.
117. Meunier I, Manes G, Bocquet B, Marquette V, Baudoin C, Puech B, et al. Frequency and clinical pattern of vitelliform macular dystrophy caused by mutations of interphotoreceptor matrix IMPG1 and IMPG2 genes. *Ophthalmology.* déc 2014;121(12):2406-14.
118. Acharya S, Rayborn ME, Hollyfield JG. Characterization of SPACR, a sialoprotein associated with cones and rods present in the interphotoreceptor matrix of the human retina: immunological and lectin binding analysis. *Glycobiology.* oct 1998;8(10):997-1006.
119. Zhao J, Yoneda M, Takeyama M, Miyaishi O, Inoue Y, Kataoka T, et al. Characterization of a motif for specific binding to hyaluronan in chicken SPACR. *J Neurochem.* août 2008;106(3):1117-24.
120. Lee JW, Chen Q, Rayborn ME, Shadrach KG, Crabb JW, Rodriguez IR, et al. SPACR in the interphotoreceptor matrix of the mouse retina: molecular, biochemical and immunohistochemical characterization. *Exp Eye Res.* oct 2000;71(4):341-52.
121. Zhao J, Yoneda M, Takeyama M, Inoue Y, Kataoka T, Ohno-Jinno A, et al. Competitive binding of heparin with hyaluronan to a specific motif in SPACR. *J Neurochem.* nov 2008;107(3):823-31.
122. Acharya S, Foletta VC, Lee JW, Rayborn ME, Rodriguez IR, Young WS, et al. SPACRCAN, a novel human interphotoreceptor matrix hyaluronan-binding proteoglycan synthesized by photoreceptors and pinealocytes. *J Biol Chem.* 10 mars 2000;275(10):6945-55.
123. Kuehn MH, Hageman GS. Molecular characterization and genomic mapping of human IPM 200, a second member of a novel family of proteoglycans. *Mol Cell Biol Res Commun MCBRC.* août 1999;2(2):103-10.
124. Bandah-Rozenfeld D, Collin RWJ, Banin E, van den Born LI, Coene KLM, Siemiatkowska AM, et al. Mutations in IMPG2, encoding interphotoreceptor matrix proteoglycan 2, cause autosomal-recessive retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet.* 13 août 2010;87(2):199-208.
125. Brandl C, Schulz HL, Charbel Issa P, Birtel J, Bergholz R, Lange C, et al. Mutations in the Genes for Interphotoreceptor Matrix Proteoglycans, IMPG1 and IMPG2, in Patients with Vitelliform Macular Lesions. *Genes.* juill 2017;8(7):170.
126. Chen Q, Cai S, Shadrach KG, Prestwich GD, Hollyfield JG. Spacrcan binding to hyaluronan and other glycosaminoglycans. Molecular and biochemical studies. *J Biol Chem.* 28 mai 2004;279(22):23142-50.
127. Manes G, Meunier I, Avila-Fernández A, Banfi S, Le Meur G, Zanlonghi X, et al. Mutations in IMPG1 cause vitelliform macular dystrophies. *Am J Hum Genet.* 5 sept 2013;93(3):571-8.

128. van Lith-Verhoeven JJC, Hoyng CB, van den Helm B, Deutman AF, Brink HMA, Kemperman MH, et al. The benign concentric annular macular dystrophy locus maps to 6p12.3-q16. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* janv 2004;45(1):30-5.
129. Bandah-Rozenfeld D, Collin RWJ, Banin E, van den Born LI, Coene KLM, Siemiatkowska AM, et al. Mutations in IMPG2, encoding interphotoreceptor matrix proteoglycan 2, cause autosomal-recessive retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet.* 13 août 2010;87(2):199-208.
130. Acharya S, Rodriguez IR, Moreira EF, Midura RJ, Misono K, Todres E, et al. SPACR, a novel interphotoreceptor matrix glycoprotein in human retina that interacts with hyaluronan. *J Biol Chem.* 20 nov 1998;273(47):31599-606.
131. Salido EM, Ramamurthy V. Proteoglycan IMPG2 shapes the interphotoreceptor matrix and modulates vision. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 6 avr 2020;
132. Delori FC, Dorey CK, Staurenghi G, Arend O, Goger DG, Weiter JJ. In vivo fluorescence of the ocular fundus exhibits retinal pigment epithelium lipofuscin characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* mars 1995;36(3):718-29.
133. Porrello K, LaVail MM. Histochemical demonstration of spatial heterogeneity in the interphotoreceptor matrix of the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* nov 1986;27(11):1577-86.
134. Bhutto I, Luty G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Mol Aspects Med.* août 2012;33(4):295-317.
135. Bitner H, Schatz P, Mizrahi-Meissonnier L, Sharon D, Rosenberg T. Frequency, genotype, and clinical spectrum of best vitelliform macular dystrophy: data from a national center in Denmark. *Am J Ophthalmol.* août 2012;154(2):403-412.e4.
136. Burgess R, Millar ID, Leroy BP, Urquhart JE, Fearon IM, De Baere E, et al. Biallelic mutation of BEST1 causes a distinct retinopathy in humans. *Am J Hum Genet.* janv 2008;82(1):19-31.
137. Kuehn MH, Wietzecki DT, Hageman GS. Molecular characterization of the murine orthologue of the human retinal proteoglycan IPM 150. *Mol Vis.* 24 août 2000;6:148-56.
138. Kuehn MH, Hageman GS. Expression and characterization of the IPM 150 gene (IMPG1) product, a novel human photoreceptor cell-associated chondroitin-sulfate proteoglycan. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* oct 1999;18(5):509-18.
139. Hollyfield JG, Rayborn ME, Nishiyama K, Shadrach KG, Miyagi M, Crabb JW, et al. Interphotoreceptor matrix in the fovea and peripheral retina of the primate *Macaca mulatta*: distribution and glycoforms of SPACR and SPACRCAN. *Exp Eye Res.* janv 2001;72(1):49-61.
140. Tien L, Rayborn ME, Hollyfield JG. Characterization of the interphotoreceptor matrix surrounding rod photoreceptors in the human retina. *Exp Eye Res.* août 1992;55(2):297-306.

141. Zako M, Iwaki M, Yoneda M, Miyaishi O, Zhao J, Suzuki Y, et al. Molecular cloning and characterization of chick sialoprotein associated with cones and rods, a developmentally regulated glycoprotein of interphotoreceptor matrix. *J Biol Chem*. 12 juill 2002;277(28):25592-600.
142. Inoue Y, Yoneda M, Zhao J, Miyaishi O, Ohno-Jinno A, Kataoka T, et al. Molecular cloning and characterization of chick SPACRCAN. *J Biol Chem*. 14 avr 2006;281(15):10381-8.
143. Furutani-Seiki M, Wittbrodt J. Medaka and zebrafish, an evolutionary twin study. *Mech Dev*. 1 juill 2004;121(7):629-37.
144. Lust K, Wittbrodt J. Activating the regenerative potential of Müller glia cells in a regeneration-deficient retina. *eLife*. 29 janv 2018;7:e32319.
145. Angueyra JM, Kindt KS. Leveraging Zebrafish to Study Retinal Degenerations. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2018 [cité 10 juill 2020];6. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2018.00110/full>
146. Wang Y, Cai S, Cui J, Chen Y, Tang X, Li Y. Correlation between photoreceptor injury-regeneration and behavior in a zebrafish model. *Neural Regen Res*. mai 2017;12(5):795-803.
147. Volland S, Esteve-Rudd J, Hoo J, Yee C, Williams DS. A comparison of some organizational characteristics of the mouse central retina and the human macula. *PLoS One*. 2015;10(4):e0125631.
148. Xu H, Qu C, Gan L, Sun K, Tan J, Liu X, et al. Deletion of the *Impg2* gene causes the degeneration of rod and cone cells in mice. *Hum Mol Genet*. 27 juin 2020;29(10):1624-34.
149. Hamel CP. Gene discovery and prevalence in inherited retinal dystrophies. *C R Biol*. mars 2014;337(3):160-6.

## RÉSUMÉ

Les dystrophies rétiniennes héréditaires forment un groupe génétiquement et cliniquement hétérogène. Ce sont des maladies génétiques mendéliennes évolutives qui entraînent la dysfonction puis la mort cellulaire, notamment des photorécepteurs et des cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine (EPR). La mort de ces cellules s'accompagne de dépôts pigmentaires intra-rétiniens en général localisés dans la périphérie rétinienne, constituant ainsi le sous-groupe majoritaire des rétinites pigmentaires (RP). Plus rarement, des lésions d'aspect varié affectent la macula, région centrale de la rétine, formant le sous-groupe des dystrophies maculaires (DM). Ces dégénérescences conduisent progressivement à une cécité plus ou moins complète sans possibilité thérapeutique actuellement. Malgré l'identification de plus de 90 gènes associés à la RP, les tests génétiques classiques (Sanger, panel) ne permettent pas de déterminer le diagnostic moléculaire chez environ 1/3 des patients. L'identification des nouveaux gènes est d'un intérêt majeur pour la compréhension de la maladie, pour établir des corrélations phénotypes/génotypes, pour l'amélioration du conseil génétique, et enfin pour définir des voies thérapeutiques.

Dans cet objectif, l'étude génétique d'une grande famille atteinte de RP autosomique dominante sans diagnostic moléculaire, a été réalisée par séquençage de l'exome. Cette approche a permis d'identifier un variant d'épissage pathogène dans *IMPG1*, gène jamais décrit dans la RP. Cependant, *IMPG1* avait précédemment été associé à la DM vitelliforme (DMV). Une analyse génétique complémentaire sur des cohortes multicentriques de patients atteints de RP ou DMV, a permis d'identifier six variants pathogènes additionnels (dont cinq nouveaux) dans 10 autres familles avec des formes dominantes ou récessives de RP ou DMV.

Ensuite, des analyses fonctionnelles *in vivo* ont été réalisées chez le poisson medaka puis chez la souris par invalidation du gène orthologue du gène humain *IMPG1*. L'étude sur le poisson, par utilisation de morpholino, a montré que le produit du gène *Impg1* joue un rôle important à la fois dans le développement précoce et dans le maintien des fonctions biologiques de la rétine. La longueur des segments externes des photorécepteurs (bâtonnet et cône), était diminuée de 20% et 90% respectivement. Cependant l'invalidation de l'expression de *Impg1* est transitoire chez le poisson, et les analyses phénotypiques très limitées.

La réalisation de la souris *Impg1*<sup>-/-</sup> a permis de réaliser des études fonctionnelles visuelles plus complètes et d'examiner leur évolution sur une longue période. Les souris KO présentent, à partir de 9 mois d'âge, une accumulation anormale de dépôts autofluorescents visible au fondoscope et en tomographie en cohérence optique (OCT). Elles ont un électrorétinogramme (ERG) diminué d'environ 20%. La microscopie électronique des rétines de souris permet de mettre en évidence la localisation précise des anomalies au niveau de la matrice interphotoréceptrice. Le modèle animal murin semble reproduire le phénotype DMV alors que le modèle poisson montre des similitudes avec la RP.

En conclusion, ce travail de thèse permet d'étendre le spectre clinique des désordres associés aux mutations du gène *IMPG1*. Il faut donc ajouter à la DMV, deux nouveaux diagnostics : la RP autosomique dominante et récessive. Les modèles animaux développés permettent de mieux comprendre les mécanismes cellulaires affectés par invalidation du gène *IMPG1*. Cependant, le mécanisme expliquant l'atteinte maculaire ou périphérique chez l'humain, ainsi que les différents modes de transmission et de variations de pénétrance ne sont pas encore élucidés.

## ABSTRACT

Inherited retinal disorders are a clinically and genetically heterogeneous group. They are progressive Mendelian genetic diseases that cause dysfunction then cell death, including photoreceptors and retinal pigment epithelium cells (RPE). Cells death is accompanied by intra-retinal pigment deposits generally located in the retinal periphery, thus constituting the majority subgroup of *retinitis pigmentosa* (RP). More rarely, lesions of various appearance affecting the macula, central region of the retina, forming the subgroup of macular dystrophies (MD). These neurodegeneration gradually lead to more or less complete blindness, without therapeutic. Despite the identification of over 90 genes associated with RP, conventional genetic testing (Sanger, panel) fails to detect a molecular diagnosis in about one third of RP patients. The identification of new genes is of major interest for understanding the disease, for establishing phenotype / genotype correlations, for improving genetic counseling, and finally for defining therapeutic pathways.

For this purpose, the genetic study of a large family with autosomal dominant RP without molecular diagnosis was carried out by exome sequencing. NGS approach made it possible to identify a pathogenic splicing variant in *IMPG1*, a gene never described in RP. *IMPG1* had been previously associated with vitelliform macular dystrophy (VMD). A complementary genetic analysis on multicentric cohorts of patients with RP or DMV, allowed to identify six additional pathogenic variants (including five new variants), in 10 other families with dominant or recessive forms of RP or DMV.

We followed our study performing *in vivo* functional study in medaka fish, then in mice by invalidating the orthologous gene of the human *IMPG1*. The fish study, the use of morpholino, showed that the *Impg1* gene product plays an important role, in the early development and maintenance of the biological functions of the retina. The length of the outer segments of rod and cone photoreceptors were reduced by 20% and 90% respectively. However, the invalidation of *Impg1* expression is transient in fish and very limited phenotype analyzes.

*Impg1*<sup>-/-</sup> mice helped to perform more complete visual functional studies and to examine their evolution over a long period. *Impg1*<sup>-/-</sup> mice show an abnormal accumulation of autofluorescent deposits visible with fundoscope and optical coherence tomography (OCT) from 9 months of age. Electroretinogram (ERG) is reduced by about 20%. The electron microscopy of mice retinas makes it possible to highlight the precise localization of the anomalies, within interphotoreceptor matrix. The mouse animal model seems to reproduce DMV phenotype while the fish model shows similarities with RP.

To summarize, this thesis work allows us to extend the clinical spectrum of disorders associated with mutations in *IMPG1* gene. Two new diagnoses must therefore be added to VMD: autosomal dominant and recessive RP. The animal models developed allow a better understanding of the cellular mechanisms affected by invalidation of the *IMPG1* gene. However, the mechanism explaining macular or peripheral involvement in humans, as well as the different modes of transmission and penetrance variations have not yet been elucidated.