



HAL
open science

Contraintes exercées sur la direction des flux métaboliques dans la rétine : l'interaction entre les bâtonnets et les cônes

Géraldine Millet-Puel

► **To cite this version:**

Géraldine Millet-Puel. Contraintes exercées sur la direction des flux métaboliques dans la rétine : l'interaction entre les bâtonnets et les cônes. Génétique. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS449 . tel-03722904

HAL Id: tel-03722904

<https://theses.hal.science/tel-03722904>

Submitted on 13 Jul 2022

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.

Sorbonne Université

École doctorale

CERVEAU-COGNITION-COMPORTEMENT

INSTITUT DE LA VISION

THÈSE

DE DOCTORAT DE NEUROSCIENCE ET DE SCIENCES COGNITIVES

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE SORBONNE UNIVERSITÉ

Mme Géraldine Millet-Puel

**Contraintes exercées sur la direction des flux
métaboliques dans la rétine : l'interaction entre les
bâtonnets et les cônes**

Dirigée par Thierry LÉVEILLARD

SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE **23 Décembre 2021** DEVANT LES MEMBRES DU JURY

COMPOSÉ DE:

Pr. Chahrazade EL AMRI

Présidente, Professeur à Sorbonne Université, Paris

Dr. Yvon TROTTIER

Rapporteur, Institut de génétique, biologie moléculaire et cellulaire, Illkirch

Dr. Isabelle PERRAULT

Rapporteur, Institut Imagine, Université Paris Descartes, Paris

Pr. Christine PETIT

Examineur, Institut de l'audition, Paris

Dr. Thierry LÉVEILLARD

Directeur de thèse Directeur de recherche à l'Institut de la Vision, Paris

AVERTISSEMENT

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction partielle ou totale de cette œuvre doit faire l'objet d'une autorisation de l'auteur (Loi n° 92-597 du 01/07/1992, parue au Journal Officiel du 02/07/1992).

Der Stoffwechsel der Netzhaut besitzt nach diesen Feststellungen eine auffallende

Otto Heinrich Warburg, 1924

(Selon ces résultats, le métabolisme de la rétine est étonnant)

A mes parents...

REMERCIEMENTS

Je tenais à remercier Professeur José-Alain Sahel pour m'avoir accueilli dans le laboratoire il y a de cela presque 18 ans. A cette époque le laboratoire s'appelait encore le laboratoire de physiopathologie cellulaire et moléculaire de la rétine et était situé au sein de l'hôpital Saint-Antoine.

Je voulais également remercier Thierry Léveillard, mon directeur de thèse pour m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse. Je remercie Thierry, qui en 2004, m'a donné la chance d'intégrer l'équipe en tant qu'Assistante Ingénieur afin de participer au criblage haut débit de molécules susceptibles d'avoir un effet de survie sur les photorécepteurs à cônes. En 2010, j'ai concouru et obtenu un poste d'Assistante Ingénieur de Sorbonne Université pour travailler à l'Institut de la Vision avec Thierry. Au fil des années il a su me faire confiance et m'a soutenu dans mon désir d'évoluer et d'entreprendre le cursus du Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE). J'ai obtenu mon diplôme en 2011 avec mention très bien, sous sa direction. En 2016, j'ai obtenu une promotion d'Ingénieur d'Etude de Sorbonne Université pour continuer à travailler avec Thierry. Suite à cette promotion, Thierry m'a proposé de commencer une thèse sous sa direction et c'est avec beaucoup de doutes et d'appréhension que j'ai accepté. Je le remercie pour la confiance qu'il a placée en moi, pour tous les enseignements que j'ai pu acquérir durant toutes ces années à ces côtés, pour sa patience, son aide et le temps qu'il a consacré à la relecture de ce mémoire.

Je tenais à remercier Mme Isabelle Perrault et Mr Yvon Trottier, mes rapporteurs de thèse pour tout le temps qu'ils ont accordé à la lecture et la correction de ce mémoire.

Merci aux autres membres du jury, Mme Chahrazade El Amri et Mme Christine Petit, d'avoir accepté d'être présente le jour de la soutenance pour évaluer mon travail.

Bien sûr je ne peux pas oublier de remercier Alexandra Bouaziz dit « La Bouaziz » ma fidèle copilote, comme elle aimait le dire, mais aussi ma fidèle amie, pour la mise au monde de ce beau projet. Alex, c'est avec un grand honneur que j'ai pris soin de ton bébé « Uvaria » et « PFKFB2 ».

Je tenais à remercier également Emmanuelle Clérin pour son implication dans ce projet, son investissement dans le laboratoire, sa joie et sa bienveillance. Merci Emma d'être à mes côtés depuis toutes ces années !

Merci aux membres de l'équipe S7 pour leurs implications dans cette aventure et leur soutien. Un grand merci à Alexandra Saint-Charles pour tout le travail qu'elle a fait pour établir les différentes lignées de souris et toutes les galères qu'elle a rencontré, Marie Cordonnier

pour sa gentillesse, sa douceur et toute son aide précieuse avec Geralexin, Quénot César pour son aide précieuse avec les ERG et toutes ses discussions posées et constructives en salle d'ERG, Laurence Klipfel pour l'isolation des mitochondries et toute son aide scientifique, Ren Xiaoyuan pour les tests des sera de lapin, John Han pour les immuno du récepteur de l'Insuline. Un grand merci à Frédéric Blond pour son expertise en bio-informatique, son aide, ses viennoiseries du jeudi (et non Fred, je n'ai pas oublié ces petites attentions !!!) mais surtout pour sa gentillesse. Et enfin merci à Mariangela Corsi, pour son aide avec la révélation β -Gal et nos pauses café !

Merci à Amandine, Nassima dit « Boubou », Juliette dit « Juju » et Marine, mes amies proches, pour leur soutien durant toutes ces années, leur amour et tous les fous rires que nous avons pu avoir.

Je voulais également remercier particulièrement Miguel Miranda De Sousa Dias, mon ancien compagnon mais néanmoins toujours mon fidèle ami, pour son soutien depuis toutes ces années. Un grand MERCI Miguel d'avoir cru en moi et de m'avoir poussé à faire cette thèse. Sans toi je pense que je n'aurais jamais eu le courage et la confiance en moi pour me lancer dans cette aventure. Tu as su me donner cette confiance qui me manquait !

Mes enfants, Eléa et Roman, chez qui je puise toute mon énergie et ma force grâce à leur amour ! Certes, ils ne m'ont pas rendu la tâche facile car être maman en faisant une thèse est un vrai challenge mais ça valait le coup !! J'espère qu'ils sont fiers de leur maman.

Mes loulous, je vous aime !

Enfin, je veux remercier mes parents, sans qui je ne serais pas la personne que je suis aujourd'hui.

Merci maman et papa pour les valeurs que vous nous avez inculqué durant toute notre enfance.

Merci de nous avoir répété que le travail paye toujours, la preuve en est aujourd'hui !

Merci pour tous les sacrifices financiers que vous avez fait pour qu'Olivier, Alain et moi fassions des études et nous ayons « une bonne situation » (dixit maman).

Merci d'avoir toujours été à mes côtés durant les moments difficiles de ma vie, mais également lors des moments plus joyeux... Merci d'être encore là aujourd'hui.

J'aurais tant aimé que vous assistiez à ce moment si spécial de ma vie et voir votre fierté dans vos yeux, mais je sais que de notre Aveyron vous penserez très fort à moi !

On ne se le dit pas souvent, voir jamais, mais aujourd'hui je souhaitais vraiment vous dire que Je vous aime...

MERCI POUR TOUT !

TABLES DES MATIERES

LISTE DES ABBREVIATIONS.....	25
INTRODUCTION.....	39
1. La rétine.....	39
2. Les photorécepteurs.....	45
2.2. Les cônes	47
3. Le renouvellement des segments externes des photorécepteurs.....	53
4. La Choroïde.....	55
5. Le métabolisme des photorécepteurs.....	61
6.1. Première observation, l'effet Warburg	61
6.2. Le transport du glucose	67
6.3. La glycolyse	69
6.4. Le rôle des acides gras	73
6.5. La synthèse des phospholipides	79
6.6. L'aiguillage du pyruvate	83
6.7. Le cycle de Krebs	87
6.8. La chaîne respiratoire mitochondriale	89
6.9. La voie des pentoses phosphates	95
6.10. La voie des ribonucléotides	99
6.11. La réversion de l'oxydation par les systèmes des thiorédoxines et des glutarédoxines	103
6.12.	109
La voie de biosynthèse des hexosamines	109
6.13. Synthèse de la serine	113
7. Les dégénérescences rétiniennes héréditaires.....	117
8. Les thérapies des dégénérescences rétiniennes héréditaires.....	129
9. Rod-derived Cone Viability Factor.....	139
10. La thiorédoxine RdCVFL.....	149

RESULTATS	165
1. Etude d'expression du gène <i>Pfkfb2</i> après surexpression de RdCVF	165
2. Etude de l'expression du gène <i>Pfkfb2</i> en réponse au glucose	165
3. Etude de l'expression du gène <i>Pfkfb2</i> en présence de Geralexin	169
4. Etude de l'effet d'un siRNA <i>Pfkfb2</i> sur la survie des cônes en présence de Geralexin	173
5. La lignée murine [<i>Cone-Cre</i> ^{+/+} ; <i>Pfkfb2</i> ^{loxP/loxP}]	173
6. Etude phénotypique de la lignée [<i>Cone-Cre</i> ^{+/+} ; <i>Pfkfb2</i> ^{LoxP/LoxP}]	177
7. Expression tissulaire de <i>Pfkfb2</i> chez la souris sauvage C57Bl /6J	181
8. Expression du gène <i>Pfkfb2</i> dans la rétine de souris <i>rd1</i>	181
9. Expression cellulaire de PFKFB2 dans la rétine de souris C57bl/6J	185
10. Etude tissulaire de l'expression du gène <i>Pfkfb2</i>	185
10.1. Etude de l'expression par hybridation <i>in situ</i>	185
10.2. Etude de l'expression par RNAseq	191
12. Etude de l'expression de la protéine PFKFB2 chez la souris <i>rd1</i>	197
13. Pourquoi le gène <i>Pfkfb2</i> est exprimé par les bâtonnets et les cônes, mais que la protéine ne soit exprimée que par les cônes ?	199
13.1. Etude <i>in silico</i> des variants de transcription de <i>Pfkfb2</i>	201
13.2 Etude expérimentale de l'expression des différents variants de transcription de <i>Pfkfb2</i>	203
14. Etudes des PFKFB2 issus des différents variants de transcription de <i>Pfkfb2</i> dans la rétine	209
15. Etude de la phosphorylation de PFKFB2 dans la rétine de souris	215
16. Etude de l'implication de l'insuline dans la phosphorylation de PFKFB2	219
16.1. Etude de l'effet de l'insuline et du domaine kinase de PFKFB2 sur la survie des photorécepteurs à cônes	219
16.2. Etude de l'implication de la voie PI3K/AKT sur l'expression et la phosphorylation de PFKFB2	223
16.3. Etude de l'expression du récepteur de l'insuline dans l'épithélium pigmentaire rétinien	229
17. Etude métabolomique du métabolisme du glucose chez les cônes en présence de Geralexin	231
18. Etude du promoteur de <i>Pfkfb2</i>	233
18.1. Etude de l'activité du promoteur de PFKFB2 en fonction de la concentration en glucose	

18.2.	Etude de l'activité du promoteur de <i>PFKFB2</i> muté dans la région <i>Mammalian conserved Region 2</i> , en fonction de la concentration en glucose	237
18.3.	Etude de l'activité du promoteur de <i>PFKFB2</i> muté dans la région <i>Enhance Box</i> , en fonction de la concentration en glucose	241
19.	Le facteur de transcription MONDOA.....	245
19.1.	Etude de différents anticorps commerciaux pour identifier la forme poulet de MONDOA	247
19.2.	Etude de différents anticorps commerciaux par surexpression de la protéine MONDOA poulet par transfection transitoire d'un plasmide pcDNA3-chicken MONDOA	249
19.3.	Etude de différents sérums immuns de lapin immunisés avec les peptides immunogènes de MONDOA de poulet	249
19.4.	Etude de la translocation de MONDOA de la mitochondrie vers le noyau.	257
20.	Etude mathématique de l'implication de PFKFB2 dans la direction du flux du glucose entre les photorécepteurs à bâtonnets et à cônes	257
	DISCUSSION.....	269
1.	TPI.....	269
2.	Renouvellement des segments externes	275
3.	Geralexin	277
	MATERIELS ET METHODES	285
1.	QPCR pour analyser l'expression de gènes chez la souris	285
2.	QPCR pour analyser l'expression normalisée de gènes dans les cônes d'embryons de poulet	285
3.	Culture de cônes d'embryons de poulet	287
4.	Electroporation de globes oculaires d'embryons de poulet afin de surexprimer un gène	289
5.	Etude par Western Blot de l'expression de PFKFB2 dans différents tissus	291
6.	Préparation du matériel biologique pour Immunohistochimie et hybridation <i>in situ</i>	293
7.	Immunohistochimie PFKFB2.....	293
8.	Electrorétinogramme	295
9.	Test de viabilité des cultures de cônes d'embryons de poulet.....	297
10.	Construction de sondes pour l'hybridation <i>in Situ</i> (ISH)	299
11.	Hybridation <i>In Situ</i>	301
12.	Marquage β -Galactosidase	303
14.	PC	

R	305
15.	Extraction des métabolites secondaires de cônes d'embryons de poulet pour analyse métabolomique. 307
16.	Electrophorèse 2 Dimensions 307
17.	Mesure de l'activité de promoteurs 309
	BIBLIOGRAPHIE 315
	TABLES 349
	Lapin # 00999 (6515-2 et 6515-4)..... 351
	Lapin # 01004..... 351
	(6515-2 et 6515-4)..... 351
	Lapin # 01007..... 351
	(6515-2 et 6515-4)..... 351
	Lapin # 01007..... 351
	(6515-2 et 6515-4)..... 351
	611222 351
	NB500-700 351
	TGCCATGCCTCAGTCTAATGTT..... 353
	AGTGGCAAGTTTTTCCTGAGCA 353
	ANNEXES..... 355
	ANNEXES 356

LISTE DES ABBREVIATIONS

2D	2 dimensions
6PGD	6-phosphogluconate déshydrogénase
AAV	<i>Adeno-Associated Virus</i>
Acétyl-CoA	Acétyl coenzyme A
ADNc	ADN complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
AEM	Agence européenne des médicaments
AGPI	Acide gras poly-insaturés
AGPI-TLC	Acide gras poly-insaturés à très longue chaîne
AMP	Adénosine monophosphate
ANOVA	<i>Analysis Of Variance</i>
APC/C	Anaphase complexe/cyclosome
ATP	Adénosine triphosphate
bHLHZip	<i>Basic helix-loop-helix and leucine zipper</i>
BSG	Basigin
CAS	<i>Chemical abstracts service</i>
CFH	Facteur H du complément
CMP	Cytosine monophosphate
CMV	Cytomégalovirus
CNG	Cyclic nucleotide-gated
CNTF	<i>Ciliary neurotrophic factor</i>
CNV	Néovascularisation choroïdienne
CO2	Dioxyde de carbone
CTE	Chaîne de transport d'électrons
CTP	Cytosine triphosphate
DHA	Acide docosahexaénoïque
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
DMLA	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
DT	Domaine transmembranaire
E-box	<i>Enhancer Box</i>

ED	<i>Embryonic day</i>
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
EI	Evénements indésirables
EIP	Espace Inter photorécepteurs
EPR	Epithélium pigmentaire rétinien
ERA	Espèces réactives de l'Azote
ERG	Electrorétinogramme
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
F1,6BP	Fructose-1,6-biphosphate
F26BP	Fructose-2,6-biphosphate
F6P	Fructose-6-phosphate
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FRT	<i>Flippase recognition target</i>
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GAPDHSNO	GAPDH S-nitrosylée
GAP	Glycéraldyde-3-phosphate
GFAT	Glutamine-fructose-6-phosphate aminotransférase
GlcN-6P	Glucosamine-6-phosphate
GLRX	Glutarédoxines
GMP	Guanosine monophosphate
GNA1	GlcN-6P-N-acétyltransférase
GPI	Glucose phosphate isomérase
GSH	Glutathion sous forme réduite
GSM	<i>Glucose sensing module</i>
GSR	Glutathion réductase
GTP	Guanosine triphosphate
GWAS	<i>Genome-wide association study</i>
G3P	Glycérol-3-phosphate
G3PDH	Glycérol-3-phosphate déshydrogénase
G6P	Glucose-6-phosphate
G6PDH	Glycérol-6-phosphate déshydrogénase
HBP	Voie de biosynthèse de l'hexosamine
HDAC4	Histone désacétylase 4
HNE	4-Hydroxy-2-nonéнал
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase

HRP	Hydrogène peroxide oxidoreductase
IAMDGC	Consortium de génomique de la DMLA
Ig	Immunoglobuline
IMP	Inosinate monophosphate
INPI	Institut National de la Propriété Industrielle
INSR	Récepteur de l'insuline
IRBP	<i>Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein</i>
IRS1	Substrat du récepteur de l'insuline humaine 1
kDa	kilodalton
KLF15	<i>Krüppel-like factor 15</i>
LCA	Amaurose congénitale de Leber
LDH	Lactate déshydrogénase
LDHA	Lactate déshydrogénase isoforme A
LoxP	<i>Locus of X-over P1</i>
LRAT	Lécithine-rétinol acyltransférase
MAPK	<i>Mitogen activated protein-kinase</i>
MCT	Monocarboxylate transporteur
MDA	Malondialdéhyde
MIP	Matrice inter-photorécepteur
MLA	Maculopathie liée à l'âge
MLX	<i>Max-like protein X</i>
MME	Membrane mitochondriale externe
MPC	Transporteur pyruvate mitochondrial
mtATP	ATP mitochondrial
NAC	N-acétylcystéine
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide forme oxydée
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide forme réduite
NAD-IDH	Isocitrate déshydrogénase
NADP-ICDH	Isocitrate déshydrogénase
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide Phosphate forme oxydé
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide Phosphate forme réduite
NAMPT	Nicotinamide phosphoribosyltransférase
NDRI	<i>National disease research interchange</i>
NFE2L2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

NHS	Sérum de cheval normal
NNT	Transhydrogénase
NO	Oxyde nitrique
NOS2/i-NOS	Oxyde nitrique synthase
NPD1	<i>Neuroprotectin D1</i>
NXNL1	<i>Nucleoredoxin-like-1</i>
OCT	<i>Optimal cutting temperature</i>
OGA	O-GlcNAcase
OGT	UDP-N-acétylglucosamine-peptide-N-acétylglucosaminyl-transférase
OXPHO	Phosphorylation oxydative
PAF	Paraformaldéhyde
PBS	<i>Phosphate buffered-saline</i>
PCR	Polymérisation en chaine
PDC	Pyruvate déshydrogénase
PDE6	Phosphodiesterase cGMP-dépendante
PDK	Pyruvate déshydrogénase kinase
PDP	Pyruvate déshydrogénase phosphatase
PEP	Phosphoénolpyruvate
PFK	Phosphofructokinase
PFKFB2	6-phosphofructo-2 kinase/fructose 2-6 biphosphatase 2
PGM3	Phosphoacétylglucosamine mutase-3
PHGDH	D-3-phosphoglycérate déshydrogénase
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PK	Pyruvate kinase
PKA	Protéine kinase A
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
pKi	Point isoélectrique
PKM2	Pyruvate kinase isoforme M2
PLAG	Protéines de liaison aux acides gras
PNA	<i>Peanut Agglutinin</i>
PR	Photorécepteurs
PTP1B	Tyrosine phosphatase 1B
RdCVF	<i>Rod derived Cone Viability Factor</i>
RFP	<i>Red Fluorescent protein</i>

RHO	Rhodopsine
Ri5P	Ribose-5-phosphate
RNR	Ribonucléotide réductase
RP	Rétinopathie pigmentaire
RPGR	<i>Retinitis pigmentosa GTPase regulator</i>
RPIA	Ribulose-5-phosphate isomérase
RT-PCR	Rétro transcription-polymerase chain reaction
Ru5P	Ribulose-5-phosphate
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SE	Segment externe
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SIRT3	Sirtuine déacétylase NAD-dépendante
SLC	<i>Solute carrier</i>
SNO	S-nitrosylation
SNP	Polymorphismes nucléotidiques simples
SOH	S-sulfénylation
SO ₂ H	S-sulfinylation
SRXN	Sulfirédoxine
SSG	S-glutathionylation
SSH	S-sulphydratation
STGD1	Maladie de Stargardt
STXBP	<i>Protein syntaxin 3</i>
sXBP1	<i>Spliced-X-box binding protein-1</i>
S6K1	S6 kinase β 1
TCA	<i>Tricarboxylic acid cycle</i>
TCN	Transporteurs concentrés de nucléosides
TEN	Transporteurs équilibrants de nucléosides
TFE3	<i>Transcription factor E3</i>
TLR	<i>Tool-like receptor</i>
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TPI	Triose phosphate isomérase
TXN	Thiorédoxine
TXNIP	<i>Thioredoxin interacting protein</i>
TXNRD	Thiorédoxine réductase
UAP1	UDP-N-acétylhexosamine pyrophosphorylase

UCP	Protéine de découplage
UMP	Uridine monophosphate
UTP	Uridine triphosphate
UTR	<i>Untranslated regions</i>
VEGF	Facteur de croissance endothélial vasculaire
XBP1	<i>X-box binding protein-1</i>
XMP	Xanthosine-5'-phosphate
ZNC351C	<i>Finger protein 354C</i>

INTRODUCTION

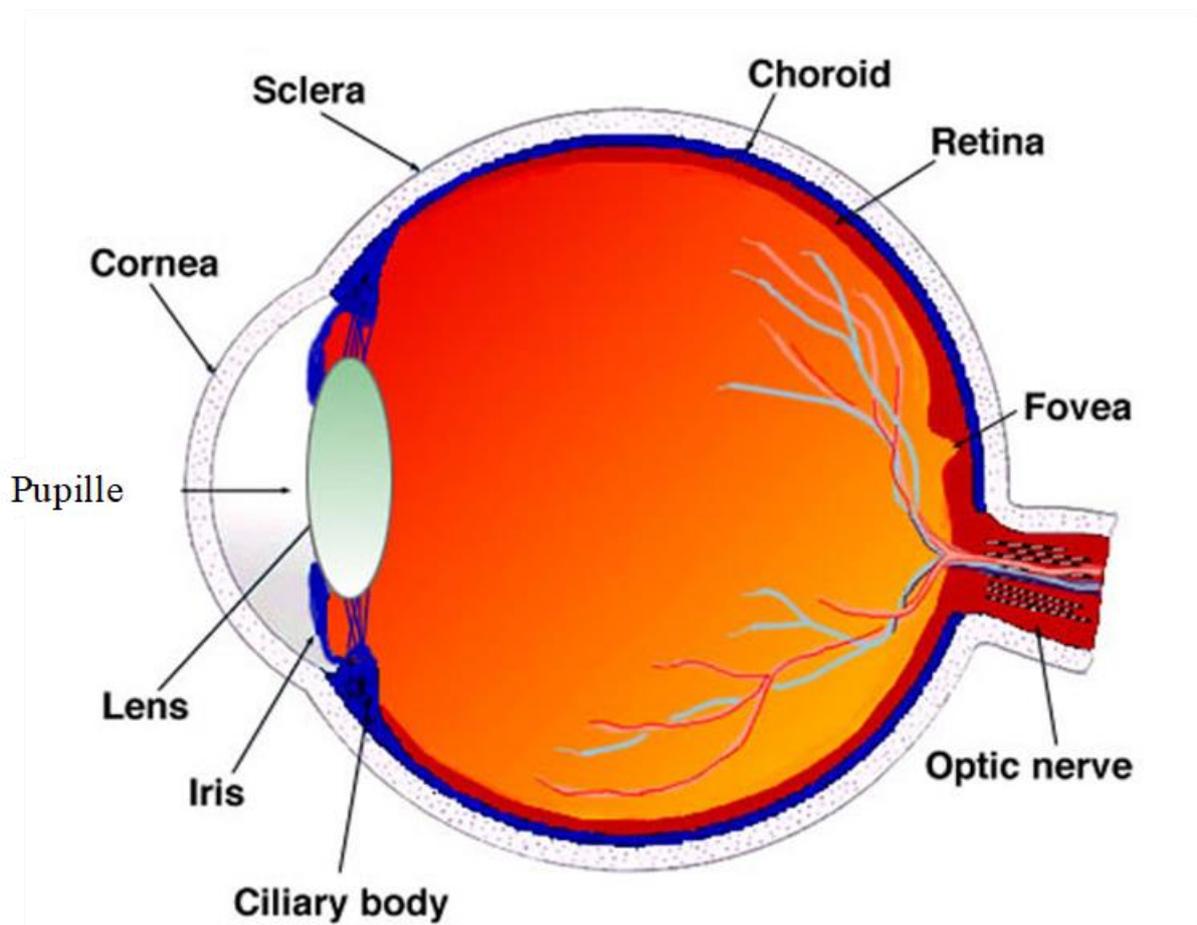


Figure 1 : Section verticale sagittale d'un œil adulte humain.
<https://webvision.med.utah.edu>

INTRODUCTION

1. La rétine

La vision est l'un des cinq sens développés chez l'être humain, c'est le sens dédié à la perception de la lumière. Cette perception est assurée par l'organe visuel, l'œil et plus particulièrement par son capteur, la rétine. La rétine qui tapisse le fond de l'œil est composée de deux tissus, la rétine neurale et l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) (**Figure 1**). Par abus de langage, la rétine neurale est communément appelée rétine, il en sera donc ainsi dans ce mémoire. La rétine est le lieu de traduction des photons en signaux nerveux envoyés au cerveau via le nerf optique. Il s'agit d'un tissu neuronal, partie intégrée au système nerveux central (Dowling, 1987), de 0,1 à 0,5 mm d'épaisseur qui est localisé entre l'humeur vitrée et l'EPR. La rétine possède une structure stratifiée composée de 5 types de neurones (photorécepteurs, cellules bipolaires, cellules amacrines, cellules horizontales et cellules ganglionnaires) et 3 types de cellules gliales (cellules gliales de Müller, astrocytes et microglies). Ces différents types cellulaires sont arrangés en 5 couches nucléaires (Behar-Cohen et al., 2020) (**Figure 2**).

- La couche nucléaire externe contenant le corps cellulaire des photorécepteurs
- La couche plexiforme externe qui est formée par les jonctions synaptiques entre les photorécepteurs et les cellules de la couche interne
- La couche nucléaire interne contenant le corps cellulaire des cellules horizontales, bipolaires et amacrines
- La couche plexiforme interne, qui fait la jonction synaptique des cellules bipolaires et des cellules ganglionnaires
- La couche des cellules ganglionnaires, qui se compose essentiellement des cellules ganglionnaires et de quelques cellules amacrines.

Les **photorécepteurs**, comme leur nom l'indique, sont des neurones récepteurs de la lumière. Ils sont responsables de la transduction du signal lumineux en signal biochimique, puis électrique via une cascade appelée phototransduction. Il existe deux types de photorécepteurs, les bâtonnets et les cônes qui n'ont pas la même sensibilité spectrale. Les photorécepteurs étant le sujet majeur de la thèse, ils seront traités dans un chapitre qui leur sera dédié. Les

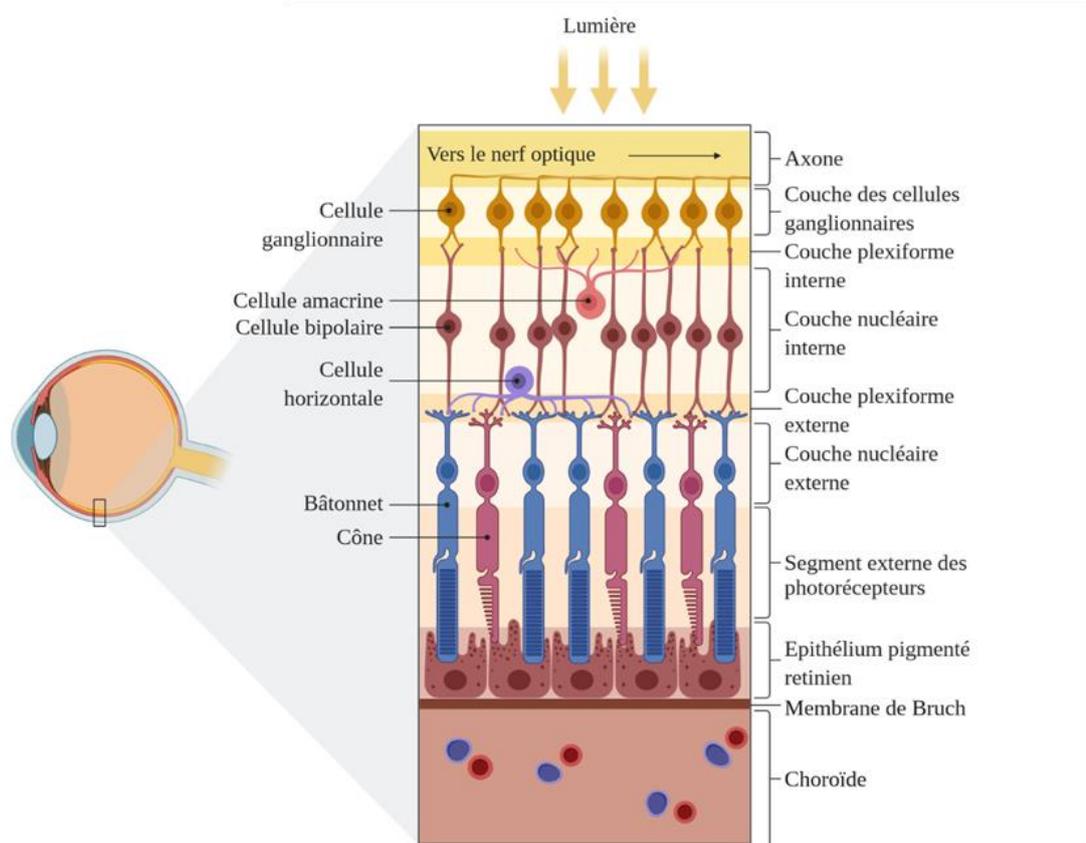


Figure 2 : Organisation des différentes couches cellulaires de la rétine. (BioRender)

photorécepteurs ont des contacts synaptiques avec un type particulier d'interneurones, les **cellules bipolaires** qui permettent la transmission du signal lumineux. Il existe plusieurs groupes de cellules bipolaires (Euler et al., 2014) : les bipolaires des bâtonnets, reliant plusieurs bâtonnets à une cellule ganglionnaire, et les bipolaires des cônes, reliant un ou plusieurs cônes à une cellule ganglionnaire. Le signal est ensuite transmis aux **cellules ganglionnaires**. Ce sont les seuls neurones de la rétine à transformer le signal nerveux en potentiel d'action (**Figure 3**). L'ensemble des axones des cellules ganglionnaires se regroupe au niveau de la papille optique pour former le nerf optique qui propage le signal visuel, au niveau du cerveau. Il existe une très grande diversité de cellules ganglionnaires qui ont des caractéristiques anatomiques, physiologiques, fonctionnels et moléculaires spécifiques (Nguyen-Ba-Charvet and Rebsam, 2020). Le signal provenant des photorécepteurs est modulé par d'autres neurones au niveau de la couche plexiforme externe par les **cellules horizontales** qui sont de trois types, HI, HII et HIII (Poche and Reese, 2009). Les cellules horizontales sont connectées latéralement à plusieurs cônes, bâtonnets et neurones bipolaires et leur rôle est d'inhiber l'activité des cellules avoisinantes par inhibition latérale dont le principe est d'augmenter le contraste du signal visuel. Au niveau de la couche plexiforme externe, les **cellules amacrines** forment une voie alternative de communication entre la rétine externe et interne que ne repose pas sur les cellules bipolaires. La morphologie des cellules amacrines est très diversifiée, il en existe 29 types (Hartveit and Veruki, 2012), qui ont des prolongements dendritiques distincts et utilisant une grande diversité de neurotransmetteurs. Leur corps cellulaire est situé dans la couche nucléaire interne.

Une population de cellules non neuronales assure le fonctionnement des neurones rétiniens. Les **cellules gliales de Müller**, majoritaires, traversent la rétine de part en part et leurs extrémités forment la couche limitante intermédiaire et la couche limitante interne (**Figure 4**). Ces cellules interviennent dans le maintien de la structure de la rétine et jouent également un rôle de soutien au métabolisme des neurones car elles recyclent les ions et les neurotransmetteurs libérés par les neurones et régulent ainsi la concentration ionique de la rétine. Elles sont issues des mêmes progéniteurs que les neurones rétiniens (Turner and Cepko, 1987). De leur côté, **les astrocytes** migrent du cerveau vers la rétine via le nerf optique durant le développement rétinien. Des études récentes démontrent qu'il existe un deuxième site de production des astrocytes dans la zone ventriculaire rétinienne, une couche de cellules progénitrices immédiatement adjacente à l'épithélium pigmentaire rétinien, très tôt durant le développement embryonnaire de la rétine (Chan-Ling et al., 2009). Ce second type d'astrocytes se localisent uniquement au niveau de la couche des ganglionnaires où ils jouent un rôle dans

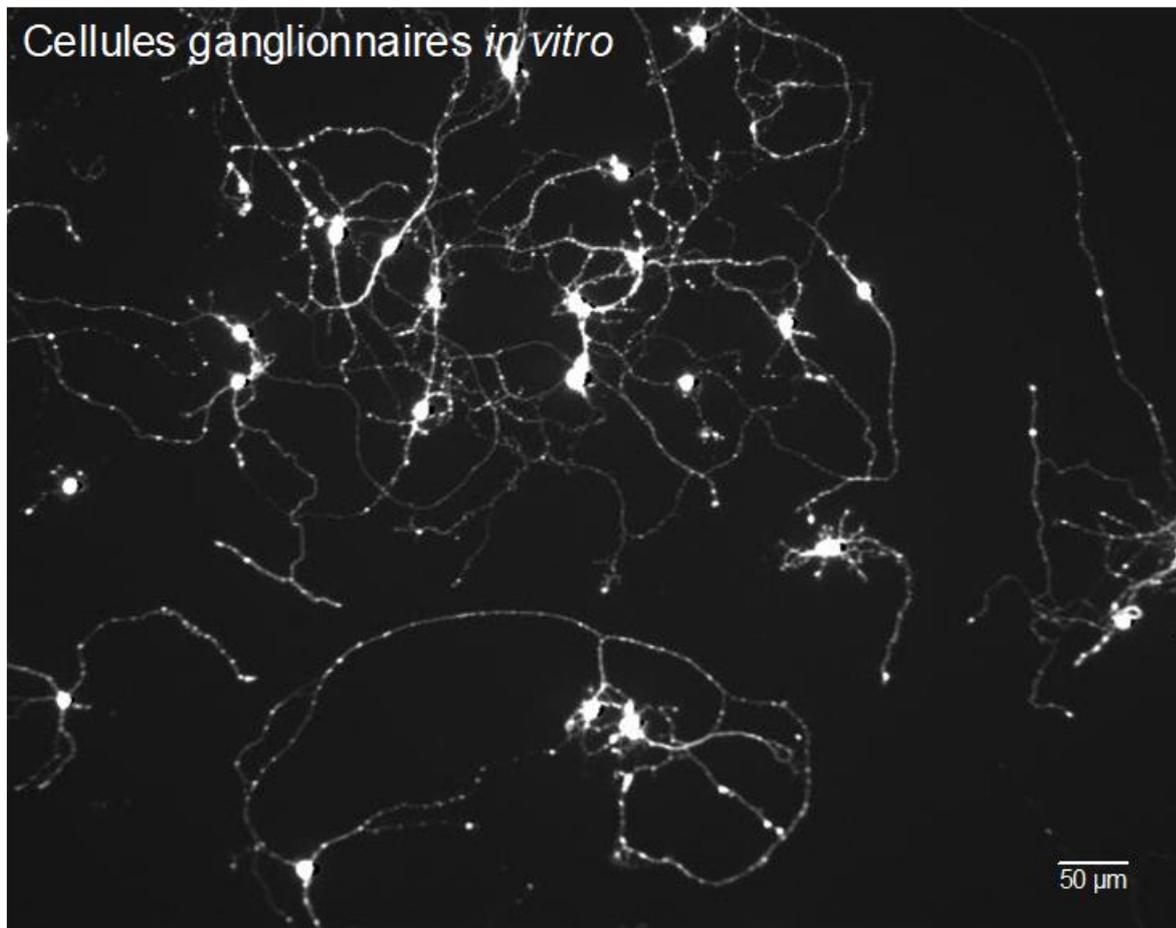


Figure 3 : Cellules ganglionnaires *in vitro*. Marquage *calcein*. (Valérie Fradot, Institut de la Vision).

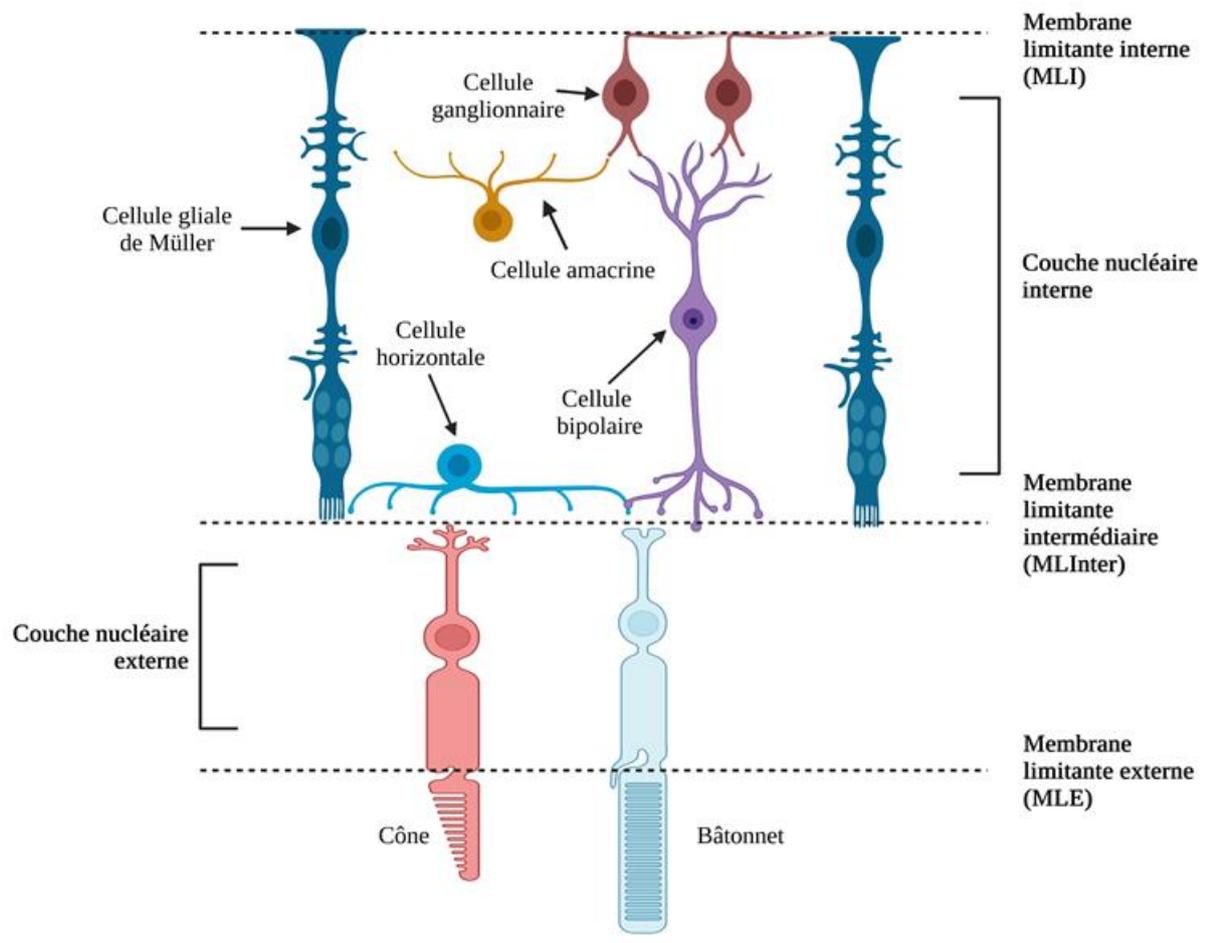


Figure 4 : Schéma des connexions nerveuses dans la rétine et des cellules gliales de Müller. (Géraldine Millet-Puel, Institut de la Vision avec le logiciel BioRender).

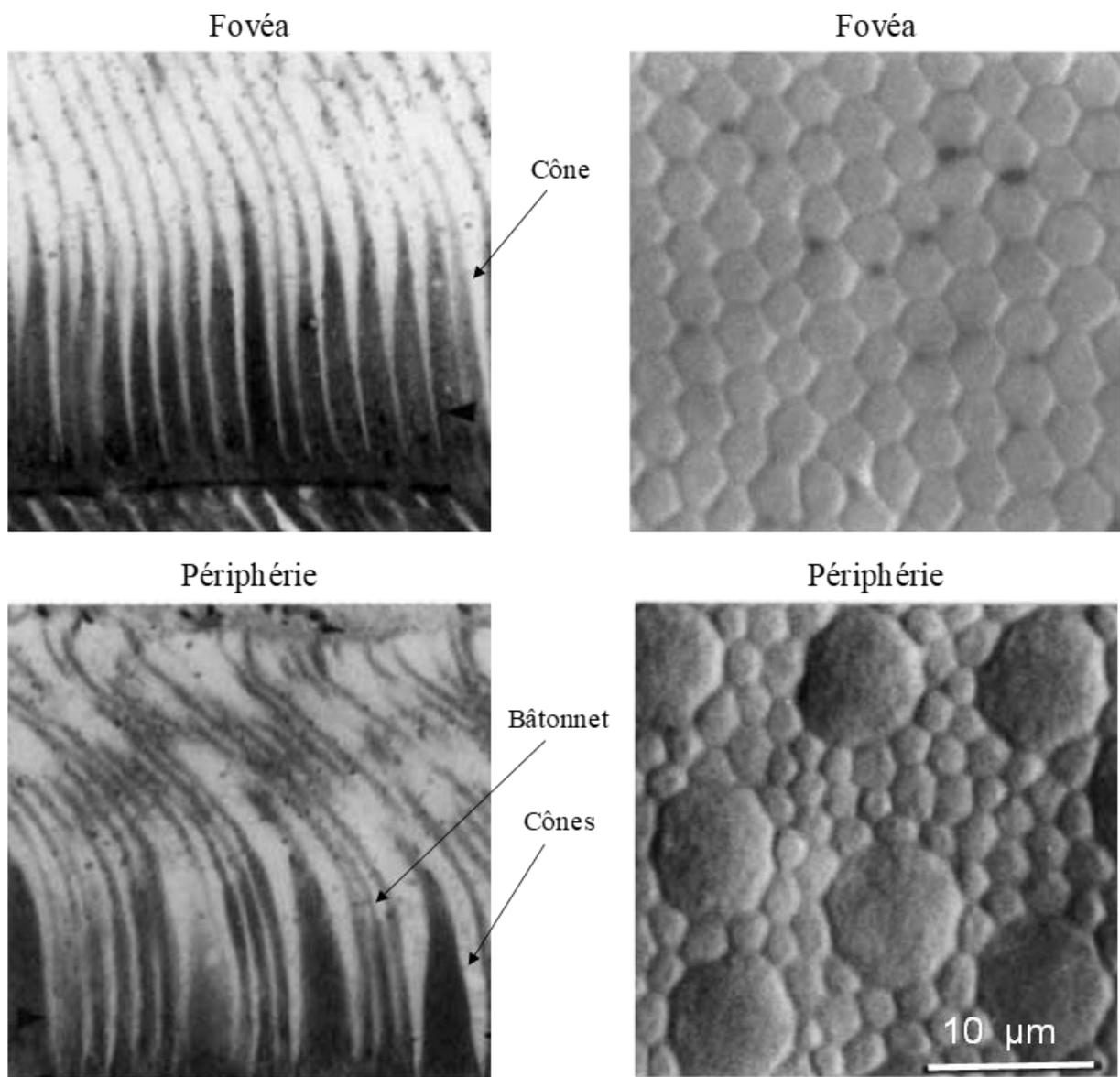


Figure 5 : Les photorécepteurs. Vue horizontale et transversale des segments externes des photorécepteurs en microscopie électronique (Curcio et al., 1996).

le maintien de la barrière hémato rétinienne entre la circulation sanguine et la rétine interne. Durant le développement embryonnaire, les **cellules microgliales** pénètrent dans la rétine en même temps que les précurseurs des vaisseaux sanguins, ce qui montre qu'elles ont une originemesenchymale (Li et al., 2019). Leur fonction, à l'âge adulte, est de phagocyter les débris cellulaires qui sont libérés lors de traumatismes de la rétine (Yu et al., 2020).

2. Les photorécepteurs

La structure des photorécepteurs est particulière car ce type cellulaire possède un segment externe qui est le siège de la phototransduction, un segment interne où se trouve toute la machinerie cellulaire, un cil connecteur qui relie le segment externe et le segment interne et un pied où se situent les terminaisons synaptiques (**Figures 5**). Le cil connecteur est l'unique connexion entre les deux segments, il est donc impliqué dans les processus d'échange de nombreuses molécules, notamment des protéines mais aussi des phospholipides (Trojan et al., 2008). Le segment externe est formé d'un empilement de disques, fait d'une bicouche lipidique, interne à la membrane cellulaire, pour les bâtonnets et dans le prolongement de la membrane cellulaire pour les cônes. C'est sur ces disques que sont localisés les pigments visuels sensibles à la lumière, des protéines à 7 domaines membranaires couplées aux protéines G, les opsines. Pour les bâtonnets, ce segment externe est particulièrement long et contient donc de très nombreux pigments visuels, c'est ce qui les rend 1 000 fois plus sensibles à la lumière que les cônes, dont les segments sont plus courts. Pour les cônes, ces segments ont une forme effilée, en cône. Les segments externes des photorécepteurs sont constamment renouvelés (Young, 1967). Les membranes et protéines membranaires qui les composent, migrent donc progressivement du pôle basal (côté segment interne), où ils sont synthétisés et assemblés vers le pôle apical (en regard de l'EPR), où ils sont phagocytés. Le segment interne des photorécepteurs contient toute la machinerie cellulaire : le noyau et les organites (les mitochondries, l'appareil de Golgi, etc.) indispensables au fonctionnement cellulaire du photorécepteur. La terminaison synaptique est le lieu de transmission du signal électrique produit par la lumière vers les neurones internes de la rétine.

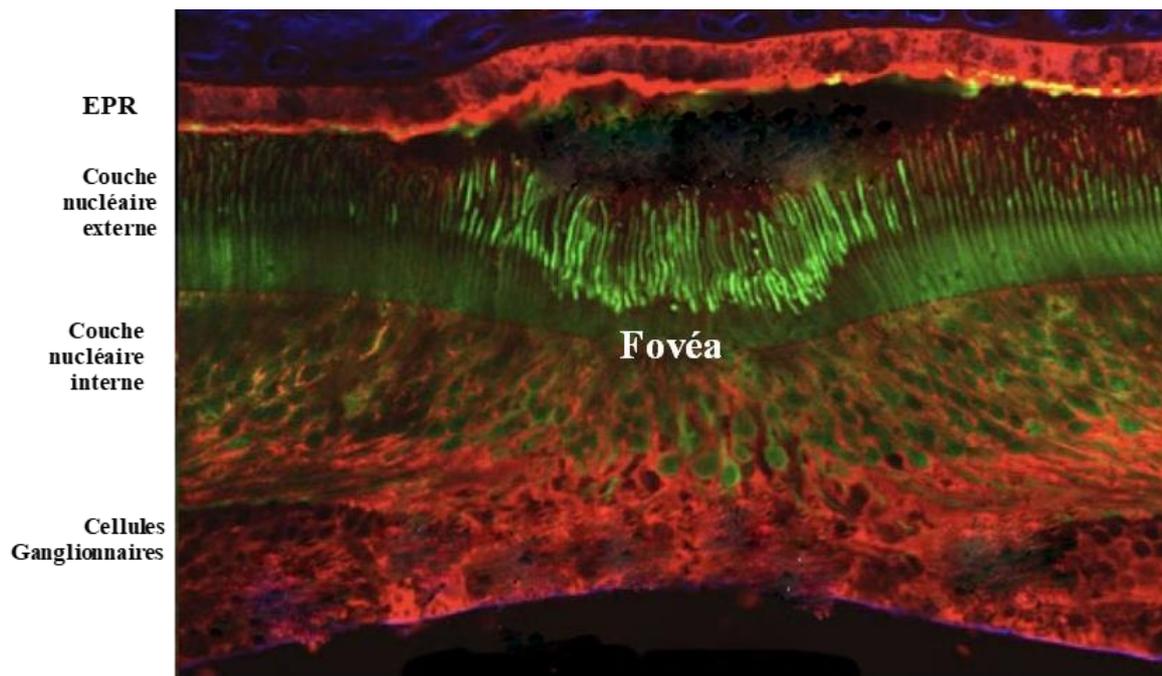


Figure 6 : La Fovéa. Région centrale de la rétine des primates contenant exclusivement des photorécepteurs à cônes. Coupe transversale d'une rétine primate avec un marquage arrestine des cônes en vert, *cellular retinaldehyde-binding protein* (CRALBP) en rouge. <https://webvision.med.utah.edu/>

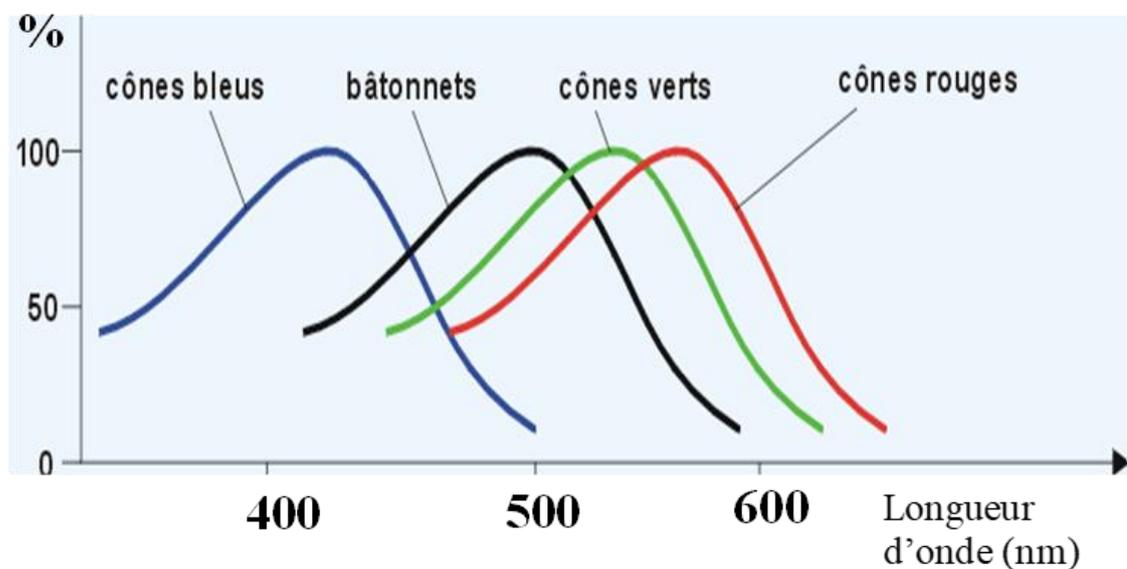


Figure 7 : Sensibilité spectrale des 4 photorécepteurs de la rétine humaine.

(Serge Bertorello)

2.1. Les bâtonnets

Les bâtonnets, très sensibles à la lumière, sont le support de la vision scotopique, c'est à dire la vision nocturne, à faible luminosité. Cette vision n'est qu'en noir, blanc et nuances de gris car les bâtonnets ne perçoivent pas les couleurs. Les bâtonnets, comme la plupart des récepteurs cellulaires du système sensoriel, n'expriment qu'un seul pigment visuel, la rhodopsine « du grec rhodos, rose, et opsis, vision ». Cette molécule est une protéine à sept domaines transmembranaires, l'opsine. La rhodopsine établit une liaison covalente avec le rétinol, qui n'est autre qu'un aldéhyde de la vitamine A (rétinol). La molécule d'opsine qui lie le rétinol, est synthétisée dans l'appareil de Golgi dans le segment interne, puis est transportée via des vésicules jusqu'au cil connecteur où elle est incorporée dans la membrane des disques (Bachmann-Gagescu and Neuhauss, 2019). Le rétinol, produit de la vitamine A est issu de l'alimentation et transportée par la circulation sanguine à la choroïde et transmis aux photorécepteur à travers l'EPR. La molécule de rétinol est commune aux bâtonnets et aux différents types de cônes.

2.2. Les cônes

Les cônes sont responsables de la vision photopique, c'est à dire la vision de jour, à forte luminosité. Ils permettent une vision très résolutive chez les primates et les oiseaux, grâce à la présence au centre de la rétine de la fovéa (**Figure 6**) qui ne comprend exclusivement que des photorécepteurs à cônes. Les cônes permettent également de distinguer les couleurs grâce aux différentes sensibilités spectrales de sous-types de cônes. En effet les cônes se répartissent en trois grandes familles chez l'homme et les autres primates, L (long), M (medium) et S (short) correspondant respectivement à leur sensibilité aux longues, moyennes et courtes longueurs d'ondes (Wilkinson et al., 2017). Les cônes exprimant l'érythropsine sont sensibles pour des longueurs d'onde correspondant au rouge (opsine-L), ceux exprimant de la chloropsine, au vert (opsine-M) et ceux exprimant de la cyanopsine, au bleu (opsine-S) (**Figure 7**). Ces trois types de récepteurs sont inégalement répartis sur la rétine des primates. Alors que la fovéa comporte essentiellement des cônes L et M, les cônes de types S se trouvent essentiellement en région parafovéolaire. En dépit de la régularité évoquée plus haut, la répartition des différents types de cônes dans la rétine, est aléatoire. Cette répartition aléatoire des différents types de cônes permet

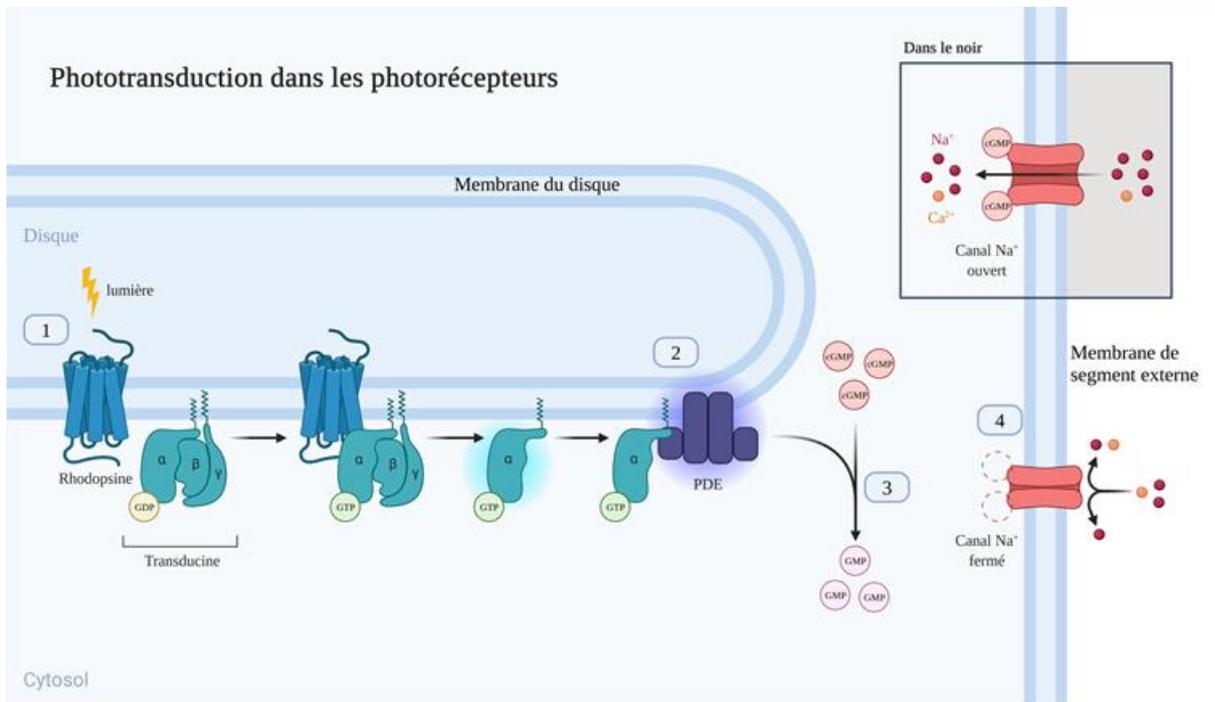


Figure 8 : La cascade de phototransduction des bâtonnets. 1. Après stimulation de la rhodopsine par la lumière, le changement de conformation au sein des sept domaines transmembranaires provoque la dissociation de la sous-unité alpha de la transducine (son activation) 2. qui se lie à la phosphodiestérase (PDE) provoquant la dissociation d'une sous-unité inhibitrice (PDEG) et ainsi l'activation de l'enzyme qui convertie de cGMP en GMP. 3. La baisse de concentration du cGMP provoque 4. la fermeture des canaux Na⁺-cGMP dépendant au niveau de la membrane externe du photorécepteur. Cette fermeture provoque l'hyperpolarisation du photorécepteur, information qui est transmis à la synapse. (Géraldine Millet-Puel, Institut de la Vision avec le logiciel BioRender).

d'éviter des aberrations visuelles lorsque le sujet regarde des motifs réguliers. C'est la séquence en acides aminés des opsines des cônes qui détermine le spectre de longueurs d'ondes absorbées.

2.3. La phototransduction

Les molécules d'opsine sont des protéines à sept domaines transmembranaires couplées à la protéine G, également appelées récepteurs couplés aux protéines G (Baylor, 1987; Wilkinson et al., 2017). Les opsines établissent une liaison covalente à travers une lysine intramembranaire avec le rétinol (Wald, 1933). Le rétinol existe sous forme de deux stéréoisomères, le 11-*cis*- et le tout-*trans*-rétinol. Lors de l'absorption d'un photon dans le domaine visible, celui-ci déclenche une isomérisation *cis/trans* du rétinol appelée photoisomérisation. La photoisomérisation entraîne un changement de conformation de l'opsine à laquelle le rétinol est lié et initie la cascade de phototransduction. En effet ce changement de conformation qui est détecté par une protéine G intracellulaire, la transducine qui va induire toute une cascade de réactions biochimiques (**Figure 8**). Cette cascade induit la fermeture de canaux sodium puis des canaux calcium, ce qui provoque l'hyperpolarisation membranaire du photorécepteur et bloque la libération d'un neurotransmetteur, le glutamate. Le signal électrochimique est alors transmis aux neurones internes de la rétine. La phototransduction la plus connue est celle des bâtonnets¹.

La rétine pigmentaire est constituée d'un épithélium cubique simple dont les cellules émettent des microvillosités qui entourent les segments externes des photorécepteurs (**Figure 9**). Il existe deux types de microvillosités, des courtes impliquées dans la phagocytose des segments externes des photorécepteurs, et des longues, qui ont un rôle de maintien de la structure EPR/photorécepteur et un rôle d'apport des nutriments essentiel aux photorécepteurs. Chaque cellule de l'EPR est en contact avec en moyenne 25 photorécepteurs, bâtonnets et cônes. L'EPR entretient une relation quasi symbiotique avec la couche proximale des photorécepteurs, selon quatre fonctions principales. La première fonction de l'EPR est la phagocytose et la dégradation des segments externes des photorécepteurs. Au cours d'une journée, la

¹<https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/processing-the-environment/sight/v/phototransduction-cascade>

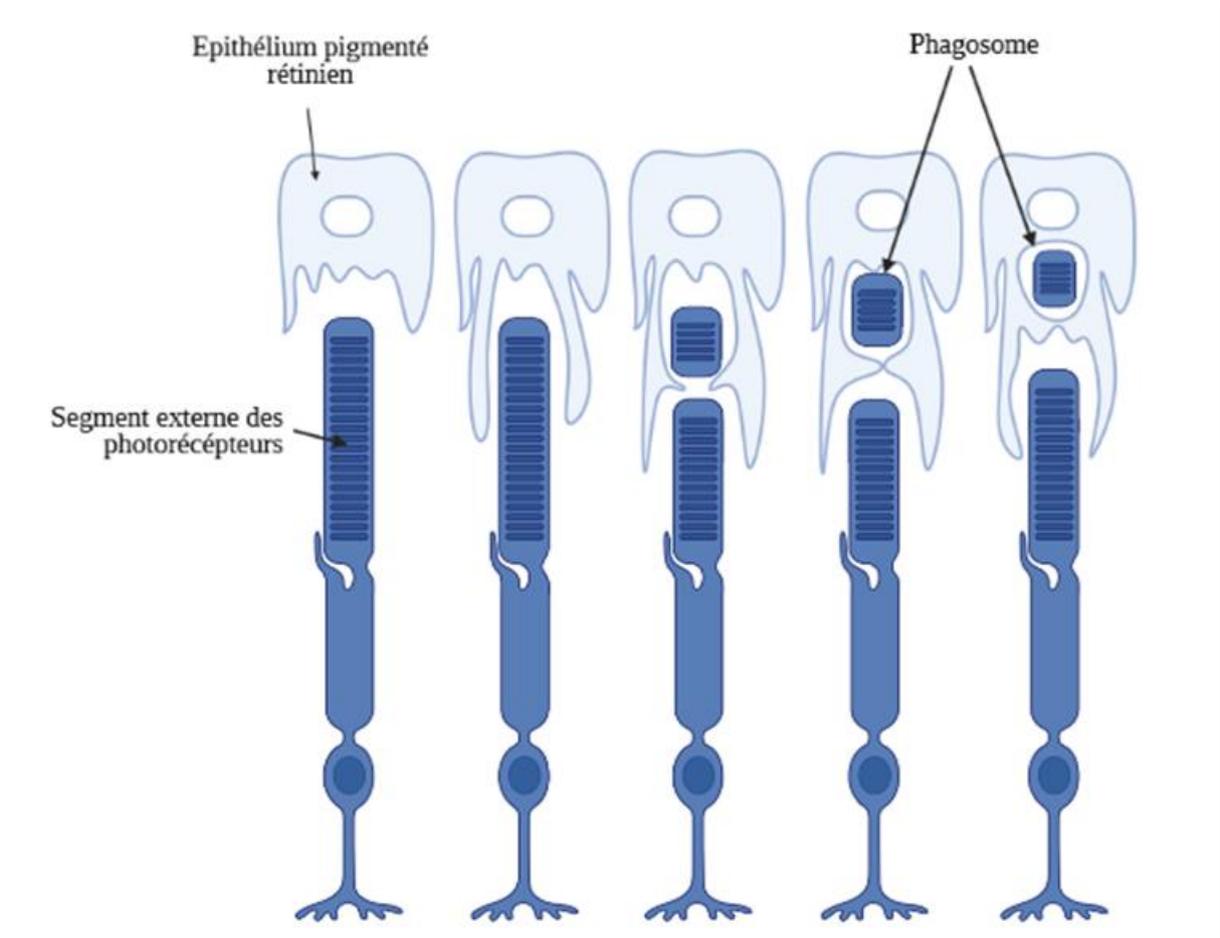


Figure 9 : Schéma de la phagocytose des segments externes des photorécepteurs par les cellules de l'épithélium pigmenté rétinien. (Géraldine Millet-Puel, Institut de la Vision avec le logiciel BioRender).

concentration des substances nocives résultant de l'exposition des photorécepteurs à la lumière, les peroxydes lipidiques, augmente particulièrement dans la région apicale (en regard de l'EPR) des segments externes (Beatty et al., 2000). Les segments externes sont phagocytés par l'EPR une fois par jour et renouvelés par leur côté basale (côté segment interne) pour assurer la continuité du fonctionnement du système (**Figure 9**). Les microvilies dites courtes des cellules de l'EPR entourent l'extrémité des segments externes des photorécepteurs et phagocytose ces derniers. Les phagosomes qui contiennent les segments externes fusionnent ensuite avec les lysozymes dans les cellules de l'EPR où ils sont dégradés. On estime qu'une cellule de l'EPR phagocyte entre 2.000 et 4.000 disques membranaires chaque jour. La phagocytose des segments externes des photorécepteurs est soumise à l'horloge circadienne. En effet, l'EPR initie la phagocytose des segments externes des photorécepteurs au lever du soleil, (Kevany and Palczewski, 2010; Krigel et al., 2010). L'EPR assure aussi un rôle d'absorption d'une part des rayons lumineux, car il contient un pigment de couleur brun noir : la mélanine, qui absorbe la lumière et qui limite ainsi la quantité de lumière réfléchiée dans l'œil et protège donc les photorécepteurs. Cette monocouche cellulaire participe au cycle visuel. Le cycle de la vision est régi par la photoisomérisation du rétinol qui est lié au pigment visuel par une liaison covalente (Wright et al., 2015). Lorsque le rétinol 11-*cis* absorbe un photon venant de la lumière, il passe de l'état 11-*cis* à l'état tout-*trans*. Le rétinol 11-*cis* est ensuite régénéré par voie enzymatique, en permettant la transisomérisation du tout-*trans*-rétinol en 11-*cis*-rétinol (**Figure 10**) (Baehr et al., 2003). Les photorécepteurs ne possèdent pas d'activité *cis-trans* isomérase. Le recyclage est possible grâce au transport de la molécule de *cis*-rétinol du segment externe des photorécepteurs vers l'EPR via une protéine de transport l'*interphotoreceptor retinoid binding protein* (IRBP) (Adler and Martin, 1982; Gonzalez-Fernandez, 2002). Certaines études montrent qu'il existe une deuxième voie de transisomérisation pour les cônes. En effet, les cônes peuvent recycler leurs tout-*trans*-rétinol dans les cellules de Müller (Mata et al., 2002). L'EPR joue aussi un rôle de barrière hémato-rétinienne contrôlant l'afflux des nutriments entre la rétine externe et la circulation sanguine au niveau de la choroïde, sous-jacente à l'EPR. Dans un sens, l'EPR transporte du glucose, des ions et d'autres nutriments du sang vers les photorécepteurs, dans l'autre sens, il transporte du lactate, des électrolytes et de l'eau de l'espace sous rétinien vers la choroïde (Hurley, 2021). Le transporteur du glucose GLUT1 est exprimé sur la face basale (vers la choroïde) et apicale (vers les photorécepteurs) de l'EPR (Ban and Rizzolo, 2000; Sugawara et al., 1994). L'EPR transporte également la vitamine A (rétinol), nécessaire au renouvellement du cycle visuel (Harrison, 2019) et sans doute aussi l'insuline (voir plus loin).

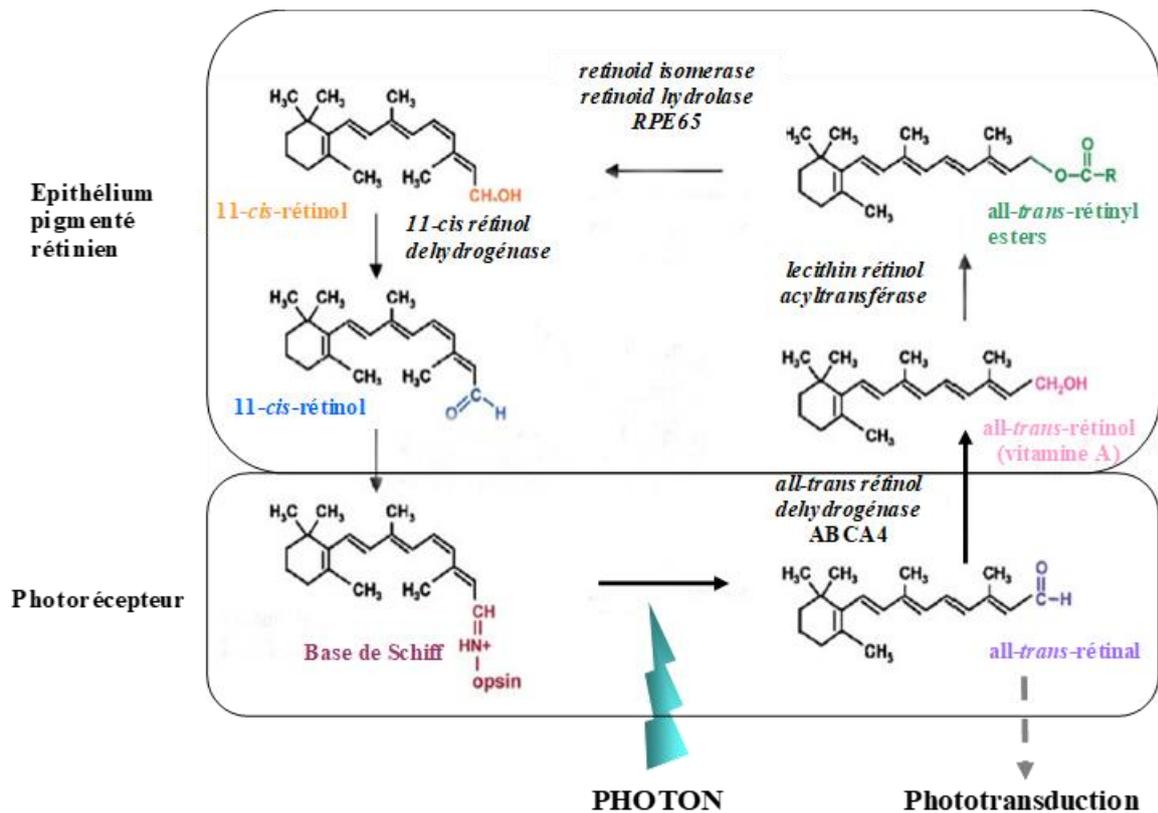
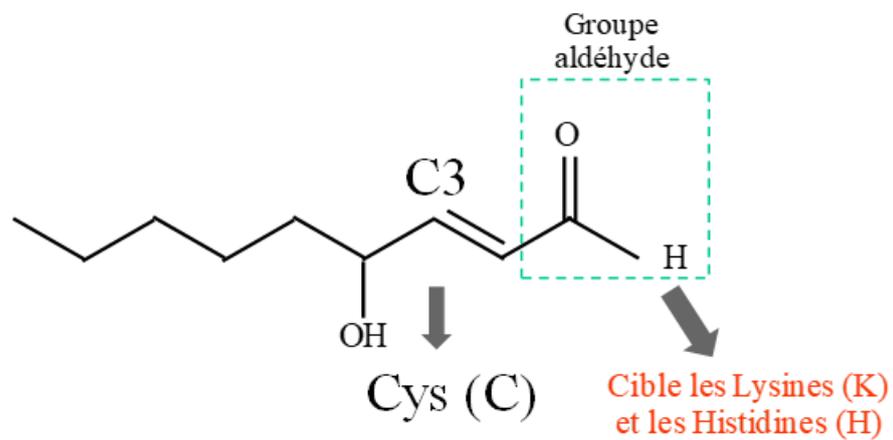


Figure 10 : Schématisation du cycle visuel ou cycle de la vitamine A. Le photon provoque la transisomérisation du 11-*cis*-rétinal en all-*trans*-rétinal qui est lié à une base de Schiff (liaison covalente) à la molécule d'opsine (récepteur à sept domaines transmembranaires lié à une protéine G qui est la transducine). Ceci initie la cascade de la phototransduction au sein du photorécepteur. Le all-*trans*-rétinal est déshydrogéné en all-*trans*-rétinol et transporté dans l'épithélium pigmenté rétinien via le transporteur *ATP-binding cassette, sub-family A4* (ABCA4). Dans l'épithélium pigmenté rétinien, il est transformé en all-*trans*-rétinyl ester et ensuite transisomérisé en 11-*cis*-rétinyl ester par un complexe enzymatique comprenant la *Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein* (RPE65) puis transformé en 11-*cis*-rétinol qui se lie à l'opsine dans le photorécepteur sous forme de 11-*cis*-rétinal. Le cycle de la vitamine A (all-*trans*-rétinol) est complet.

3. Le renouvellement des segments externes des photorécepteurs

La bicouche lipidique des segments externes des photorécepteurs est une membrane extrêmement fluide, ceci pour faciliter le changement de conformation des opsines lors de la phototransduction. La fluidité de cette bicouche lipidique lui est conférée par sa forte proportion de lipides constitués d'acides gras polyinsaturés (AGPI). Chez les mammifères, l'acide docosahexaénoïque (DHA) qui est un acide gras oméga-3 essentiel, représente 80% des AGPI du segment externe des photorécepteurs. Il faut noter que les photorécepteurs ne synthétisent pas d'acides gras *de novo* mais leurs sont transmis via l'alimentation (Zhongjie et al., 2021). La poly-insaturation est la présence de plusieurs doubles liaisons (C=C), chimiquement rigides. Néanmoins, les liaisons C=C des AGPI sont flanquées de deux liaisons saturées (C-C) formant un motif régulier d'une liaison non rotative (C=C) et de deux liaisons rotatives (C-C). Cette disposition réduit l'énergie de rotation qui augmente la fluidité de la bicouche lipidique (Antonny et al., 2015). C'est aussi une double liaison (C=C) du chromophore, le 11-*cis*-retinal, qui est soumise à une isomérisation *cis/trans*. Les lipides du segment externe du photorécepteur sont donc sujets à ce même phénomène d'oxydation (Leveillard and Sahel, 2017). Les acides gras mono-insaturés et saturés sont beaucoup moins réactifs et ne participent généralement pas à la peroxydation lipidique. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) provoquent la peroxydation des lipides des segments externes des photorécepteurs, une réaction en chaîne dans laquelle un ERO peut induire l'oxydation d'un grand nombre de molécules lipidiques contenant des acides gras poly-insaturés par des réactions en cascade (Catala, 2006). Les hydroperoxydes d'acides gras sont finalement décomposés en aldéhydes réactifs, tels que le 4-hydroxy-2-nonéanal (HNE) et le malondialdéhyde (MDA). Ces produits finaux de la peroxydation lipidique endommagent les protéines en réagissant avec des groupements chimiques de certains acides aminés comme les cystéines, les lysines et les histidines (Tanito et al., 2005) (**Figure 11A**). La chaîne latérale thiol nucléophile de la cystéine participe à de nombreuses réactions enzymatiques et la formation irréversible d'adduits d'4-hydroxynonéanal (HNE) avec des protéines, ce qui est préjudiciable à la fonction des photorécepteurs (Kim et al., 2015) (**Figure 11B**). Les photorécepteurs sont des neurones post-mitotiques qui ne se régénèrent pas, du moins chez les mammifères (Locker et al., 2009). Les lipides endommagés sont éliminés des photorécepteurs des vertébrés par phagocytose des disques par l'EPR. Ce processus est régulé par l'horloge circadienne, de sorte que 10% du segment externe du

A.



B.

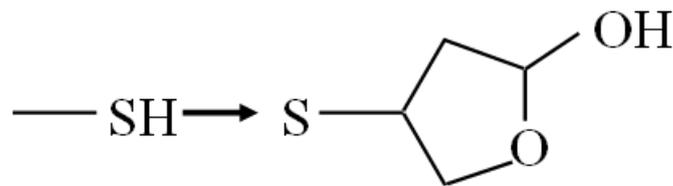


Figure 11 : Peroxydation des lipides des segments externes. A. Structure chimique du 4-hydroxy-2-nonanal (HNE). Le carbone en position C3 cible la modification de la cystéine. Le groupe des aldéhydes cible les lysines et de l'histidines. B. Modification d'un résidu cystéine (SH) dans une protéine par HNE par addition d'un groupe thiol en position C3. Adapté de (Leveillard and Sahel, 2017)

photorécepteur en bâtonnet est quotidiennement éliminé dans les phagosomes des cellules de l'EPR. Les phagosomes sont déplacés de la membrane apicale vers la membrane basale où les protéines et les lipides sont dégradés (Kevany and Palczewski, 2010). Afin de maintenir sa longueur, le segment externe du photorécepteur est renouvelé à partir de sa base au contact du segment interne, un processus qui implique la synthèse de protéines et de lipides dans le segment interne du photorécepteur. Contrairement aux cônes, les segments externes des bâtonnets sont constitués d'un empilement de disques membranaires individualisés non reliés à la membrane plasmique du segment interne. Par conséquent, les lipides sont transférés de la membrane plasmique vers les disques alors que pour les cônes, la membrane plasmique est en continuité avec celles de leurs segments externes (Burgoyne et al., 2015; Chuang et al., 2007; Volland et al., 2015)

Le renouvellement des segments externes des bâtonnets a été découvert par Richard W. Young (Young, 1967). Dans les bâtonnets, la plupart des nouvelles protéines sont d'abord concentrées à leur base, où elles sont utilisées dans l'assemblage de nouvelles membranes de disque. Après une seule injection de ^3H -méthionine, Young a observé par autoradiographie, des disques marqués se déplaçant progressivement le long du segment externe en raison de la formation continue de disques. Une observation similaire a été faite en utilisant des acides gras marqués au tritium (**Figure 12**). Très probablement, c'est ce mécanisme de phagocytose et de renouvellement des disques qui a imposé le positionnement à l'envers des photorécepteurs et de leurs segments externes dans la partie la plus distale de la rétine à partir de la lumière incidente en contact avec l'EPR (Leveillard and Sahel, 2017).

4. La Choroïde

Le renouvellement du segment externe des photorécepteurs dans la rétine des vertébrés est énergétiquement exigeant et biologiquement complexe. Le système visuel se classe parmi les systèmes avec consommation importante d'énergie et la rétine a en particulier, un métabolisme énergétique extrêmement élevé. Les nutriments nécessaires au bon fonctionnement du métabolisme énergétique de la rétine, le glucose, la vitamine A et les acides gras sont apportés par le sang, or la rétine externe formée par les photorécepteurs est avasculaire, contrairement à la rétine interne. En conséquence, les nutriments sont fournis aux photorécepteurs par le flux sanguin choroïdien, de l'autre côté de l'EPR. Contrairement à la

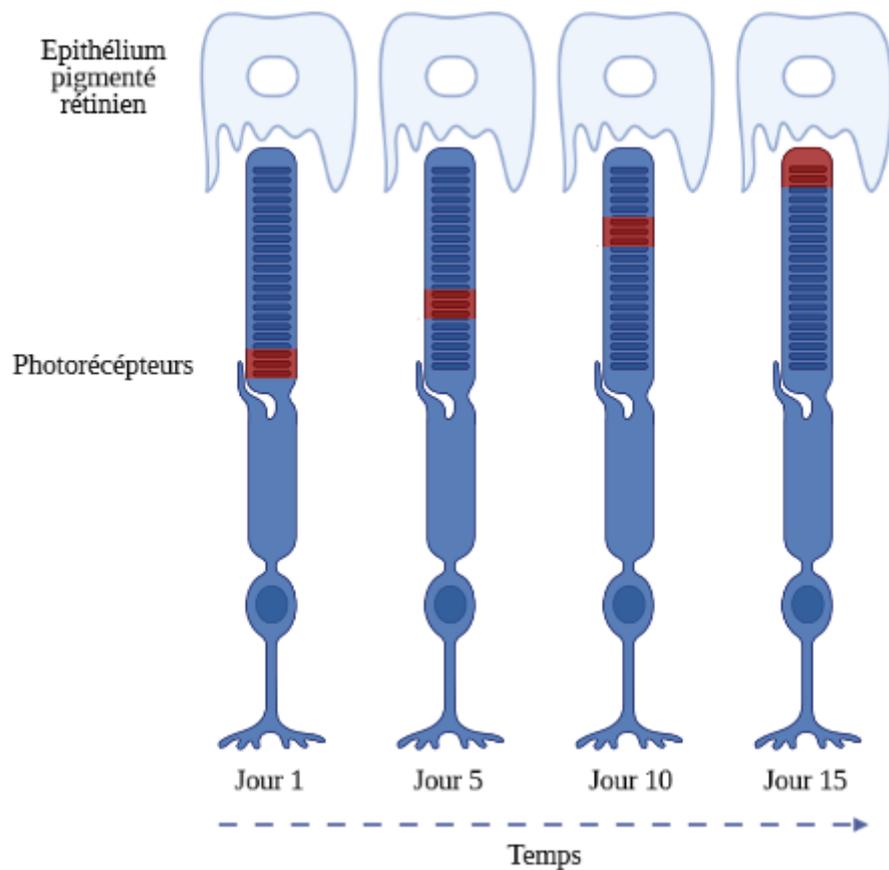


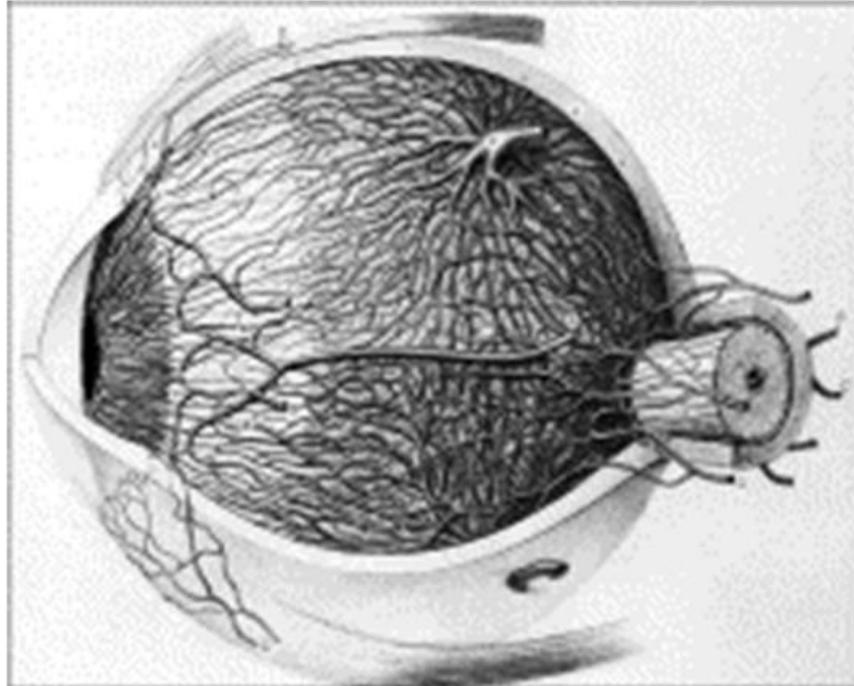
Figure 12 : Schématisation du renouvellement des segments externes des photorécepteurs. Les segments les plus distaux du segment externe contenant les disques les plus anciens sont donc retirés des photorécepteurs tandis que de nouveaux disques sont fabriqués à la base du segment externe. Au fur et à mesure que de nouveaux disques se forment à la base des segments externes, les anciens disques sont retirés par phagocytose, un processus qui prend environ 10 jours. (Géraldine Millet-Puel, Institut de la Vision avec le logiciel BioRender).

plupart des vaisseaux vasculaires du corps, les artères et les veines choroïdiennes ne sont pas parallèles (**Figure 13A**). La circulation choroïdienne nourrit la choroïde mais également l'EPR et la rétine jusqu'à la membrane limitante externe (Ryan, 2006). La circulation choroïdienne présente l'un des taux de circulation sanguine les plus élevés du corps (Foulds, 1990) (**Figure 13B**). Pour être plus précis, rapporté en gramme de tissu, la choroïde a quatre fois plus de flux sanguin que le cortex. La structure unique de la choroïde est essentielle à son rôle de dissipation thermique, mais également assure l'apport des nutriments nécessaires à la rétine externe, composée de photorécepteurs.

Les échanges entre la circulation sanguine et la rétine sont contrôlés par la barrière hémato-rétinienne. Cette barrière est constituée de deux composantes ; l'endothélium vasculaire situé en contact avec la rétine interne et composés de vaisseaux rétiniens entourés de péricytes et l'EPR constituant la barrière entre la circulation et la rétine externe. Les jonctions intercellulaires serrées (*zonula occludens*) sont les composantes les plus importantes de ces barrières, elles empêchent les substances extracellulaires de circuler entre les cellules et les obligent à traverser la membrane cellulaire selon des mécanismes actifs et passifs très sélectifs (**Figure 14**) (Omri et al., 2010). Ces jonctions fournissent également une barrière semi-perméable, empêchant la diffusion de métabolites tel que le lactate produit par les photorécepteurs (Klipfel et al., 2021). Donc, pour atteindre la rétine externe, les métabolites transportés dans les choriocapillaires doivent traverser la membrane de Bruch, l'EPR et circuler dans l'espace inter-photorécepteur (EIP). L'EPR est donc de la plus haute importance car c'est le tissu qui transfère activement et sélectivement les molécules vers et depuis la rétine externe et constitue un écosystème métabolique rétinien (Hurley, 2021).

Les molécules apportées par la choroïde vers la rétine externe via l'EPR sont en premier lieu l'oxygène et le glucose. L'énergie cellulaire est produite selon deux voies métaboliques imbriquées, la glycolyse et la respiration mitochondriale. En terme de bilan énergétique, le métabolisme oxydatif dans les mitochondries grâce à l'apport d'oxygène l'emporte de loin sur celui du métabolisme glycolytique dans le cytosol, car une molécule de glucose ne produit que 2 molécules d'ATP par la glycolyse mais jusqu'à 36 molécules d'ATP par la respiration mitochondriale. Une caractéristique unique des photorécepteurs est leur consommation en

A.



B.

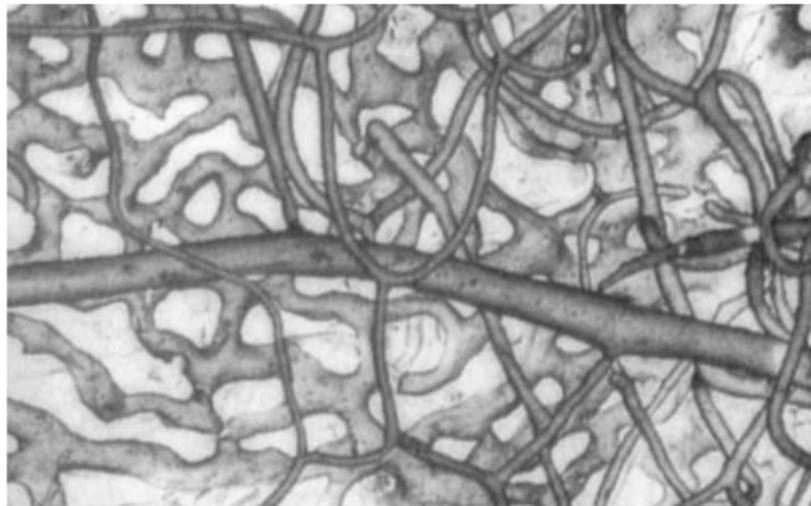


Figure 13 : A. Représentation de la circulation sanguine dans l'œil. Ryan S.J., (2017) **B.** Microscopie électronique à balayage d'un moulage en résine de la rétine et de la choroïde pour montrer la disparité considérable de taille qui existe entre les capillaires rétiniens et les choriocapillaires sous-jacent. (Foulds, 1990).

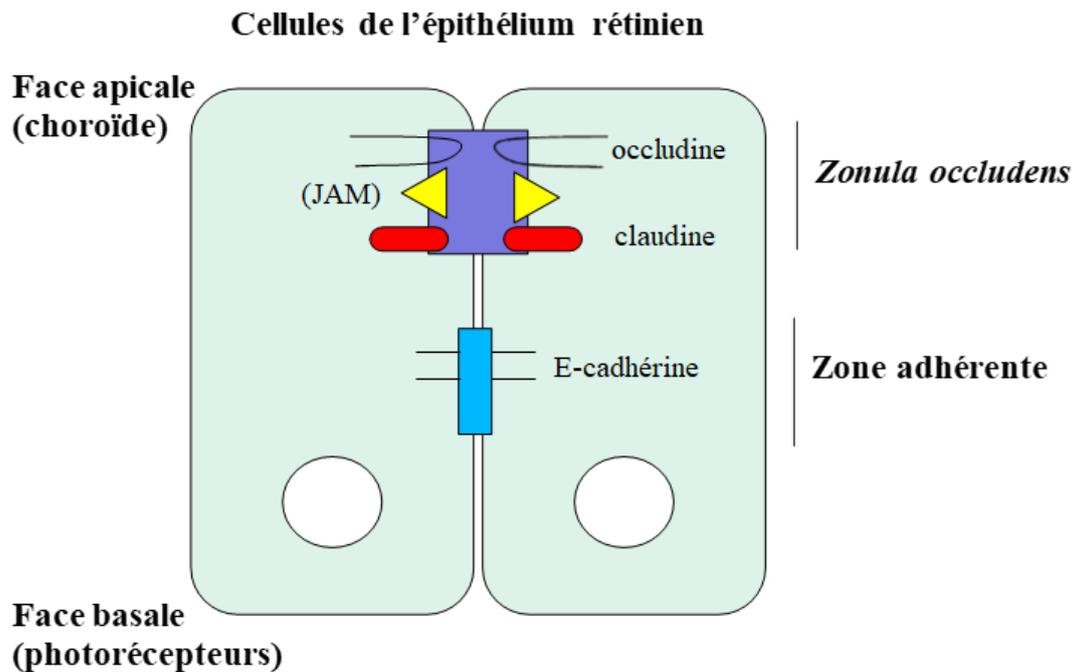


Figure 14 : Représentation schématique du complexe de jonction apicale (CJA) dans les cellules épithéliales. La *Zonula occludens* comprend les jonctions serrées constituées par les membres des protéines transmembranaires claudine, occludine et *junction adhesion molecule* (JAM). Inspiré de (Omri et al., 2010).

Espèces	Respiration Q_{O_2}	Q_{LO_2} Formation de lactate aérobie	Q_{LN_2} Formation de lactate anaérobie
Rat	-31	+45	+88
Lapin	-27	+33	+37
Poulet	Très basse	+109	+105
Pigeon	-8	+183	+187
Grenouille (25°C) (<i>Rana esculenta</i>)	-6	0	+18
Poisson (20°C) (<i>Leuciscus rutilus</i>)	-5.5	0.6	+15

Figure 15 : Respiration et glycolyse de la rétine. Les valeurs sont tirées de la littérature de l'époque. La température est comprise entre 37°C et 40°C, excepté pour les températures indiquées. Les Unités Q sont celles utilisées par Otto Warburg $\mu\text{l}/\text{mg}$ de matière sèche (wt/h). Krebs, H.A. (1927). (Leiner, 1938).

glucose et ainsi le métabolisme du glucose par les photorécepteurs s'est donc trouvé mêlé aux premières études sur le métabolisme cellulaire.

5. Le métabolisme des photorécepteurs

6.1. Première observation, l'effet Warburg

L'allemand Otto Heinrich Warburg (1883-1970), Docteur en chimie puis Docteur en médecine, a été lauréat du Prix Nobel de physiologie ou médecine en 1931, pour sa découverte de la nature, du mode et de l'action de la respiration cellulaire enzymatique (Obituary, 1970). Ce sont ses travaux sur le métabolisme des cellules cancéreuses qui lui auraient permis de découvrir un mode particulier de métabolisme. Il découvrit en 1923 que ces cellules produisent une très forte quantité d'acide lactique. Or, l'acide lactique est le résultat de la fermentation du glucose, donc sans apport d'oxygène. La glycolyse sans apport d'oxygène résulte en une respiration cellulaire défectueuse illustrée notamment par une diminution de l'oxydation du succinate, de l'effet Pasteur et d'une respiration découplée. Il se convainquit que la capacité à obtenir de l'énergie par fermentation lactique de cellules à fort taux de prolifération cellulaire était une caractéristique majeure des cellules cancéreuses. Warburg pensait avoir trouvé la cause première du cancer et refusa d'accepter la théorie de la communauté scientifique selon laquelle ce n'était qu'un aspect de la malignité de la maladie. Il s'est tellement impliqué émotionnellement qu'il a considéré comme ses «ennemis» personnels tous ceux qui n'acceptaient pas sa théorie (Ghiretti, 1983).

Dans un article publié en 1925, Otto Warburg avait des difficultés à intégrer la glycolyse aérobie de la rétine, qu'il a lui-même observée, comme production de lactate à sa propre théorie de la spécificité de cette voie métabolique pour les cellules tumorales et par extension aux cellules qui prolifèrent (Warburg, 1925). Warburg soupçonnait que la production de lactate par la rétine était due à des lésions tissulaires produites lors de la dissection (Urbano, 2021). Selon lui, la rétine souffre dès que la circulation est interrompue lors de sa préparation, mais que dans

A



B



Figure 16 : Otto Heinrich Warburg et Hans Adolf Krebs. A. Otto Heinrich Warburg (By Bundesarchiv, Bild 102-12525 / Georg Pahl / CC-BY-SA 3.0, CC BY-SA 3.0 de. B. Hans Adolf Krebs (National Portrait Gallery London).

des conditions normales il n'y a en fait pas de production de lactate par la rétine. C'est l'assistant de Warburg à l'Institut Kaiser-Wilhelm de Berlin qui en perfectionnant le manomètre développé par Warburg pour ses études du métabolisme montra que taux de glycolyse de la rétine aviaire est en fait le plus élevé parmi tous les tissus animaux testés (Krebs, 1927) (**Figure 15**). Hans Adolf Krebs (prix Nobel, 1953) ne cita pas Otto Warburg lors de la publication de cette étude et quand il fut plus tard interrogé sur le rôle de Warburg à l'origine de ce travail, Krebs répondit que «si je ne l'avais pas mentionné, cela signifie qu'il ne l'avait pas réellement suggéré ». En janvier 1933, Adolf Hitler fut élu chancelier d'Allemagne et l'antisémitisme latent qui couvait d'ors et déjà en Allemagne a été attisé et s'est enflammé par l'intermédiaire des nazis. Otto Warburg était protestant mais d'origine juive par son père (**Figure 16A**). À ce titre, il aurait pu être, soit expulsé d'Allemagne, soit déporté dans les camps de concentration. Parce qu'Adolf Hitler était particulièrement préoccupé par le cancer et parce qu'il pensait que Warburg serait le seul scientifique susceptible de lui trouver un traitement efficace du cancer, il donna des instructions pour qu' Otto Warburg fût préservé de la déportation (Nickelsen, 2018; Paxton, 1972). En avril 1933, Hans Adolf Krebs (**Figure 16B**), du fait de ces origines juives, reçut une brève lettre du doyen de sa faculté l'informant qu'il était immédiatement mis en congé. Une semaine plus tard, il fut officiellement démis de ses fonctions, avec prise effet fin juin 1933. Il fuit l'Allemagne avec sa famille pour échapper au régime nazi (Kornberg et Williamson, 1984) et se réfugia à Cambridge. Pour ce qui concerne cet exposé, la période fut consacrée à éliminer les aveugles plutôt qu'à les guérir. Sur une photographie de l'époque (**Figure 17**), nous reconnaissons aisément l'œil, les photorécepteurs, bâtonnets et cônes, et des arbres généalogiques de familles comportant des individus atteints de dégénérescence rétinienne héréditaire. Mais les brassards portés par les assistants font craindre qu'il s'agisse d'éradiquer la maladie par le meurtre. En 1972, alors que l'eau était alors passée sous les ponts, Krebs faisait une déclaration qui semble englober le point de vue tardif de Warburg, décédé en 1970, bien qu'il soit permis d'en douter, « Nous préférons considérer la rétine comme un cas à part, et conclure que le métabolisme du glucose par la glycolyse aérobie qui sert à la prolifération cellulaire peut aussi produire du lactate pour d'autres fins » (Krebs, 1972). Prolifération égale glycolyse aérobie mais pas l'inverse. Il est clair que le phénomène observé pour la rétine n'avait pas trouvé d'explication à cette date.

Le métabolisme de la rétine des mammifères a été largement étudié durant la période suivante (Futterman and Kinoshita, 1959; Graymore, 1959). Bien que la rétine ait un taux de respiration élevé, une grande partie du glucose utilisé est convertie en lactate

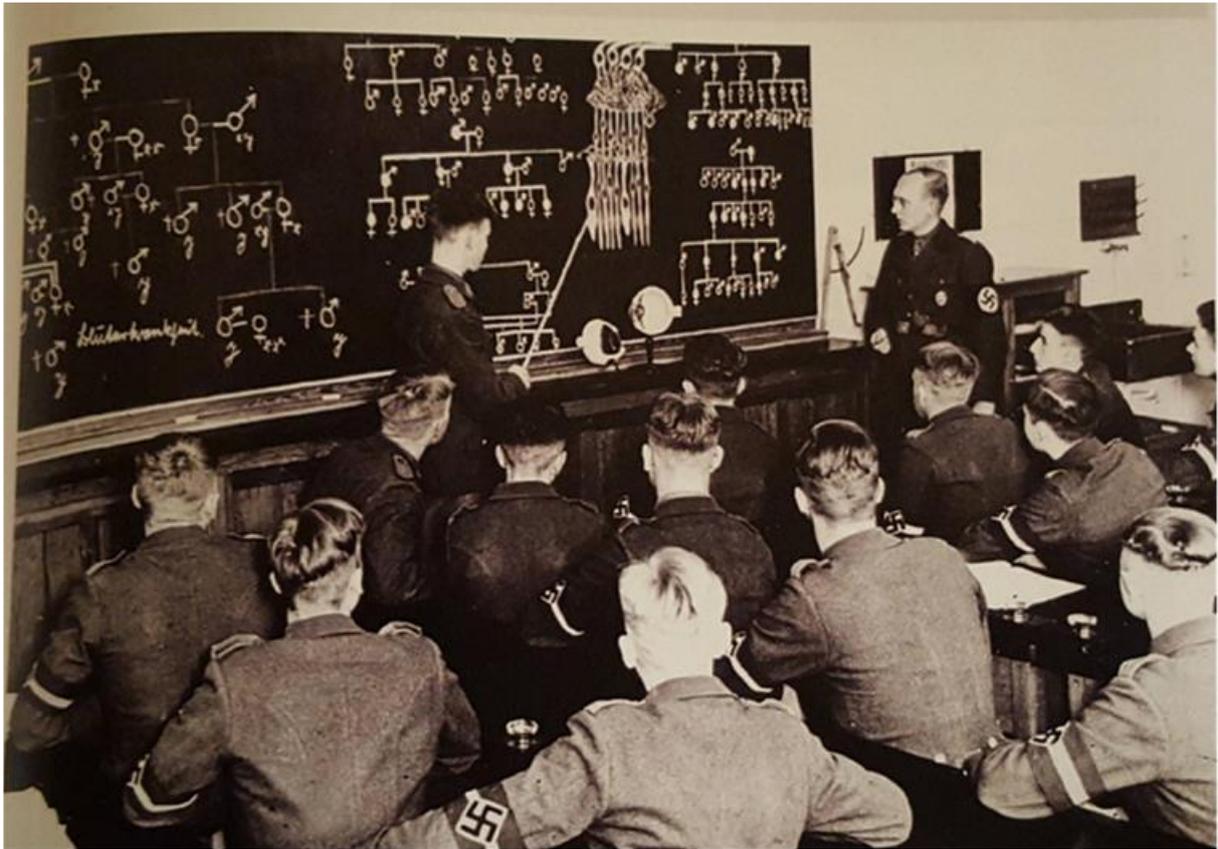
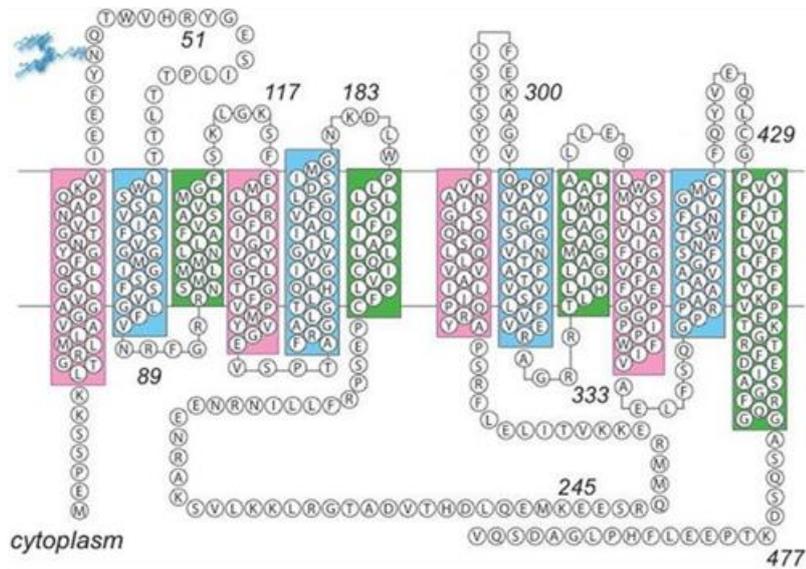


Figure 17 : Etude chez les Nazis des cellules de la rétine et de la généalogie de familles atteintes des maladies rétiniennes. (Mukherjee, 2016).

(Winkler et al., 1997a). L'importance de l'apport de glucose dans la rétine a soulevé la question suivante : y a-t-il un rôle essentiel de l'adénosine-triphosphate (ATP) issu de la glycolyse dans la fonction et la survie des photorécepteurs ? Cette question est restée sans réponse à cette époque car il était difficile de différencier la contribution respective dans la production d'ATP de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative mitochondriale. Néanmoins, les chercheurs ont observé que la production de lactate de la rétine était similaire dans des conditions d'aérobie et d'anaérobie, ce qui suggéra que la respiration mitochondriale qui repose sur l'apport d'oxygène n'était pas le phénomène dominant (Winkler, 1981). Le fait que le métabolisme de la rétine soit réduit à moins de 50% dans une rétine dégénérée indiquait que le taux métabolique dans les photorécepteurs est beaucoup plus élevé que celui des autres cellules de la rétine. Les photorécepteurs sont résistants à une inhibition modérée de la respiration mitochondriale car la glycolyse produit suffisamment d'ATP pour compenser convenablement la perte d'ATP produit par l'arrêt de la respiration mitochondriale (Winkler et al., 1997b). La mesure de la glycolyse aérobie a une longue histoire comme nous l'avons vu plus haut (Warburg, 1925). S'il existe toujours des problèmes potentiels d'interprétation des phénomènes observés *in vitro* par rapport à la situation *in vivo*, il semble acquis que la production aérobie du lactate est une propriété physiologiquement normale de la rétine (Winkler, 1989). *In vitro*, les cellules neurones rétiens et les cellules gliales de Müller produisent de lactate (Winkler et al., 2004). *In vivo*, tant que le glucose est disponible, les neurones rétiens utilisent le glucose plutôt que le lactate que produisent les cellules gliales (Winkler et al., 2000; Winkler et al., 2003; Xue et al., 2021). Fait intéressant au regard des travaux historiques de Krebs, l'écureuil terrestre, une espèce dont la rétine est dominée par les cônes, produit un taux élevé de lactate (Winkler et al., 2008). Le métabolisme du glucose produit également des espèces réactives de l'oxygène (ERO) par la fuite d'ions au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. La rétine vieillissante peut ainsi être atteinte par l'oxydation, en particulier chez les patients souffrant de dégénérescence maculaire liée à l'âge (Winkler et al., 1999). C'est ainsi que la rétine possède un système enzymatique qui maintient le glutathion (GSH) sous sa forme réduite, ce qui est essentiel à son fonctionnement normal (Winkler and Giblin, 1983). Le faible niveau de GSH dans les segments externes des bâtonnets et des cônes a conduit à l'hypothèse selon laquelle le renouvellement des segments externes des photorécepteurs avait pour raison d'être la régénération du pouvoir redox du GSH (Winkler et al., 2008).

A



B

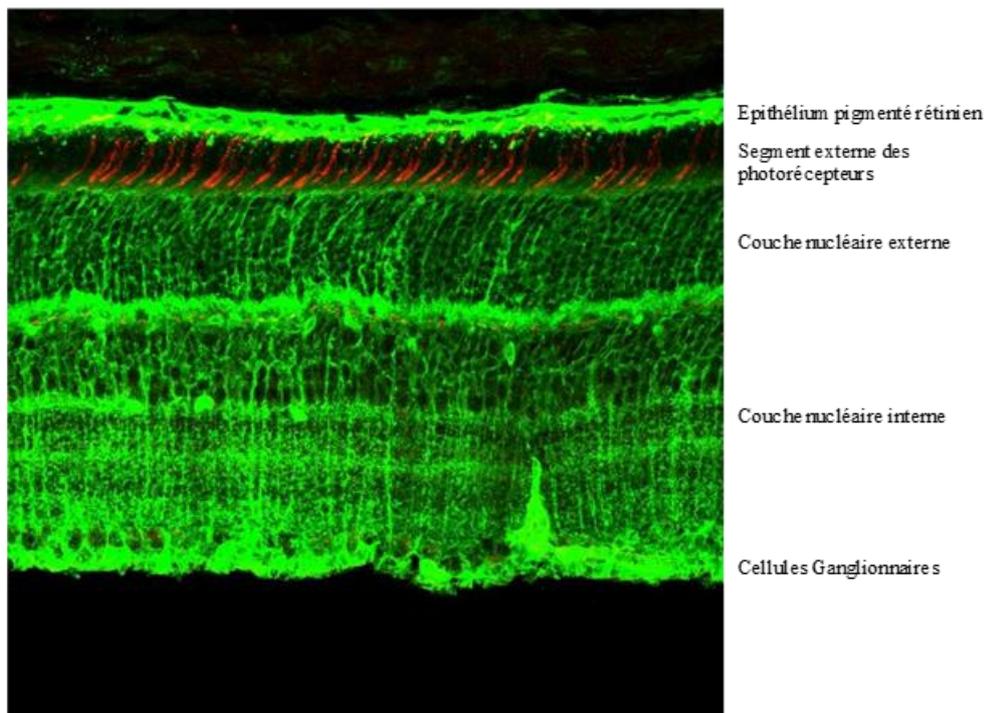


Figure 18 : GLUT1. A. Structure prédictive de GLUT1 issue du laboratoire d'Antony Carruthers. B. Marquage immunohistochimique d'une rétine avec un anticorps anti-GLUT1 et *Peanut agglutinin* (PNA), un marqueur des cônes. Emmanuelle Clérin, Institut de la Vision.

6.2. Le transport du glucose

La glycolyse est initiée par le transport du glucose du milieu extracellulaire vers le cytoplasme par les transporteurs du glucose exprimés à la surface de la cellule. GLUT1 (SLC2A1) catalyse l'étape limitante dans l'approvisionnement des cellules de la rétine en glucose, un carburant essentiel pour ces cellules dans les conditions normales (Xue et al., 2021). L'absorption de glucose est catalysée par un transfert bidirectionnel de type facilité (ne consommant pas d'énergie) du glucose à travers la membrane cellulaire par les transporteurs de la famille GLUT dans le sens du gradient de concentration du glucose, de la plus élevée vers la plus faible. Ce transport équilibré du glucose est souvent appelé diffusion facilitée car il est à plusieurs niveaux beaucoup plus rapide que la diffusion du glucose à travers une bicouche lipidique artificielle. GLUT1 est une glycoprotéine membranaire comprenant 12 domaines transmembranaires (DT) avec un site unique de N-glycosylation (N45). GLUT1 a des extrémités N-terminal et C-terminal cytoplasmiques, une longue boucle cytoplasmique reliant les domaines transmembranaires 6 et 7, une longue extrémité C-terminale (**Figure 18A**). Malgré son hydrophobicité, GLUT1 est accessible aux solvants aqueux. En effet, huit des douze domaines transmembranaires de GLUT1 sont hydrophiles, ce qui suggère que GLUT1 présente un canal central rempli d'eau par lequel le glucose transite. GLUT1 est sans aucun doute l'une des protéines de transport membranaire les plus étudiées. La structure, le mécanisme et la cinétique de transport de cette protéine ont fait l'objet de plusieurs centaines d'études menées au cours des dernières décennies (Mueckler and Thorens, 2013). Malgré cette attention, et même si une structure tridimensionnelle a été récemment proposée sur la base de la structure du cristal d'un homologue bactérien de GLUT1 (Sun et al., 2012), la compréhension complète de la façon dont cette protéine transporte le glucose à travers les bicouches lipidiques est toujours à l'étude (Carruthers et al., 2009; Gonzalez-Resines et al., 2021; Lloyd et al., 2017; Lloyd et al., 2018). Dans la rétine, la direction du flux du glucose n'est pas régulée par la distribution cellulaire de son transporteur puisque GLUT1 est exprimé par toutes les types cellulaires rétinien, y compris l'EPR (Ait-Ali et al., 2015) (**Figure 18B**). Il existe théoriquement trois manières d'accélérer l'absorption du glucose sans modifier son expression, sa stabilité ou son transfert de GLUT1 à la surface cellulaire. Ce sont l'échange accéléré, l'oligomérisation ou la réversion de l'inhibition de l'ATP. 1) Le transport par échange accéléré

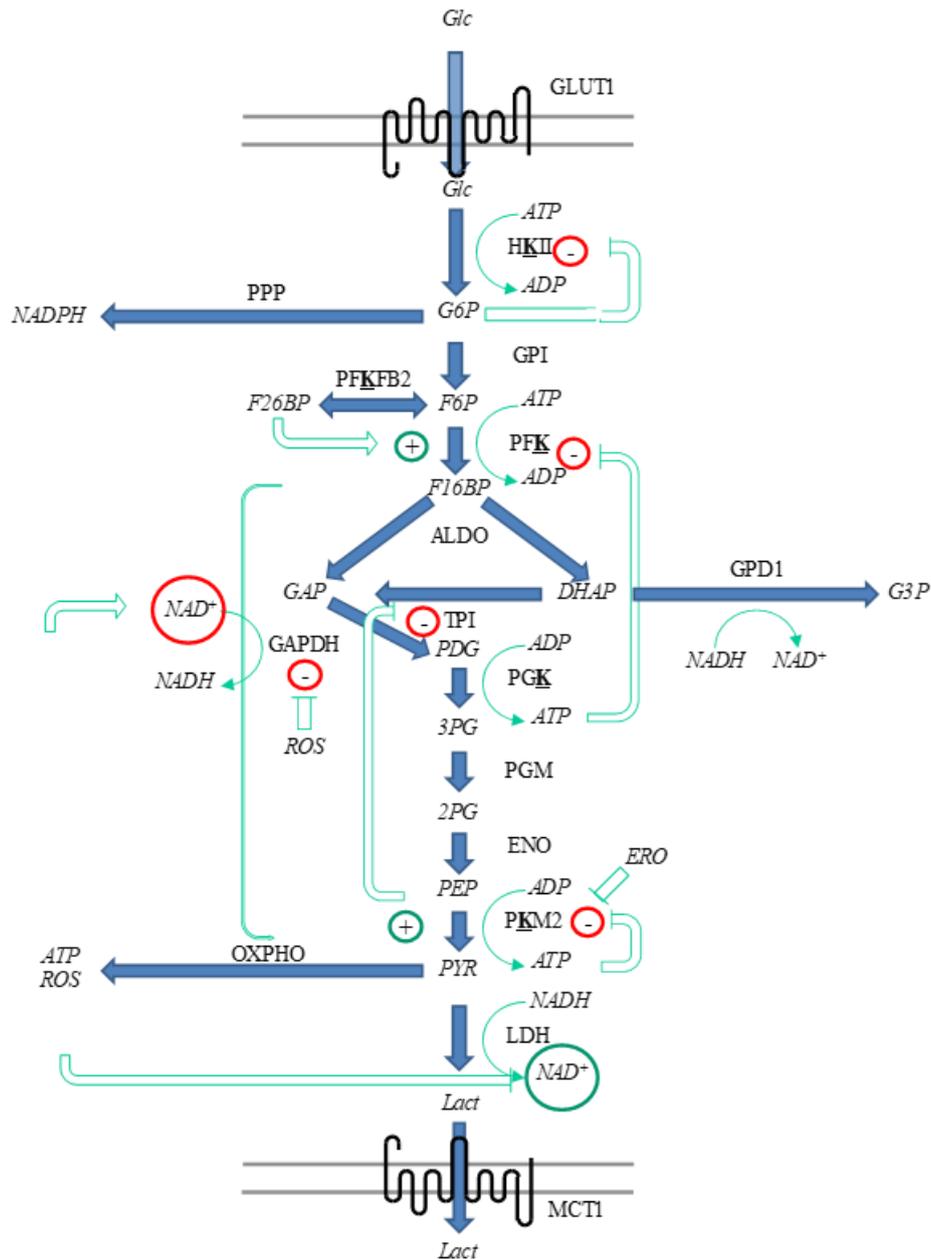


Figure 19 : Glycolyse aérobie. Régulation négative et positive de la glycolyse. Régulation négative au niveau de la triose phosphate isomérase (TPI) (Gruning et al., 2014). Régulation négative au niveau de la pyruvate kinase M2 (PKM2) (Anastasiou et al., 2011). Régulation négative au niveau de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Hildebrandt et al., 2015). Glc : glucose, G6P: glucose 6 phosphate, NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide Phosphate forme réduite, GPI: glucose-6-phosphate isomérase, F6P: Fructose-6-phosphate, PFK: phosphofruktokinase, F16BP: fructose-1,6-biphosphate, ALDO: aldolase, GAP: glycéraldéhyde-3-phosphate, DHAP: dihydroxyacétone phosphate, GAPDH: glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, PDG : 1,3 diphosphoglycérate, 3PG: 3-phosphoglycérate, PHGDH: D-3-phosphoglycérate déshydrogénase, PGM: phosphoglycérate mutase, 2PG: 2-phospho-glycérate, ENO: énoïase, PEP: phosphoénolpyruvate, PKM2: pyruvate kinase isoforme 2, PYR: pyruvate, LDH: lactate déshydrogénase, LACT: lactate, MCT1: *Monocarboxylate transporter 1*, ATP: adénosine triphosphate, ERO: espèces réactives de l'oxygène. (Géraldine Millet-Puel, Institut de la Vision).

décrit l'effet stimulant que la présence de glucose du côté opposé ou *trans* de la membrane exerce sur le transport du côté *cis*. C'est pour cette raison que l'échange accéléré du glucose est aussi appelé *trans*-accélération. Pour mettre en évidence l'échange accéléré, les cellules sont d'abord incubées avec différentes concentrations de glucose, puis le transport de glucose radiomarqué est mesuré pour chaque concentration de glucose extracellulaire. 2) Il a été proposé que l'oligomérisation de GLUT1 soit régulée par des conditions redox (Carruthers et al., 2009). Ces auteurs ont suggéré qu'en l'absence d'agent réducteur, GLUT1 est un tétramère et en présence d'agent réducteur, un dimère. Une étude récente a proposé un modèle basé sur des preuves expérimentales pour laquelle GLUT1 existe sous forme de monomères contenant des résidus de cystéine réduits et avec une vitesse initiale maximale (V_{max}) faible, en équilibre avec des tétramères oxydés avec un V_{max} élevé. Les tétramères sont composés de monomères complexés grâce à des interactions non covalentes, stabilisés par un changement de conformation induit par un pont disulfure intramoléculaire (S- oxydation). La formation de ce pont est stimulé par les réactifs oxydant les groupes thiols (Kuipers et al., 2012; Salie et al., 2012). 3) La réversion de l'inhibition de l'ATP provient du fait que la liaison intracellulaire de l'ATP à GLUT1 favorise les changements globaux de la conformation GLUT1 dans le domaine intracellulaire C-terminal et la grande boucle intra-cytoplasmique qui limite l'absorption du glucose (**Figure 18A**) (Blodgett et al., 2007). Pour les cellules photoréceptrices, grandes consommatrices de glucose, la concentration intracellulaire d'ATP doit être faible pour que l'inhibition par l'ATP du transport du glucose soit inopérante.

6.3. La glycolyse

L'étape suivante est une réaction irréversible : la conversion du glucose en glucose-6-phosphate (G6P), catalysée par l'enzyme hexokinase nécessite l'ATP en tant que donneur d'un groupe phosphoryle à haute énergie (Camacho et al., 2019) (**Figure 19**). La phosphorylation du groupe hydroxyle en C6 du glucose donne un dérivé chargé négativement dont le groupe phosphate sera utilisé pour produire de l'ATP à partir de l'adénosine diphosphate (ADP) plus loin dans la glycolyse (**Figure 20**). La phosphorylation du glucose empêche également le glucose de ressortir de la cellule. La réaction est régulée négativement par son produit, le G6P qui inhibe l'hexokinase de manière allostérique (Gregoriou et al., 1983). Dans les voies métaboliques, les enzymes catalysant des réactions essentiellement irréversibles sont des paliers de contrôle du flux métabolique. Dans la glycolyse, les réactions catalysées par l'hexokinase, la

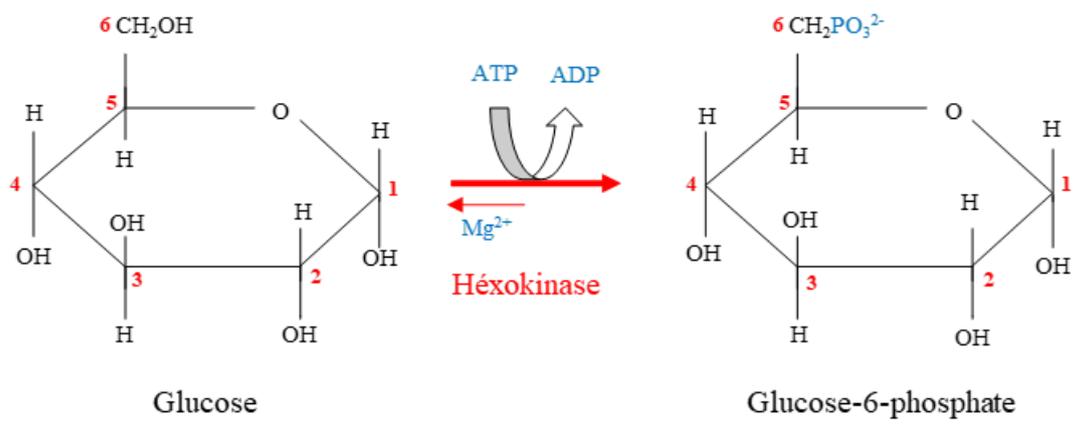


Figure 20 : Première étape de la glycolyse aérobie. Numérotation des carbones issus du glucose. (Géraldine Millet-Puel, Institut de la Vision).

phosphofructokinase et la pyruvate kinase sont quasiment irréversibles ; par conséquent, ces enzymes ont un rôle régulateur de la vitesse à laquelle la glycolyse opère. Leur activité est régulée par la liaison réversible avec des effecteurs allostériques ou par des modifications covalentes post-traductionnelles (Stryer et al., 2003). Alors que l'hexokinase est inhibée par le G6P, la phosphofructokinase (PFK) est inhibée par le phosphoénolpyruvate (PEP), l'ATP et activée par le fructose-2,6-biphosphate (F26BP) et l'AMP. La pyruvate kinase (PK) est inhibée par l'ATP et activée par le fructose-1,6-biphosphate (F16BP). Un autre aspect du contrôle, est le recyclage du nicotinamide adénine dinucléotide sous forme réduite (NADH) produit à partir du NAD⁺, sa forme oxydée. Ce cycle comprend la production de NADH par la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et sa consommation par la lactate déshydrogénase (LDH) dans le cas de la glycolyse aérobie, qui implique le métabolisme du pyruvate en lactate. Il a été proposé que l'effet Warburg soit rendu nécessaire par le fait que le taux de NADH produit par GAPDH ne soit pas entièrement équilibré par la régénération du NAD⁺ par LDH (Dai et al., 2016). Néanmoins, à ce jour, et malgré de nombreuses études, l'avantage éventuel de la glycolyse aérobie est toujours un sujet ardemment débattu (Rigoulet et al., 2020). Comme les cellules cancéreuses, les photorécepteurs expriment des niveaux prépondérants de l'isoforme M2 de la pyruvate kinase (PKM2) et de l'isoforme A de LDH (LDHA) (Chinchore et al., 2017; Rajala, 2020). Ces isoformes sont généralement associées à la glycolyse aérobie par les cellules cancéreuses et par d'autres types cellulaires en prolifération. La plupart des cellules cancéreuses métabolisent de grandes quantités de glucose sécrété ensuite sous forme de lactate, même en présence d'oxygène. Ce métabolisme particulier est apparu à l'origine comme un gaspillage étant donné la faible production d'ATP par la glycolyse par rapport à la phosphorylation oxydative. La glycolyse aérobie produit principalement des métabolites glucidiques essentiels à la prolifération cellulaire et est compensé par une augmentation spectaculaire de l'absorption du glucose par les cellules cancéreuses. Ce phénomène est utilisé en clinique pour visualiser les tumeurs par tomographie par émission du positons 2-fluoro-6-désoxyglucose. Des résultats récents indiquent que pour les cellules cancéreuses, la redirection du glucose vers la glycolyse aérobie n'est pas une conséquence de l'activation de proto-oncogènes ou de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur mais la première étape d'une série d'étapes dans la tumorigenèse. Ceci est illustré par le fait que l'inactivation de la protéine SIRT6, une désacétylase dépendante du NAD, entraîne la transformation cellulaire en redirigeant le métabolisme énergétique vers la glycolyse aérobie indépendamment de tout autre événement génique (Lyssiotis and Cantley, 2012). La désacétylation de l'histone H3 par SIRT6 limite l'expression des gènes codant pour les enzymes glycolytiques. La suppression de SIRT6

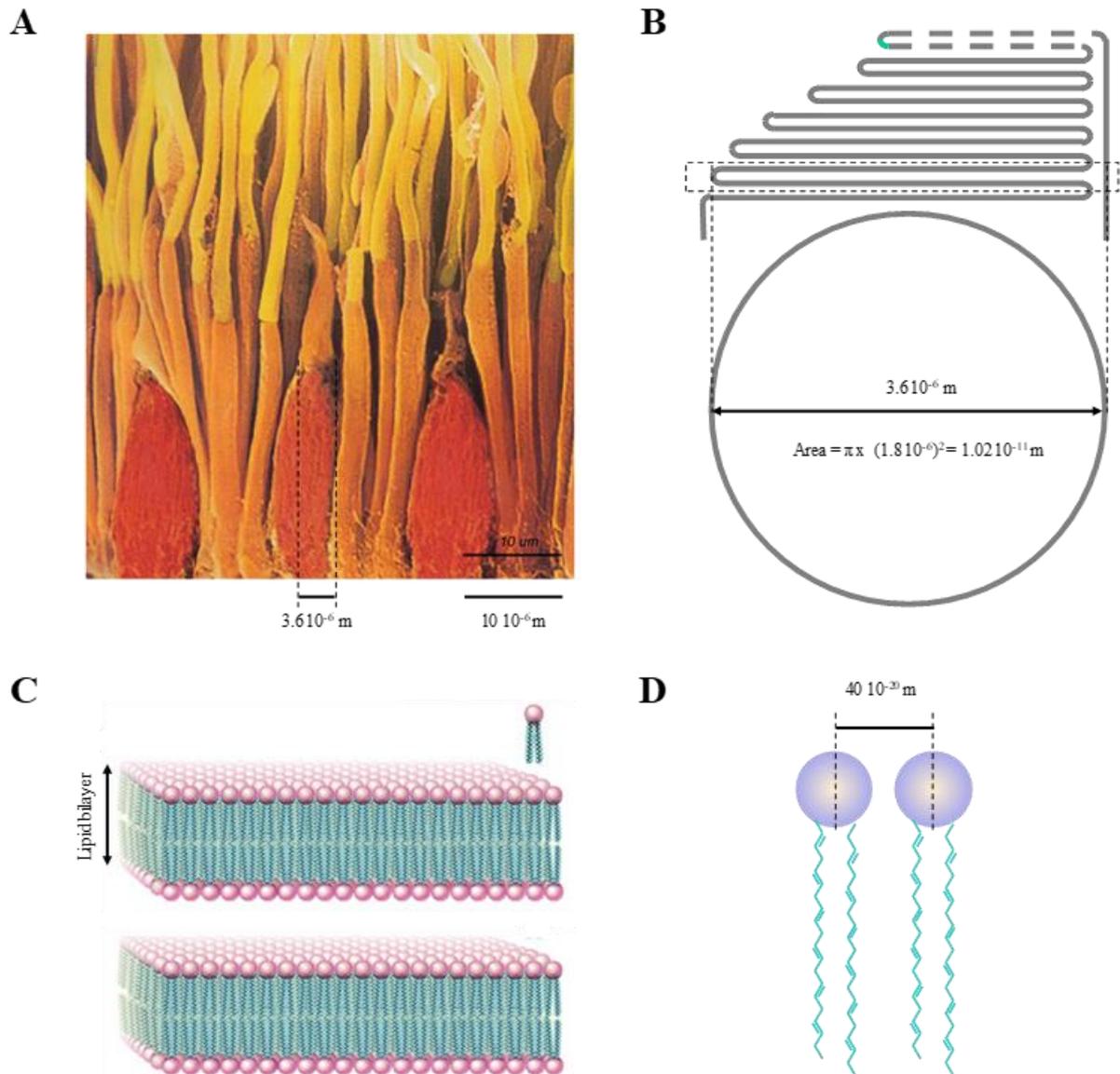


Figure 21 : Estimation du nombre de molécules de glycérophospholipide dans le disque le plus proximal des segments externes des cônes. A. Microscopie électronique à balayage d'une rétine de primate. **B.** Estimation de l'aire d'un disque de la partie la plus proximale du segment externe d'un photorécepteur à cône. **C.** La bicouche lipidique d'un disque du segment externe d'un cône. **D.** L'encombrement relatif des têtes des glycérophospholipides.

augmente les niveaux d'histone H3 acétylée, ce qui entraîne une augmentation de l'expression de gènes de la glycolyse aérobie. Cependant, la glycolyse aérobie n'est pas spécifique aux cellules cancéreuses. Dans le cas des cellules rétinienne ne se divisant pas, et plus précisément pour les photorécepteurs, la glycolyse aérobie fournit des métabolites glucidiques pour le renouvellement de leurs segments externes (Chinchore et al., 2017; Leveillard, 2015). Le flux de carbone est détourné de la glycolyse aérobie à un moment précis de la chaîne de réactions métaboliques et les six carbones du glucose ne sont donc pas entièrement métabolisés en 2 molécules de lactate (3 carbones) de sorte qu'une proportion aujourd'hui inconnue d'atomes de carbone est transférée du glucose aux phospholipides, via les triglycérides, pour former les segments externes des photorécepteurs (Camacho et al., 2019). Pour des raisons qui ne sont que partiellement connues, la glycolyse aérobie favorise la diversification à mi-parcours de la réaction glycolytique à partir du glucose au niveau du dihydroxyacétone phosphate (DHAP). Ce métabolite à 3 carbones est produit par l'aldolase (ALDO) par scission du F16BP contenant 6 carbones, (**Figure 19**). Le deuxième métabolite à 3 carbones produit par l'aldolase est le glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP). La triose phosphate isomérase (TPI) convertit très efficacement la DHAP en GAP qui alimente la glycolyse en aval, mais une certaine proportion de DHAP est convertie en glycérol-3-phosphate (G3P) par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH) dans des conditions qui restent à préciser. Le GAP est converti en lactate et en CO₂ par la glycolyse aérobie et la phosphorylation oxydative (OXPHO), tandis qu'une partie de la DHAP est utilisée pour produire du G3P, le précurseur du squelette glycérol des phospholipides synthétisés par la voie Kennedy qui lie le G3P aux acides gras. Ceci nous a permis d'estimer le nombre de molécules de glycérophospholipide dans le disque le plus proximal des segments externes des cônes et donc que le nombre de molécules de glucose requis est de $4.9 \cdot 10^9$ (**Figure 21**).

6.4. Le rôle des acides gras

Il est largement admis que chez les mammifères, les acides gras insaturés ne sont pas synthétisés dans la rétine mais proviennent de l'alimentation et transmis par la circulation sanguine (SanGiovanni and Chew, 2005). Les gènes codant des enzymes clés pour la biosynthèse *de novo* des acides gras insaturés comme le précurseur de l'acide docosahexaénoïque : DHA; l'acide α -linoléique, sont absents dans les génomes des mammifères, qui sont dépourvus de gènes codant des enzymes portant une activité de désaturation delta-12 et delta-15.

Dans le réticulum endoplasmique, ces acides gras essentiels alimentaires, tels que α -linoléique et autres précurseurs C18 sont désaturés ($CC > C = C$) par des désaturases d'acides gras (FADS1-3) et allongés (ajout de 2 unités carbonées) par des élongases d'acides gras à longue chaîne (ELOVL2 et ELOVL5) pour produire du DHA ($C_3H_6O_3$) et d'autres AGPI, Acides Gras poly-insaturés (Guillou et al., 2010). L'enzyme FADS2, liée à la membrane, est localisée dans le réticulum endoplasmique où elle catalyse la désaturation initiale d'acides gras C18 de l'EPR et des cellules photoréceptrices (Lee et al., 2016; Simon et al., 2016; Wang and Anderson, 1993). En réponse au stress oxydant ou pendant la phagocytose du segment externe des photorécepteurs, les cellules de l'EPR convertissent le DHA en neuroprotectine D1 (NPD1), une molécule d'acide gras qui inhibe l'apoptose (Bazan et al., 2010; Marcheselli et al., 2010).

Les photorécepteurs expriment également une élongase spécifique, ELOV4, qui est responsable de la synthèse d'AGPI à très longue chaîne (AGPI-TLC) (C28 à C40, le nombre de carbonées) qui sont enrichis dans la rétine et le sperme (McMahon and Kedziarski, 2010). L'existence de mutations non-sens dans le gène *ELOVL4* déclenchant une forme juvénile et autosomique dominante de dégénérescence maculaire, la dystrophie maculaire de type Stargardt (STGD3), caractérisée par une perte de vision centrale et périphérique à un âge précoce (deuxième décennie de vie), a initié l'intérêt pour les AGPI-TLC dans la rétine (Zhang et al., 2001b). La protéine mutante a un effet dominant négatif sur la localisation d'ELOVL4 mais également sur son activité enzymatique (Logan et al., 2013). Les AGPI-TLC rétiens sont incorporés à la phosphatidylcholine dans les membranes des segments externes des photorécepteurs où ils participent à la courbure du disque et à la fluidité de la membrane des disques (Agbaga et al., 2008). De manière surprenante, la suppression du gène *Elov14* dans les cônes chez la souris n'affecte pas leur fonction, ce qui suggère que la protéine mutante forme des agrégats toxiques responsables des symptômes cliniques ; une transmission dominante liée à un gain de fonction (Bennett et al., 2014a; Kuny et al., 2015). La fonction des AGPI-TLC dans les photorécepteurs est encore controversée mais il semble probable qu'ils jouent un rôle supplémentaire dans l'organisation de la connectivité synaptique entre les photorécepteurs et les interneurons, les cellules bipolaires (Bennett et al., 2014b) plus récemment, il a été démontré que les AGPI-TLC sont convertis enzymatiquement en composés « élovanoïdes » qui semblent fournir des signaux paracrines qui favorisent la survie des

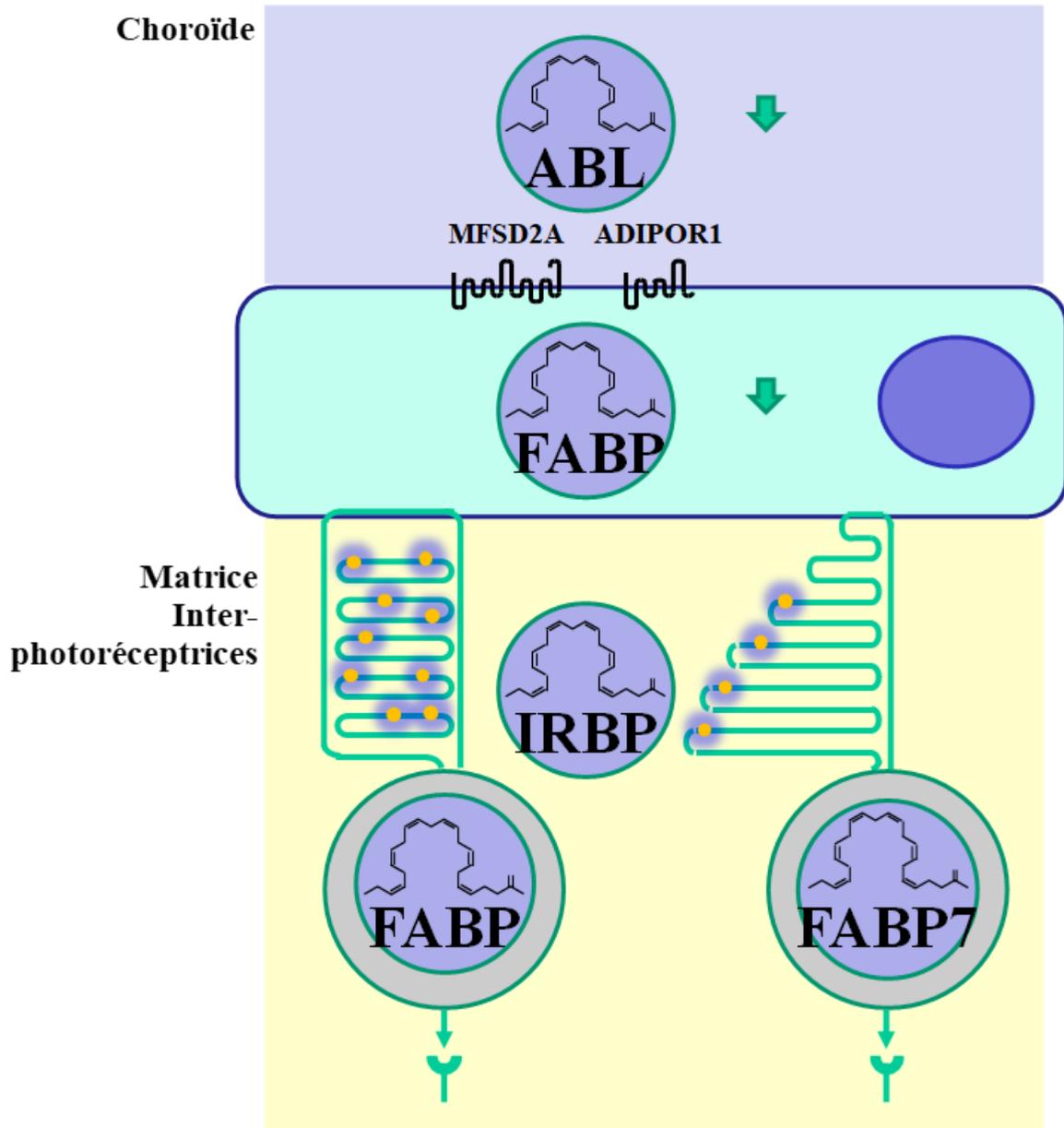


Figure 22 : Transport des acides gras essentiels de la circulation sanguine vers les photorécepteurs. EPR : épithélium pigmenté rétinien, ABL : albumine, ADIPOR1 : *adiponectin receptor 1*, MFSD2A : *fatty acid transporter*, FABP : *fatty acid-binding protein* and IRBP : *interphotoreceptor retinoid binding protein*.

photorécepteurs et des neurones (Deak et al., 2019). Les acides gras essentiels, parmi lesquels le DHA ($C_3H_6O_3$) et l'acide α -linoléique ($C_{18}H_{30}O_2$) sont des molécules hydrophobes transportées par l'albumine sérique du foie vers la face basale de l'EPR où elles sont transférées aux photorécepteurs du côté apical (**Figure 22**). Deux molécules distinctes sont impliquées dans le transport du DHA à travers le RPE, la protéine MFSD2A et le récepteur 1 de l'adiponectine (ADIPOR1) (Nguyen et al., 2014; Rice et al., 2015; Wong et al., 2016). MFSD2A est un transporteur typique à 12 domaines transmembranaires (Cater et al., 2021), tandis qu'ADIPOR1 est un récepteur atypique à 7 domaines transmembranaires de l'adiponectine, une hormone essentielle sécrétée par les adipocytes qui régule le métabolisme du glucose et des acides gras. L'adiponectine circule à des niveaux élevés dans le plasma humain, entre 5 et 30 mg/ml, où elle représente 0,01% des protéines plasmatiques totales (Diez and Iglesias, 2003). Les mécanismes qui lient les deux protéines de transport sont inconnus mais il est remarquable que le DHA augmente la sécrétion d'adiponectine suggérant ainsi que l'adiponectine, par son interaction avec son récepteur ADIPOR1, régule le transport du DHA de la circulation vers l'EPR par le transporteur MFSD2A (Cater et al., 2021; DeClercq et al., 2015). Les segments externes des photorécepteurs sont raccourcis et désorganisés chez la souris *Mfsd2a*^{-/-}, et chez la souris *Adipor1*^{-/-} les photorécepteurs dégénèrent (Osada et al., 2021). Le transport des acides gras insolubles de la surface basale vers la surface apicale de l'EPR implique certainement des interactions transitoires avec les protéines de liaison aux acides gras (PLAG) pour permettre la translocation intracellulaire de molécules hydrophobes dans le cytosol aqueux et hydrophile. On ne sait actuellement pas laquelle des 9 protéines PLAG transporte les acides gras à travers l'EPR (Smathers and Petersen, 2011). Les acides gras essentiels, sous la forme de DHA, sont récupérés à partir des membranes des disques apicaux des photorécepteurs et recyclés vers le segment interne des photorécepteurs, puis réincorporés dans les phospholipides des segments externes en renouvellement. Les acides gras recyclés sont transférés de l'EPR vers les photorécepteurs à travers la matrice inter-photorécepteur (MIP), l'espace extracellulaire entre les segments externes des photorécepteurs et l'EPR, et ceci en l'absence d'albumine. La protéine de liaison des rétinoïdes RBP est la protéine la plus abondante dans la MIP et la seule liant les acides gras (Gonzalez-Fernandez, 2003; Gonzalez-Fernandez and Ghosh, 2008). Les chercheurs pensaient originellement qu'IRBP était le transporteur des rétinoïdes (11-*cis*-rétinal et tout-*trans*-rétinol) entre l'EPR et les photorécepteurs, en plus de son rôle dans le cycle de la vitamine A (Jacobson et al., 2015a), mais l'étude du phénotype de la souris *Irbp*^{-/-} a remis en question cette hypothèse (Arno et al., 2015). Le phénotype rétinien de la souris *Irbp*^{-/-} ressemble

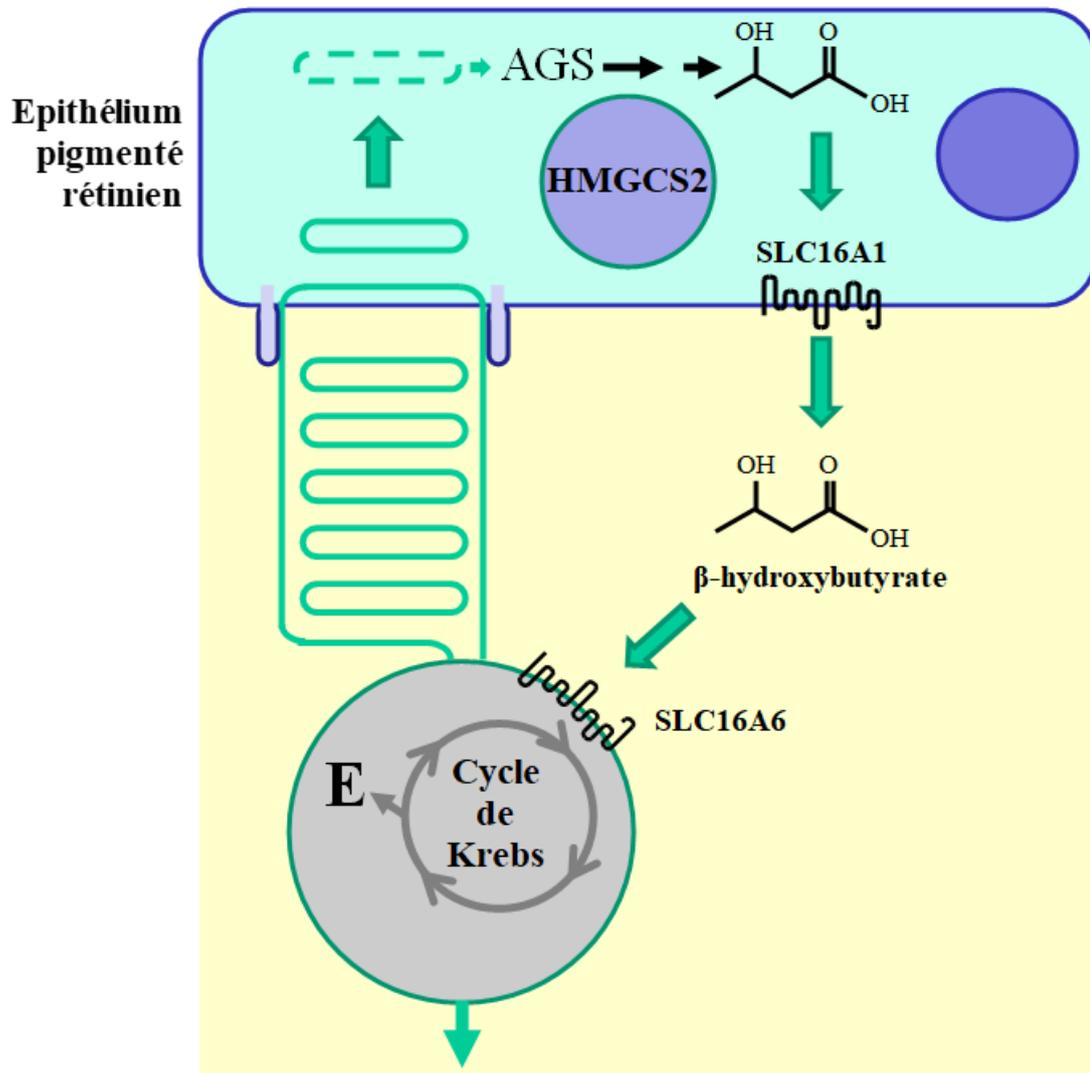


Figure 23 : Recyclage des acides gras saturés par les photorécepteurs. EPR : épithélium pigmenté rétinien, AGS : acide gras saturés, HMGCS2 : hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase mitochondriale, SLC16A1 : monocarboxylate transporter isoforme 1, E : acide glutamique.

à celui des patients porteurs de mutations homozygotes non-sens dans le gène *RBP3* codant l'IRBP. L'absence d'IRBP conduit donc certainement à déficit de transport des acides gras entre les cellules l'EPR et les photorécepteurs. Cela sera clarifié par de futures études. Comme l'expression de MFSD2A par les photorécepteurs n'a pas été publiée, nous ne savons pas actuellement comment les acides gras essentiels sont absorbés par les photorécepteurs, mais des expériences de radio-marquage pulsé ont démontré que cela se produit effectivement, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Deturco et al., 1994). Afin d'être incorporés dans les segments externes des photorécepteurs en cours de renouvellement, les queues d'acide gras ou aliphatique non polaires faisant partie du phospholipide amphiphile, doivent être liées à une tête polaire dérivée du glycérol-3-phosphate pour ce qui concerne les glycérophospholipides (Berg et al., 2002). Cela se produit à la surface du réticulum endoplasmique dans le segment interne des photorécepteurs. Le transport intracellulaire des acides gras s'effectue par la liaison aux protéines PLAG, dont *fatty acid binding protein 7* (FABP7) qui transporte les acides gras dans les photorécepteurs à cônes de la rétine de la souris (Saino-Saito et al., 2009). De manière assez intéressante, une fraction encore inconnue des acides gras saturés des segments externes des photorécepteurs est recyclée pour fournir de l'énergie au lieu de composants structurels. Ces acides gras saturés sont métabolisés dans les phagosomes des cellules l'EPR par l'*HMG-coenzyme A (CoA)-synthase 2*, mitochondriale (HMGCS2) dont le niveau d'expression est extrêmement élevé dans l'EPR. HMGCS2 les métabolise en dérivés cétoniques (C=O), qui sont alors transformés enzymatiquement en β -hydroxybutyrate par la voie de la β -oxydation des acides gras (Adijanto et al., 2014) (**Figure 23**). Le β -hydroxybutyrate est ensuite excrété par l'isoforme 1 du transporteur de monocarboxylates (MCT1, SLC16A1) dans le compartiment apical, vers les photorécepteurs qui l'internalisent grâce à isoforme 7 du transporteur de monocarboxylates (MCT7, SLC16A6). Le β -hydroxybutyrate est oxydé par le cycle de de Krebs pour produire de l'énergie (ATP) et du glutamate, un neurotransmetteur impliqué dans la transmission verticale du signal des photorécepteurs aux cellules bipolaires (tom Dieck and Brandstatter, 2006). La contribution de ce cycle à l'enrichissement des segments externes des photorécepteurs en AGPI n'a pas été étudiée.

6.5. La synthèse des phospholipides

Pour être incorporés aux phospholipides, les acides gras sont activés sous forme d'intermédiaires acyl-CoA et ensuite estérifiés avec du glycérol-3-phosphate, issu de la

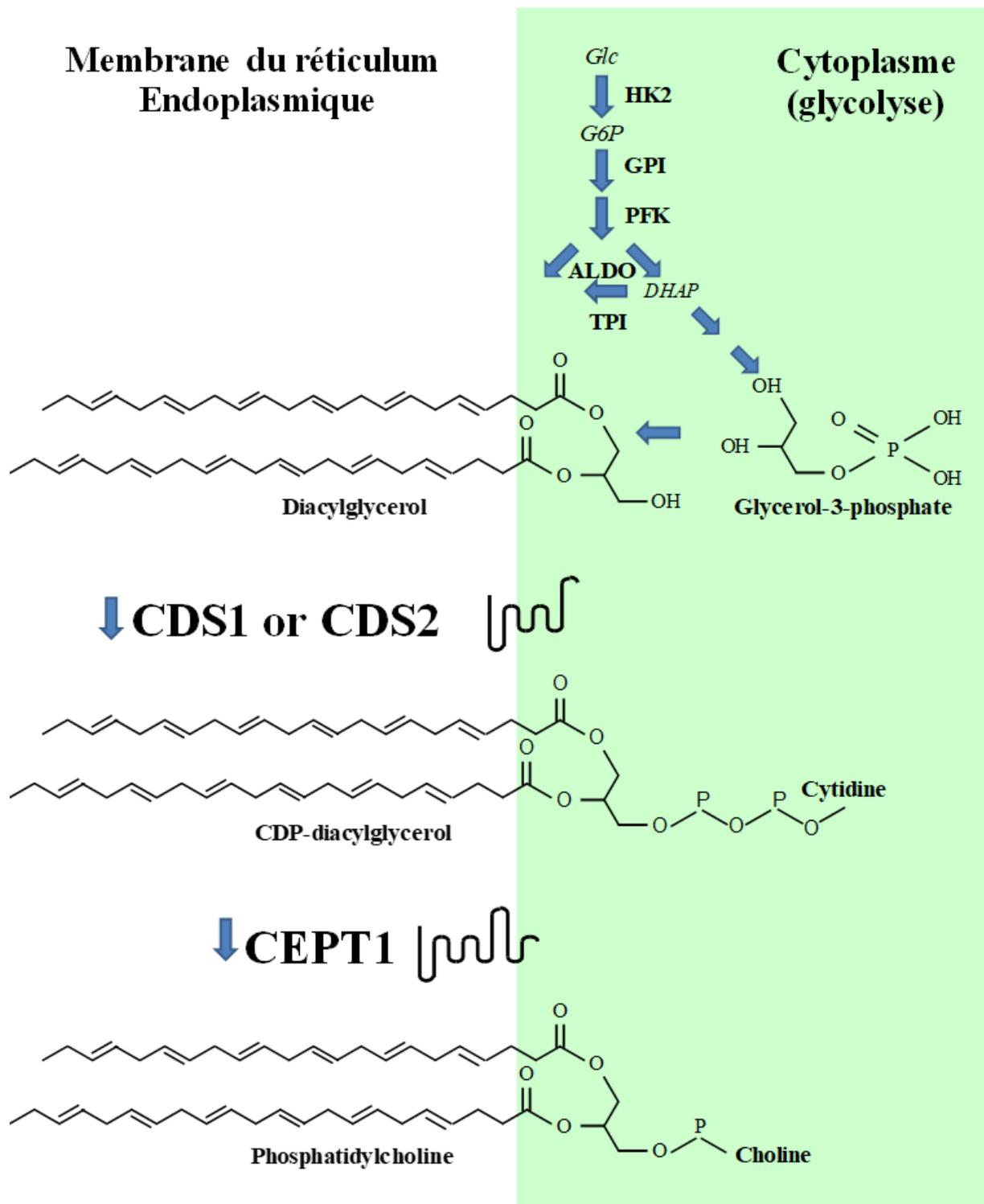


Figure 24 : Renouvellement des phospholipides par la voie Kennedy. Glc: glucose, G6P: glucose-6-phosphate, DHAP, dihydroxyacétone phosphate, HK: hexokinase, GPI: glucose-6-phosphate isomérase, ALDO: aldolase, TPI triose phosphate isomérase, CDS1 or 2: phosphatidate cytidyltransférases 1 or 2, CDP-: cytidine diphosphate et CEPT1: choline/éthanolamine phosphotransférase

glycolyse, par la voie de Kennedy (Chauhan et al., 2016). Les phospholipides sont composés de deux acides gras, une unité glycérol et un groupe phosphate. Le glycérol-3-phosphate (3 carbones) est synthétisé à partir du DHAP qui produit à partir d'une molécule de F16BP (6 carbones) par l'aldolase A une molécule de glycéraldéhyde-3-phosphate (3 Carbones) et une molécule de DHAP (3 carbones) (**Figure 24**). L'acide phosphatidique est synthétisé en plusieurs étapes à partir du glycérol-3-phosphate et de l'acyl-CoA gras pour produire du diacylglycérol, tandis que son activation par les CDP-diacylglycérol synthases (CDS1 ou CDS2) situées dans le réticulum endoplasmique, grâce à l'hydrolyse du CTP produit la CDP-choline ou la CDP-éthanolamine. Ces molécules solubles en milieu aqueux sont associées au diacylglycérol membranaire produisent ainsi la phosphatidylcholine ou la phosphatidyléthanolamine après hydrolyse du CDP en CMP

La dernière étape de la synthèse des phospholipides se déroule sur la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique où se trouve l'enzyme choline/éthanolamine phosphotransférase (CEPT1) qui est liée à la membrane. Ceci produit une synthèse asymétrique des phospholipides vers la face cytoplasmique de la bicouche lipidique du réticulum endoplasmique. Les phospholipides sont ensuite redistribués uniformément dans les deux couches par l'action d'une protéine flippases, non encore identifiée. Fait intéressant, dans la rétine, les opsines sont des flippase phospholipidiques qui distribuent les phospholipides entre membranes des disques des photorécepteurs, une activité distincte de leur fonction de détection de la lumière (Goren et al., 2014). Une seule molécule de rhodopsine fait basculer plus de 104 phospholipides par seconde à travers la membrane lipidique. Il est possible qu'une protéine à sept domaines transmembranaires encore non identifiée couplée à la protéine G fasse basculer les phospholipides entre les deux couches du réticulum endoplasmique. Ces membranes ont des propriétés physiques optimales pour le repliement des protéines avec plusieurs domaines transmembranaires, comme c'est le cas pour les opsines lors de leur traduction par les ribosomes au niveau du réticulum endoplasmique rugueux. Les phospholipides et les protéines nouvellement synthétisées se déplacent ensemble à travers l'appareil *cis*-Golgi (qui dérive directement du réticulum endoplasmique) vers l'appareil *trans*-Golgi et vers les vésicules de transport post-Golgi (Drin, 2014).

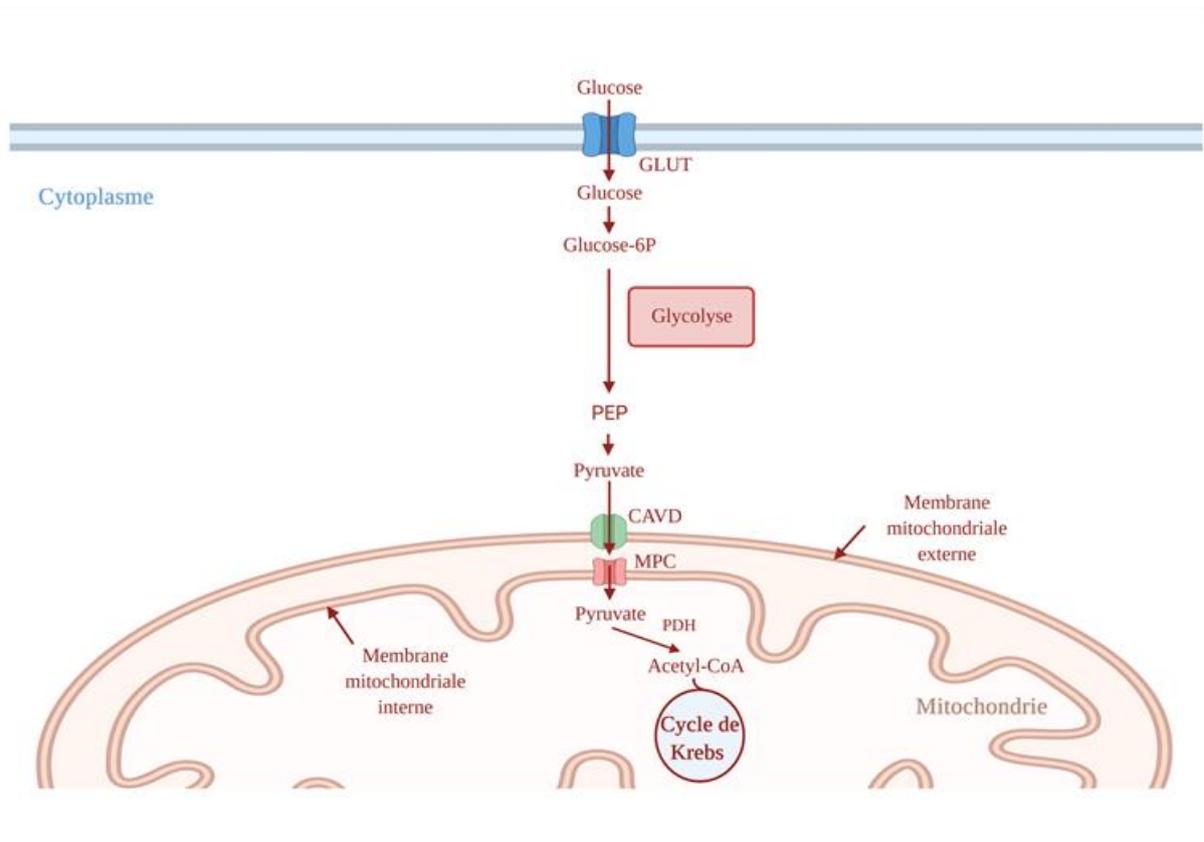


Figure 25 : Translocation du pyruvate dans la mitochondrie. L'importation de pyruvate nécessite un canal anionique voltage-dépendant (CAVD) pour traverser la membrane mitochondriale externe (MME) et le transporteur de pyruvate mitochondrial (MPC) pour traverser la membrane mitochondriale interne (MMI). PEP : phosphoénolpyruvate. PDH : pyruvate déshydrogénase. Adapté de (Zangari et al., 2020)

6.6. L'aiguillage du pyruvate

Revenons maintenant à la glycolyse aérobie. Dans le cytosol, le pyruvate est produit par la glycolyse, qui génère deux molécules d'adénosine triphosphate (ATP) et deux molécules réduites de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) par molécule de glucose. Le pyruvate peut être converti en lactate par la lactate déshydrogénase A (LDHA) ou peut être importé dans les mitochondries pour être oxydé en acétyl coenzymeA (acétyl-CoA) par le complexe pyruvate déshydrogénase (PDC) qui alimente ensuite le cycle de Krebs (phosphorylation oxydative). L'importation de pyruvate nécessite le passage à travers les deux membranes mitochondriales, la membrane externe et la mitochondriale interne (**Figure 25**) (Zangari et al., 2020). Le pyruvate traverse la membrane mitochondriale externe pour atteindre l'espace intermembranaire, probablement à travers le grand canal anionique voltage-dépendant (CAVD), relativement non spécifique. Il est ensuite transporté avec un proton à l'intérieur de la mitochondrie par le transporteur de pyruvate mitochondrial (MPC). En 1971, la première l'existence d'un transporteur spécifique pour le pyruvate a fait l'objet d'un débat animé. L'identité du complexe MPC n'a été révélée qu'en 2012 (Schell and Rutter, 2013). En tant que seul point d'entrée du pyruvate dans la matrice mitochondriale, le MPC joue un rôle crucial dans la coordination des activités glycolytiques et mitochondriales. Le transporteur du pyruvate mitochondrial importe le pyruvate avec un proton (H^+) à travers la membrane interne mitochondriale (Taylor, 2017). Dans la plupart des cellules de mammifères, ce transporteur est composé d'un hétéromère de MPC1 et MPC2. Au niveau le plus simpliste pour le cas des photorécepteurs, l'effet Warburg pourrait être décrit comme une perte ou une diminution de la fonction du MPC. Néanmoins, l'inhibition du transporteur du pyruvate mitochondrial par le Zaprinas entraîne une accumulation d'aspartate au détriment du glutamate dans la rétine, ce qui démontre que le maintien des niveaux normaux d'acides aminés dans la rétine repose sur le transport du pyruvate dans les mitochondries (Du et al., 2013). Une délétion spécifique dans la rétine de *Mpc1* altère la fonction visuelle, diminue la viabilité des photorécepteurs et perturbe la structure des photorécepteurs. Elle augmente aussi la consommation de corps cétoniques produits par la β -oxydation des acides gras (Grenell et al., 2019). L'une des caractéristiques du métabolisme cellulaire est sa plasticité, qui résulte de l'inter-connectivité entre différentes voies métaboliques. La plasticité garantit que, lorsqu'une voie est interrompue de manière transitoire ou permanente en raison du manque d'un métabolite essentiel ou d'une enzyme ou d'un transporteur clé, la cellule est capable de passer à une voie alternative pour compenser le défaut, ce qui peut être mis à profit pour la thérapie des dégénérescences rétiniennes héréditaires

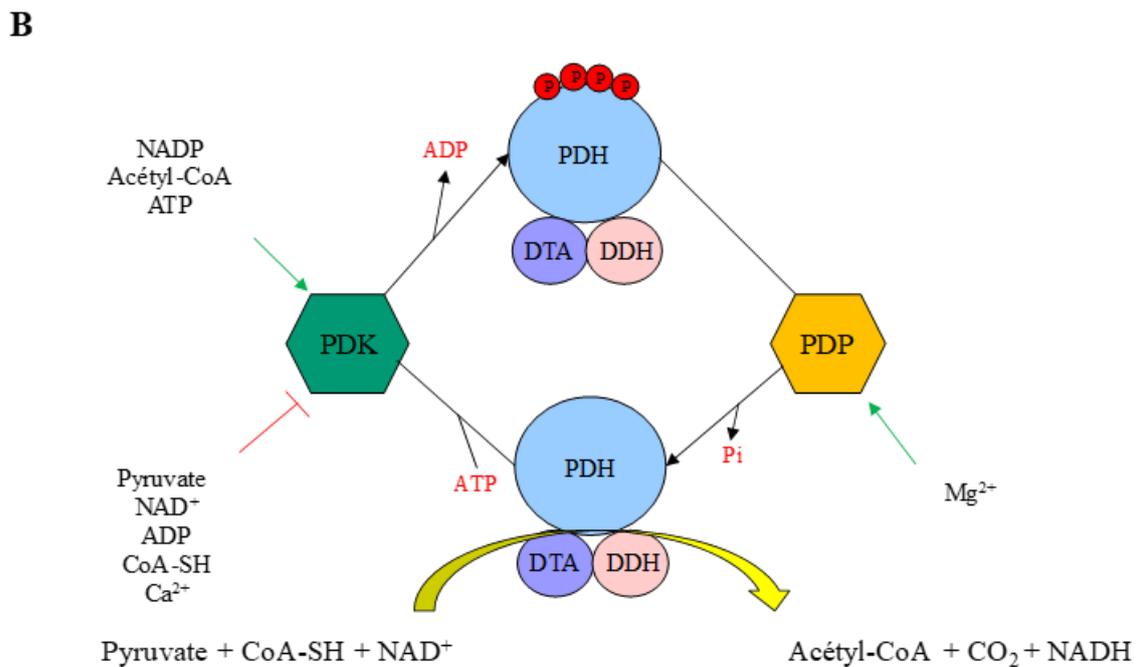
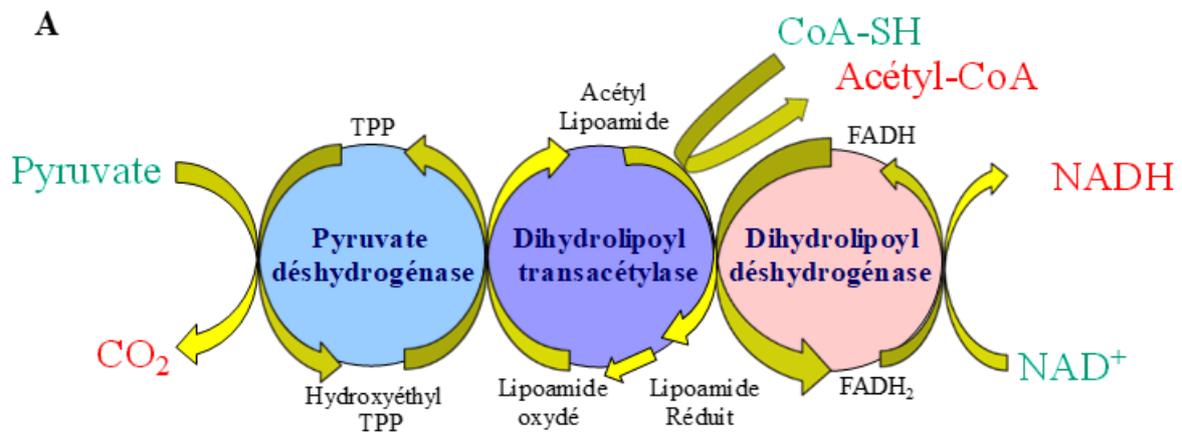


Figure 26 : Complexe pyruvate déshydrogénase et sa régulation. A. Le complexe pyruvate déshydrogénase (PHC). **B.** Régulation du complexe pyruvate déshydrogénase. PDH : pyruvate déshydrogénase, PDK : pyruvate déshydrogénase kinase, PDP : pyruvate déshydrogénase phosphatase, DTA : dihydrolipoïl transacétylase, DDH : dihydrolipoïl déshydrogénase.

(Xue et al., 2021). L'acétylation de MPC1 sur les lysines K⁴⁵ et K⁴⁶ inhibe son activité (Liang et al., 2015). La protéine sirtuine 3 (SIRT3), une désacétylase NAD-dépendante, présente dans les mitochondries, catalyse la désacétylation de MPC1 ce qui restaure sa fonction (Ahn et al., 2008). La nicotinamide phosphoribosyltransférase (NAMPT), l'enzyme limitante de la voie de biosynthèse du NAD⁺ est essentielle pour la vision chez la souris (Lin et al., 2016) et les mutations du gène *NMNAT1* (nicotinamide nucleotide adenylyltransferase) provoquent chez l'homme une forme sévère de dégénérescence rétinienne héréditaire, l'amaurose congénitale de Leber (Koenekoop et al., 2012; Perrault et al., 2012). L'inactivation d'un autre membre de la famille des sirtuines, SIRT6, augmente le métabolisme global et favorise la survie des photorécepteurs à bâtonnets et préserve leurs segments externes (Zhang et al., 2016). L'activité métabolique des sirtuines dépend de la concentration cellulaire de NAD⁺ qui résulte de la dynamique de sa production par la LDHA, de l'oxydation du NADH et de sa réduction par la GAPDH en NADH. Il est théoriquement concevable que la glycolyse aérobie favorise la fonction des sirtuines (Vaupel and Multhoff, 2021).

Une fois le pyruvate transporté dans la matrice mitochondriale interne, celui-ci est métabolisé en acétyl-CoA par le complexe pyruvate déshydrogénase (PDH). Le PDH est composé de trois enzymes et de cinq coenzymes situées dans la membrane mitochondriale interne (**Figure 26A**). Les actions successives de la pyruvate déshydrogénase, de la dihydrolipoyl transacétylase et de la dihydrolipoyl déshydrogénase catalysent la réaction : $\text{pyruvate} + \text{NAD}^+ + \text{CoA} \rightarrow \text{acétyl-CoA} + \text{NADH} + \text{CO}_2 + \text{H}^+$. L'activité PDC est régulée principalement par des modifications post-traductionnelles apportées à ses sous-unités, y compris la phosphorylation et la déphosphorylation de la sous-unité E1 α de la pyruvate déshydrogénase (PDH). Ces phosphorylations sont régulées par l'antagonisme des kinases pyruvate déshydrogénase kinase (PDK1-4) et des phosphatases pyruvate déshydrogénase phosphatase (PDP1-2) (Park et al., 2018). La phosphorylation de PDH, stimulé par l'ATP, inhibe l'activité enzymatique du complexe PDC, tandis que la déphosphorylation de la PDH, stimulé par l'insuline, active le complexe PDC (**Figure 26B**). Le mutant aveugle *noir* du poisson zèbre porte une mutation dans la sous-unité E1 β du complexe PDC (Maurer et al., 2010).

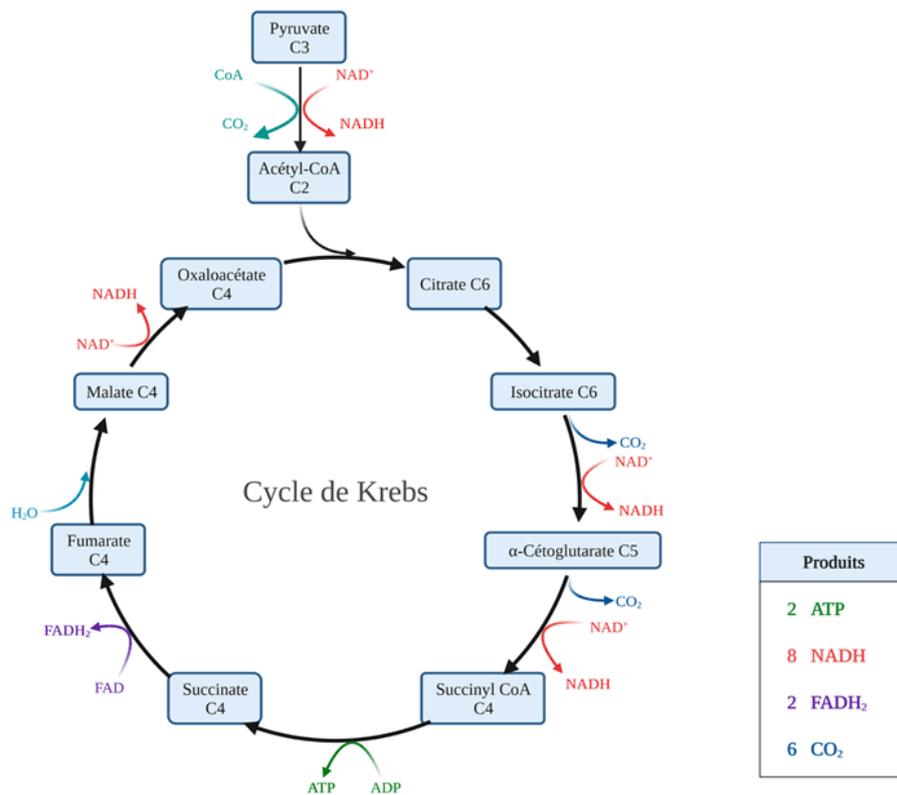


Figure 27 : Le Cycle de Krebs. ATP : adénosine triphosphate, ADP : adénosine diphosphate, NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide, FADH₂ : flavine adénine dinucléotide forme réduite, CO₂ : Dioxyde de carbone.

6.7. Le cycle de Krebs

L'exploitation aérobie du glucose commence par l'oxydation complète des dérivés du glucose en dioxyde de carbone (CO_2), cette oxydation s'effectue au cours du cycle de l'acide citrique dans la mitochondrie, ensemble de réactions connu aussi sous le nom de cycle de Krebs (prix Nobel, 1953). Le cycle de l'acide citrique est la voie commune terminale d'oxydation des molécules énergétiques : acides aminés, acides gras, et glucides. La plupart de ces dernières entrent dans le cycle sous forme d'acétyl coenzyme A. Le cycle est également une importante source de précurseurs de nombreuses molécules telles que les acides aminés, les bases nucléotidiques (**Figure 32A**) et le cholestérol. Le cycle de Krebs participe dans la transformation des molécules énergétiques en ATP, mais la fonction du cycle est de récolter des électrons de haute énergie à partir de molécules énergétiques.

Le cycle de Krebs commence par la condensation de l'oxaloacétate (C4) et de l'acétyl CoA (C2) pour donner du citrate (C6) qui s'isomérisé en isocitrate (C6). La décarboxylation oxydative de cet intermédiaire donne l' α -cétoglutarate (C5). La deuxième molécule de dioxyde de carbone vient de la réaction suivante dans laquelle l' α -cétoglutarate est décarboxylé en condition oxydative en succinyl CoA (C4). La liaison thioester du succinyl CoA est clivée par l'orthophosphate pour donner le succinate et simultanément un composé à haut potentiel de transfert de groupe phosphoryle ($-\text{PO}_3^{2-}$) est créé sous forme de GTP. Le succinate est oxydé en fumarate (C4) qui est ensuite hydraté pour former le malate (C4). Enfin, le malate est oxydé pour régénérer l'oxaloacétate (C4) (**Figure 27**). Ainsi, deux atomes de carbone de l'acétyl CoA entrent dans le cycle et deux atomes de carbone quittent le cycle sous forme de CO_2 dans les décarboxylations successives catalysées par l'isocitrate déshydrogénase et l' α -cétoglutarate déshydrogénase. Dans les quatre réactions d'oxydation-réductions du cycle, trois paires d'électrons sont transférées au NAD^+ et une paire au flavine adénine dinucléotide (FAD). Ces transporteurs d'électrons réduits sont ensuite oxydés par la chaîne de transport d'électrons pour créer environ 9 molécules d'ATP. De plus, une molécule d'un composé ayant un haut potentiel de transfert de groupe phosphoryle est directement formée dans le cycle de l'acide citrique. Ainsi, un total de dix molécules de composés possédant un haut potentiel de transfert de groupe phosphoryle sont créées pour chaque fragment di-carboné complètement oxydé en H_2O et en CO_2 .

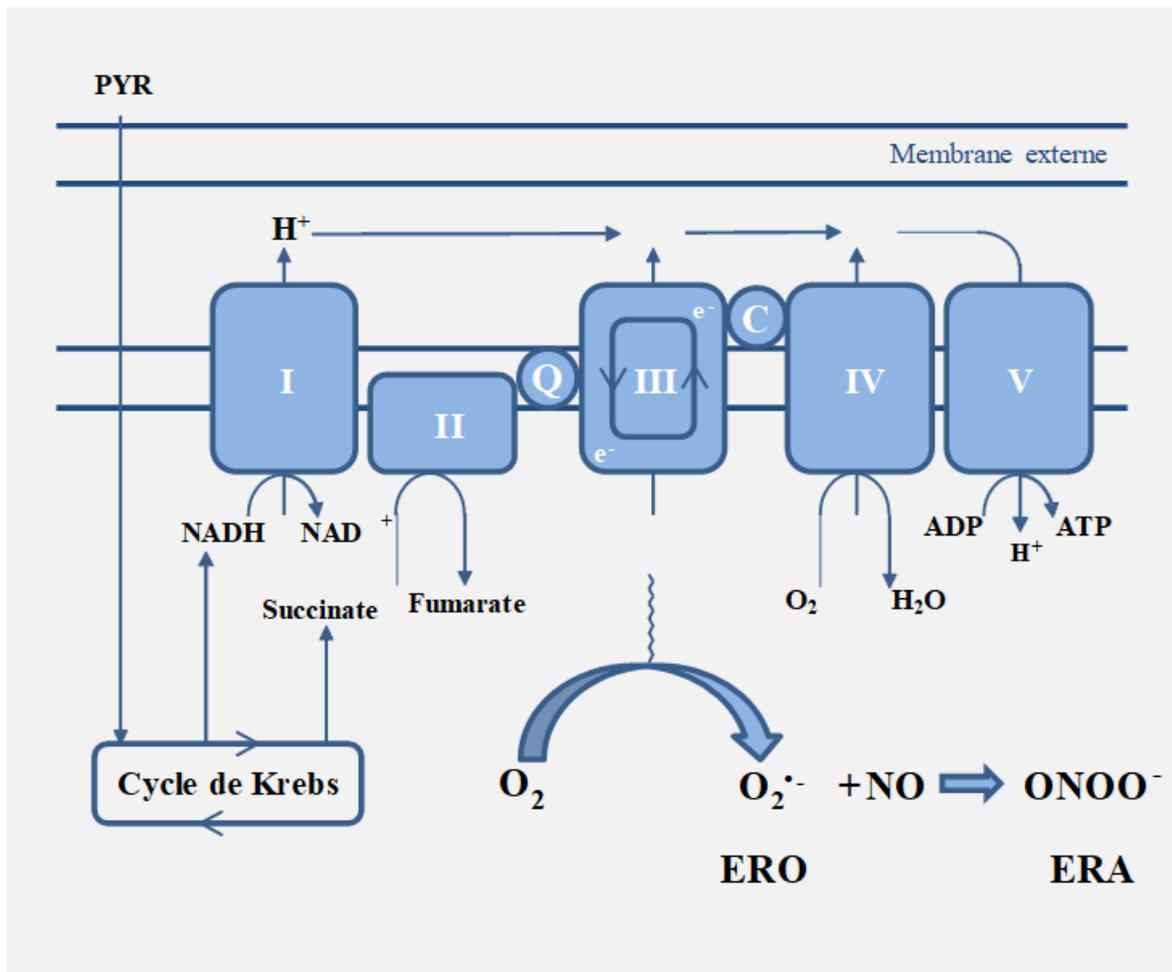


Figure 28 : Production d'espèces réactives de l'oxygène et d'espèces réactives de l'azote par fuite de la chaîne respiratoire mitochondriale. PYR : pyruvate, NADH : nicotinamide adénine dinucléotide, ERO : espèce réactive de l'oxygène et ERA : espèce réactive de l'azote.

Lors du cycle de Krebs, l'isocitrate déshydrogénase (NAD-IDH) catalyse dans la matrice mitochondriale la conversion de l'isocitrate en α -cétoglutarate alimentée par les changements simultanés de NAD^+ en NADH (**Figure 27**). Le NADH produit est utilisé pour produire de l'ATP. Il faut relever que les individus présentant des mutations homozygotes dans le gène codant pour la sous-unité régulatrice β du NAD-IDH ($\text{IDH3}\beta$) n'ont pas de problèmes de santé, à part une rétinite pigmentaire (Hartong et al., 2008). L'inactivation d'*Idh3 β* chez la souris déclenche une dégénérescence rétinienne (Findlay et al., 2018). Théoriquement, le manque d'activité IDH3 peut être compensé par une autre enzyme mitochondriale, l'isocitrate déshydrogénase (NADP-ICDH), qui convertit également l'isocitrate en α -cétoglutarate, mais en utilisant le cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydé (NADP^+) au lieu de NAD^+ (Chidlow et al., 2019). Le NADP sous forme réduite (NADPH) produit par le NADP-ICDH peut être converti en NADH par l'action de la nicotinamide-nucléotide transhydrogénase (NNT), qui est présente dans la membrane interne de la mitochondrie. L'association entre les mutations qui causent la perte de fonction et la rétinite pigmentaire, suggère que le NAD-IDH3 est essentiel pour un fonctionnement rétinien normal, ce qui peut être compensé par le NADP-ICDH dans d'autres tissus.

6.8. La chaîne respiratoire mitochondriale

Tout en remplissant la fonction métabolique de base de la production d'énergie, les mitochondries sont des éléments essentiels dans un nombre actuellement croissant de fonctions cellulaires, notamment l'homéostasie redox et la mort cellulaire programmée (Miller et al., 2020). La chaîne de transport d'électrons (CTE) se compose de quatre complexes (I-IV) qui oxydent le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et la flavine adénine dinucléotide (FADH_2) en NAD^+ et FAD^+ , respectivement (**Figure 28**). Grâce à une série de réactions redox, la CTE transfère des électrons vers l'oxygène moléculaire et H^+ dans l'espace intermembranaire. Ce processus crée un gradient électrochimique transmembranaire, qui est utilisé par l'ATP synthase (complexe V) pour la phosphorylation de l'adénosine diphosphate (ADP) en ATP. En plus de la CTE, la phosphorylation oxydative (OXPHO) repose également sur l'ubiquinone (coenzyme Q) et le cytochrome C, deux porteurs d'électrons mobiles qui transportent les électrons entre les complexes de la chaîne de transport d'électrons. Dans la plupart des tissus, l'OXPHO est un processus étroitement couplé dans lequel l'oxydation du substrat est associée à la synthèse d'ATP avec une fuite d'environ 1% (0,1-4%), mais dans la rétine, les

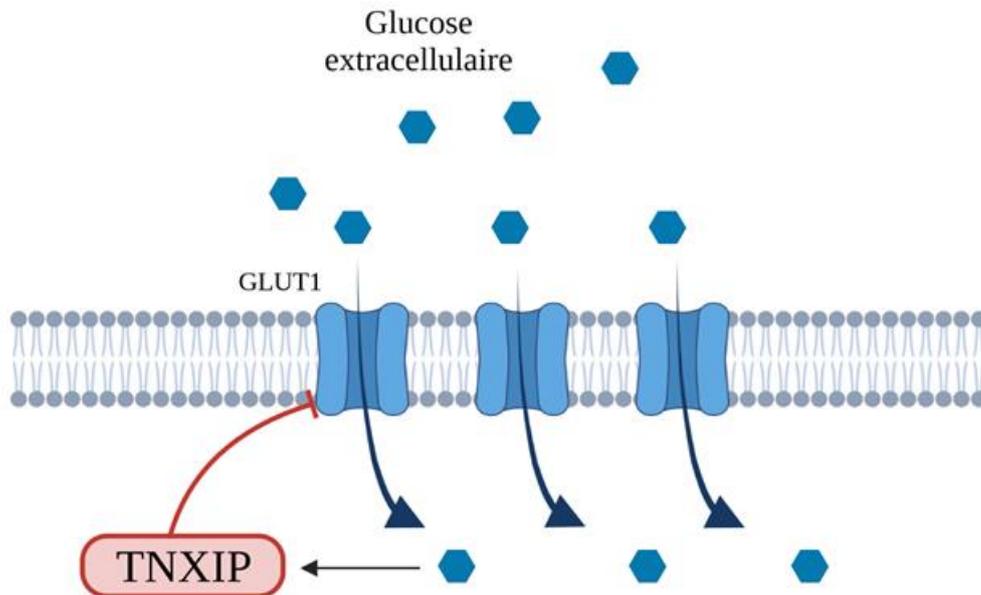


Figure 29 : Régulation du transporteur du glucose GLUT1 par la *thioredoxin-interacting protein* (TXNIP). L'hyperglycémie active l'expression de TXNIP et celui-ci favorise l'internalisation de GLUT1 et ainsi diminue l'entrée du glucose dans les cellules.

mitochondries sont moins couplées, permettant plus de fuite de protons à travers la membrane interne, sans synthèse d'ATP (Du et al., 2016). Les photorécepteurs utilisent plus de 75% de l'oxygène de la rétine et contiennent plus de 75% des mitochondries rétiniennes pour produire de grandes quantités d'ATP par OXPHO, ce qui est nécessaire à la phototransduction (Country, 2017). Le taux de régénération rétinienne 11-*cis* est déterminé par la disponibilité d'ATP et du NADPH.

L'hyperglycémie, correspondant à un excès de glucose, est l'élément causal à l'origine de la pathogenèse de la rétinopathie diabétique. Le stress oxydatif altère le métabolisme mitochondrial. Des mitochondries altérées et dysfonctionnelles sont présentes dans la rétine des patients diabétiques (Gong et al., 2021). Les mitochondries endommagées sont sélectivement ciblées pour la dégradation lysosomale par la mitophagie, une forme spécialisée d'autophagie. Leur dégradation réduit l'inflammation en éliminant les mitochondries endommagées, qui peuvent induire des quantités élevées d'ERO intracellulaires. Cela se produit en partie en raison de l'expression induite par l'hyperglycémie de la protéine *Thioredoxin interacting protein* (TXNIP) qui interagit avec la thiorédoxine (TXN). TXNIP favorise l'internalisation du transporteur de glucose GLUT1, limitant l'absorption cellulaire de glucose (**Figure 29**) (Sullivan et al., 2018). Mais la TXNIP se lie à la thiorédoxine-1 cytosolique (TXN1) et à la TXN2 mitochondriale et inhibent leur l'activité en réduisant leur pouvoir redox (Perrone et al., 2010; Yoshihara, 2020). L'hyperglycémie induit l'expression de de TXNIP dans le système vasculaire, les péricytes et le RPE, ce qui suggère la conservation de ce mécanisme pour différent types cellulaires.

Le stress oxydant est régulé par les protéines de découplage (UCP), une famille de protéines ainsi nommées pour leur capacité à découpler le transport d'électrons et la synthèse d'ATP (Hass and Barnstable, 2021). Les UCP répondent aux dommages oxydatifs en augmentant leurs niveaux d'expression et leur activité. Ces protéines diminuent la production d'ERO par fuite de la mitochondrie en diminuant le gradient électrochimique, un processus appelé découplage léger (**Figure 30**). Le lien entre UCP2 et le diabète et l'obésité est bien connu (Zhang et al., 2001a). Dans la rétine, le niveau d'expression et l'activité de la protéine UCP2 sont augmentés dans les cellules épithéliales rétiniennes cultivées dans un milieu riche en glucose, ce qui peut indiquer une réponse compensatoire au stress oxydatif (Wang et al., 2019b).

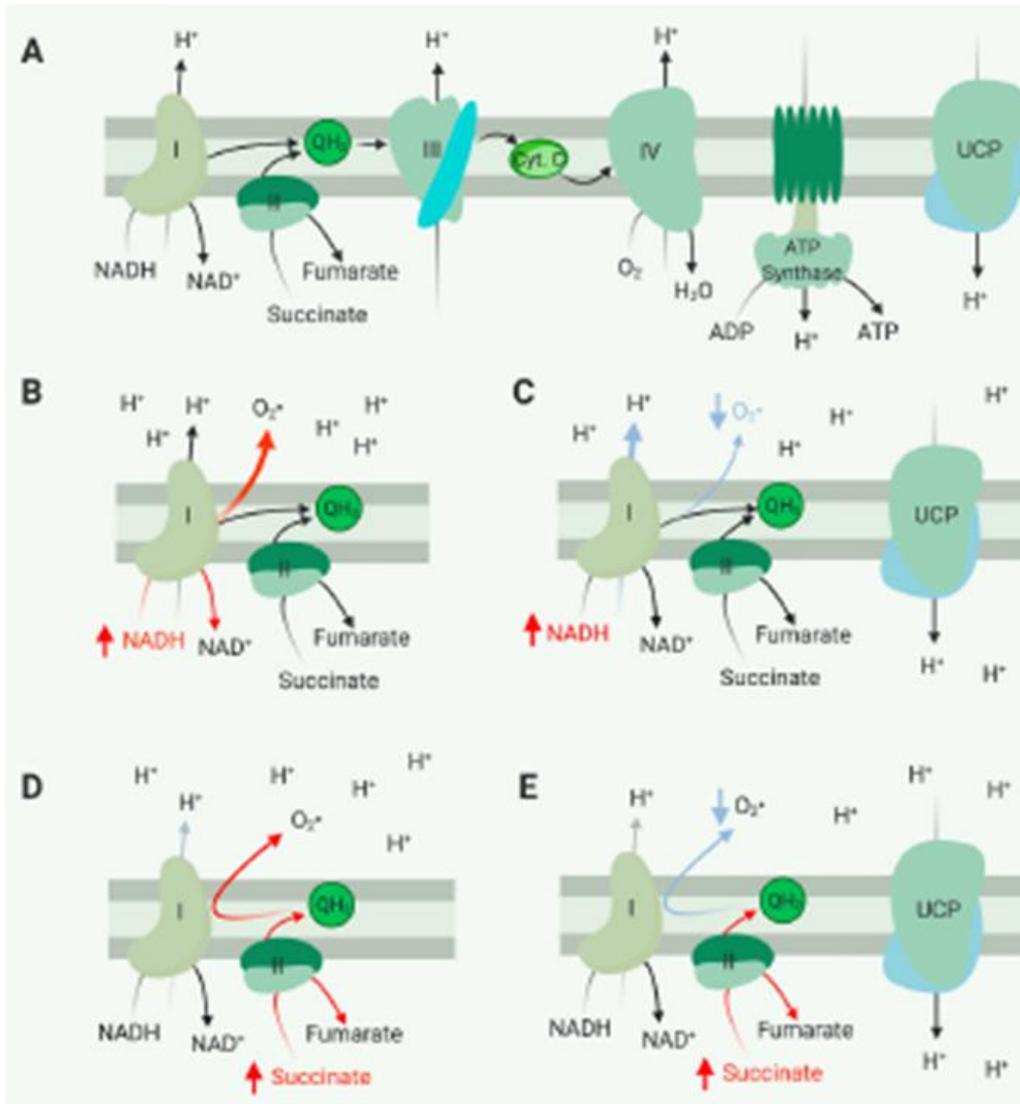


Figure 30 : Principaux composants de la chaîne de transport d'électrons et leurs rôles dans la formation des ERO. A. Dans ce modèle simplifié de la chaîne de transport d'électrons, les électrons sont soit dérivés de l'oxydation du NADH par le complexe I soit du succinate par le complexe II. Ces électrons sont transportés à travers le complexe III et le complexe IV où ils alimentent la translocation des protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, avant d'être finalement utilisés pour réduire l'O₂ en H₂O au niveau du complexe IV. B. Si plus de NADH est fourni que le complexe I ne peut en oxyder, les électrons de NADH interagissent avec O₂ pour former une molécule de superoxyde (une forme d'ERO). C. Le découplage, provoqué par une protéine de découplage, peut diminuer la production de superoxydes par le NADH. D. Si plus de succinate est fourni en quantité supérieures à ce que le complexe III ou IV peut transporter d'électrons, les électrons du succinate peuvent être transportés en sens inverse vers le complexe I par le biais du coenzyme Q10, substrat partagé du complexe I et du complexe II. Le transport inverse des électrons à travers le complexe I aggrave encore la production de superoxydes. E. Le découplage médié par une protéine de découplage peut permettre aux complexes I, III ou IV de transporter des électrons plus rapidement dans la direction conventionnelle, empêchant le transport inverse d'électrons et réduisant ainsi la production de superoxydes.

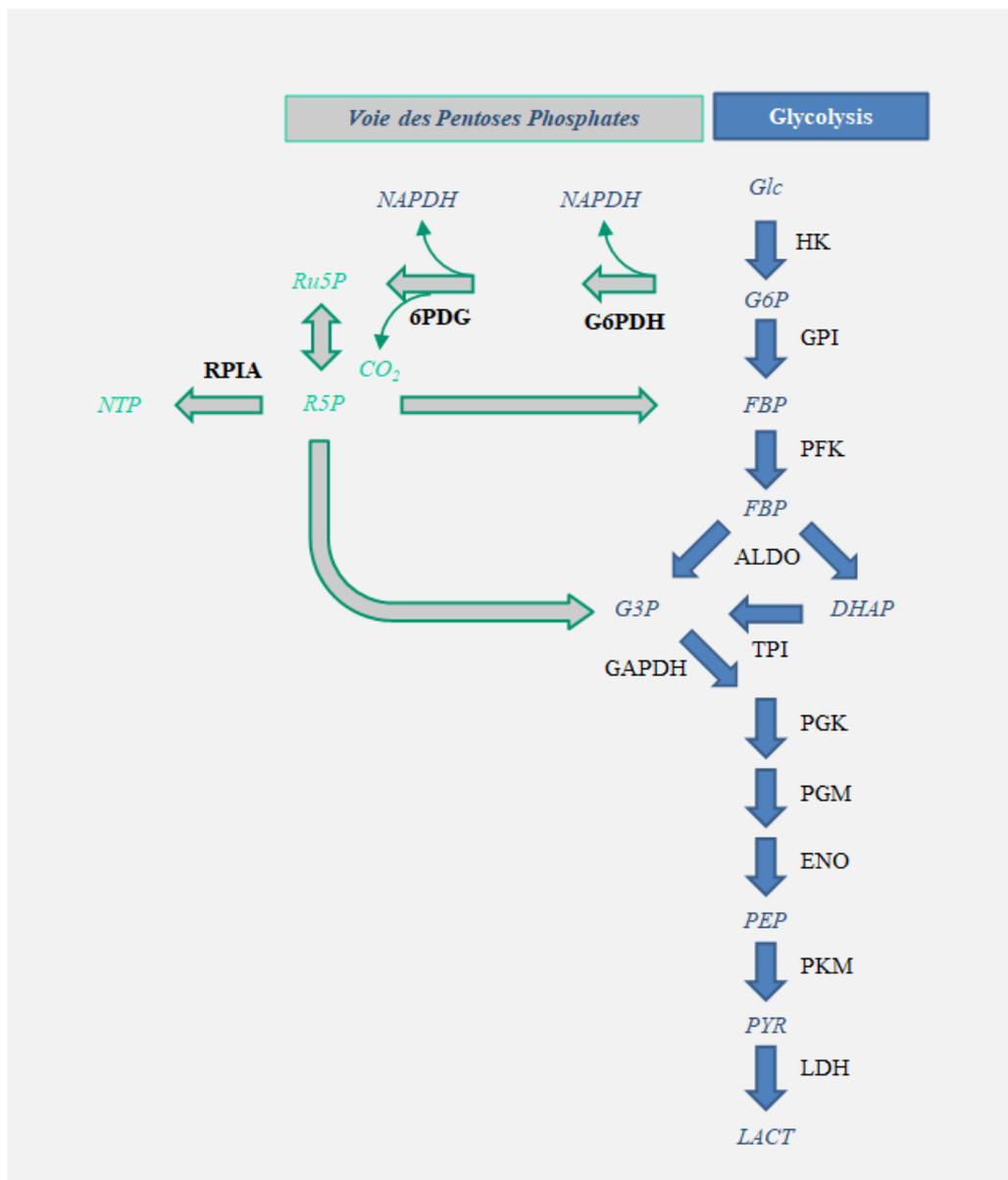


Figure 31 : L'interaction entre la glycolyse et la voie des pentoses phosphates. Glc : glucose, G6P : glucose-6-phosphate, FBP : fructose biphosphate, DHAP : dihydroxyacétone phosphate, PEP : phosphoenolpyruvate, PYR : pyruvate, LACT : lactate, MPC : *mitochondrial pyruvate carrier*, HK : hexokinase, GPI : glucose-6-phosphate isomérase, PFK : phosphofructokinase, ALDO : aldolase, TPI : triose phosphate isomérase, PGK : phosphoglycérate kinase, PGM : phosphoglycérate mutase, ENO : énoïase, PKM : pyruvate kinase M, LDH : lactate déshydrogénase, NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, Ru5P : ribulose-5-phosphate, R5P : ribose-5-phosphate, G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase, 6PDG : 6-phosphogluconate déshydrogénase, NTP : *Non triose phosphate pathway*.

Plus de 90% de l'oxygène cellulaire total est réduit en eau progressivement via des transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale (Nohl et al., 2005). À l'heure actuelle, il est encore techniquement trop complexe d'identifier le complexe respiratoire ou l'enzyme mitochondriale qui produit par fuite la part la plus importante d'ERO (Sanz, 2016).

6.9. La voie des pentoses phosphates

La voie des pentoses phosphates est l'une des principales voies métaboliques à l'origine de la synthèse de nucléotides pour la synthèse de l'ARN et de l'ADN et qui sont aussi utilisés comme cofacteurs de très nombreuses réactions enzymatiques (**Figure 31**). Les premières étapes de cette voie produisent aussi du NADPH qui est un élément essentiel du contrôle du potentiel redox de la cellule. La chaîne respiratoire mitochondriale produit l'ATP qui est utilisé dans toute une série de réactions cellulaires essentielles mais produits par fuite des ERO qui perturbent la cellule, celle-ci réagit en dérivant le flux de glycolyse vers la voie des pentoses phosphates (Leveillard and Sahel, 2017). Dans le système nerveux central, les thiols des cystéines nucléophiles peuvent être oxydés en des dérivés réversibles telles que la S-sulfénylation (SOH), la S-nitrosylation (SNO), la S-glutathionylation (SSG), le disulfure (SS), la S-sulfhydratation (SSH) et la S-sulfinylation (SO₂H) ou encore en dérivés irréversibles, telles que la S-sulfonylation (SO₃H) (Ren et al., 2017). En réponse au stress oxydant, le métabolisme du glucose est détourné de la glycolyse vers la production de NADPH (Patra and Hay, 2014).

La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) comprend une cystéine catalytique strictement conservée, qui est sensible à une variété de modifications thiol, y compris la S-glutathionylation (SSG) inhibitrice mais réversible (Hildebrandt et al., 2015). Les ERO oxydent la cystéine catalytique (C¹⁵²), ce qui entraîne la perte de l'activité catalytique et l'arrêt de la glycolyse. L'oxydation C¹⁵² est régulée par la liaison au NAD⁺ (Baker et al., 2014). Les ERO réagissent avec C¹⁵², conduisant à la formation d'un acide cystéine sulfénique (SOH), qui peut encore réagir, par exemple avec la forme réduite du glutathion (GSH) conduisant à la S-glutathionylation (SSG). La réactivité exceptionnelle de C¹⁵² à l'oxydation par les ERO fait de la GAPDH la cible principale de la perturbation de la glycolyse par les ERO. La GAPDH est un homo-tétramère de 150 kDa dans des conditions physiologiques mais l'oxydation des cystéines dans le site catalytique entraîne la rupture de ce tétramère en monomères de GAPDH de 36 kDa (Park et al., 2009). Des analyses globales du protéome redox ont démontré que la

C¹⁵² catalytique de la GAPDH est le résidu quantitativement le plus permissif à l'oxydation des groupements thiols (Tossounian et al., 2020).

Les cellules microgliales jouent un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie cérébrale et jouent un rôle dans le soutien et la protection des tissus nerveux, mais si le stimulus inflammatoire persiste, elles peuvent sécréter des radicaux libres qui peuvent attaquer les neurones. L'oxyde nitrique synthase (NOS2/i-NOS) métabolise l'arginine en oxyde nitrique (NO) ainsi que la citrulline, réutilisée pour la synthèse du NO via le cycle citrulline-NO (Leveillard et al., 2019). Le NO est une molécule hautement réactive qui diffuse librement à travers les membranes et peut être métabolisé en espèces réactives de l'azote (ERA) qui oxydent les protéines synaptiques par S-nitrosylation (Nakamura et al., 2021). Des niveaux accrus de NO conduisent à une S-nitrosylation de la C¹⁵² de GAPDH. La GAPDH S-nitrosylée (GAPDHSNO) se lie à SIAH1, une protéine ligase E3-ubiquitine, ce qui stabilise SIAH1 qui est transféré avec GAPDHSNO dans le noyau (Hildebrandt et al., 2015). La translocation nucléaire du complexe GAPDHSNO-SIAH1 déclenche l'apoptose, contribuant à la mort neuronale (Hara et al., 2005; Sawa et al., 1997). Dans la rétine des souris *rd1* sans bâtonnets, le NO produit par les cellules microgliales activées pourrait S-nitrosyler la GAPDH dans les cônes survivants en plus des effets négatifs sur les cônes des cytokines inflammatoires (Conart et al., 2020; Eandi et al., 2016). Ce scénario pourrait expliquer le bénéfice des traitements anti-inflammatoires pour des modèles murins de rétinite pigmentaire (Wang et al., 2020; Wang et al., 2019a).

La pyruvate kinase M (PKM) a deux isoformes d'épissage, PKM1 et PKM2, qui sont produites à partir d'un épissage alternatif de pré-ARNm de PKM par l'inclusion mutuellement exclusif de l'exon 9 (PKM1) ou de l'exon 10 (PKM2)) (Masaki et al., 2020). L'enzyme PKM2 est essentielle pour le maintien des photorécepteurs, à la fois pour les bâtonnets et les cônes (Rajala et al., 2018a; Rajala et al., 2018b). L'oxydation du PKM à la cystéine 358 (C³⁵⁸) inhibe la production de pyruvate et entraîne l'accumulation de phosphoénolpyruvate (PEP) (Anastasiou et al., 2011). Le PEP, un inhibiteur allostérique de la triose phosphate isomérase (TPI) (**Figure 19**), interrompt la glycolyse, ce qui produit une élévation de la concentration intracellulaire de glucose-6-phosphate (G6P). Le G6P, produit par l'action des hexokinases sur le glucose entré dans la cellule via des transporteurs de glucose, est détourné pour produire du ribulose-5-phosphate (Ru5P) via la partie oxydative de la voie des pentoses phosphates. Ce sont les étapes enzymatiques catalysées par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) et la 6-

phosphogluconate déshydrogénase (6PGD), cette dernière, produisant également du CO₂ (**Figure 31**). La G6PDH et la 6PGD utilisent toutes deux le NADP⁺ comme cofacteur qui est réduit en NADPH par la réaction. Les électrons dérivés du NADPH sont transférés aux systèmes redox des thiorédoxines réductases (TXNRD1-3) et de la glutathion réductase (GSR) afin de neutraliser les ERO et pour réduire les protéines S-oxydées. Ainsi, les machineries antioxydantes cellulaires sont maintenues avec l'énergie fournie par le catabolisme du glucose via le transport d'électrons médié par le NADPH (Oka et al., 2012). L'activité de la G6PDH est régulée par le rapport NADP⁺/NADPH : le NADPH inhibe son activité, tandis que le NADP⁺ est nécessaire à son activité via son effet sur sa conformation (Patra and Hay, 2014). Un flux accru de glucose à travers les voies des pentoses phosphates a une fonction neuroprotectrice (Schubert, 2005). Dans la partie non oxydante suivante de la voie des pentoses phosphates, Ru5P est converti en ribose-5-phosphate (Ri5P) par la ribulose-5-phosphate isomérase (RPIA). Ri5P peut réintégrer la voie glycolytique dans un cycle où il est converti en fructose-6-phosphate (F6P) ou en glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) (Bouzier-Sore and Bolanos, 2015). La conversion du G6P en Ru5P produit deux moles de NADPH et une de CO₂ de sorte que dans des conditions de stress oxydant excessif nécessitant une quantité maximale de NADPH, le G6P est complètement oxydé en CO₂ en six cycles complets. L'oxydation complète du glucose par les cellules en CO₂ est certainement préjudiciable à l'organisme. Cependant, dans des conditions non pathologiques, le pouvoir redox produit via le NADPH équilibre l'effet négatif de l'oxydation des enzymes glycolytiques telles que GAPDH et PKM et restaure l'homéostasie redox, libérant la voie glycolytique.

6.10. La voie des ribonucléotides

Les ribonucléotides pyrimidiques, l'uridine triphosphate (UTP) et la cytosine triphosphate (CTP) sont synthétisés *de novo* dans des cellules humaines à partir d'acides aminés non-essentiels, l'acide aspartique (D) et la glutamine (Q) qui sont combinés au bicarbonate (HCO₃) par cinq réactions consécutives conduisant à l'uridine monophosphate (UMP), et ensuite transformé en UTP, le précurseur de la cytosine monophosphate (CMP) et de la CTP (Berg et al., 2002; Rao and Cotlier, 1984) (**Figure 32A**). L'acide aspartique (D) est synthétisé dans les photorécepteurs à partir du glucose via la glycolyse et le cycle de Krebs pour son squelette carboné et à partir d'un autre acide aminé non-essentiel, l'acide glutamique (E) pour son ion

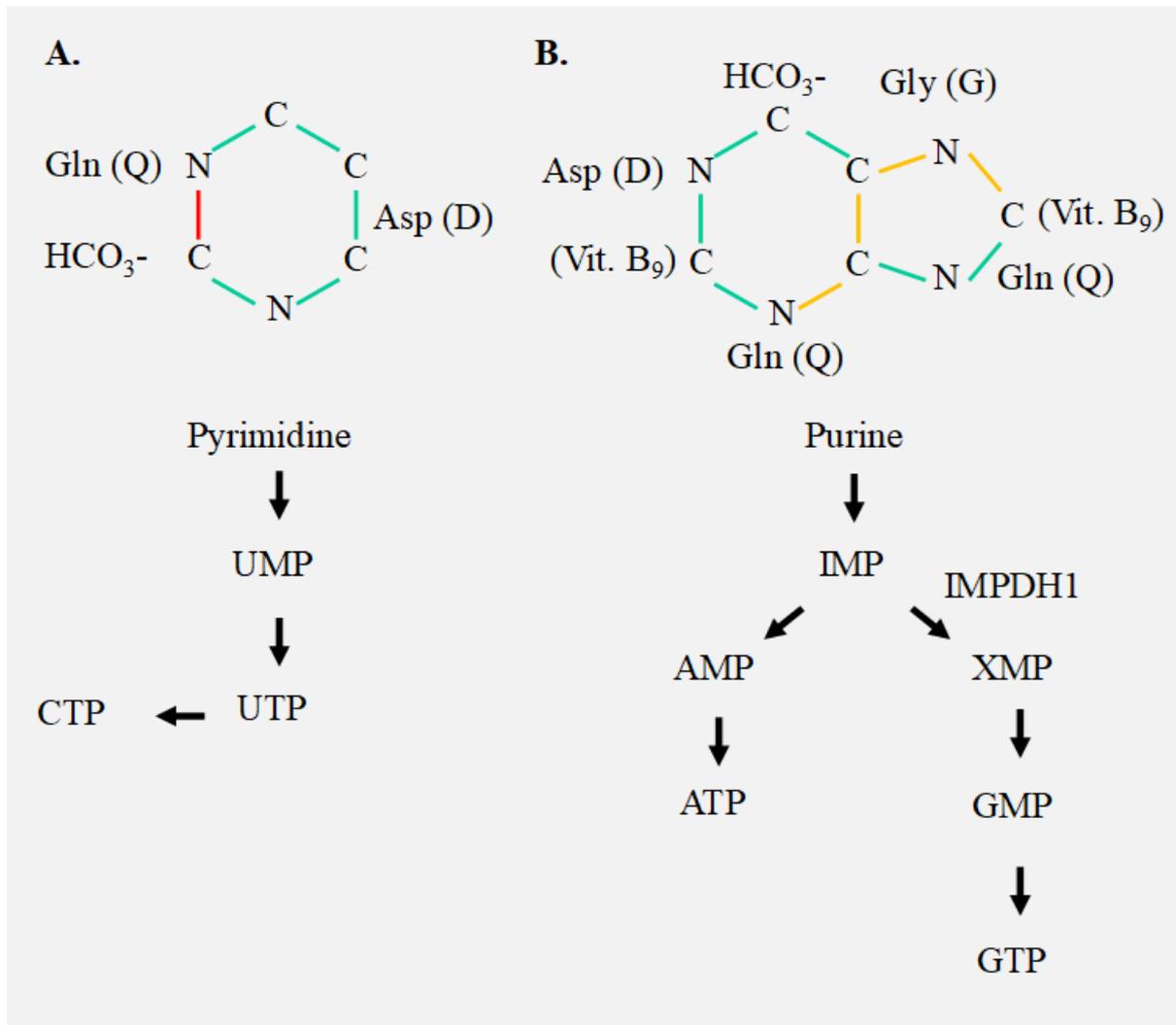


Figure 32 : Synthèse *de novo* des ribonucléotides. **A.** Synthèse des ribonucléotides pyrimidiques. UMP : uridine monophosphate, UTP : uridine triphosphate et CTP : cytidine triphosphate. **B.** Synthèse des ribonucléotides puriques. Vit. B9 : vitamine B9, IMP : inosinate monophosphate, AMP adénosine monophosphate, ATP : adénosine triphosphate, XMP : xanthosine-5'-phosphate, GMP : guanosine monophosphate, GTP : guanosine triphosphate, IMPDH1 : IMP déshydrogénase 1.

ammonium NH_4^+ (Voaden and Morjaria, 1980). Le CTP est également essentiel pour la synthèse des phospholipides. Les ribonucléotides puriques le guanosine triphosphate (GTP) et l'adénosine triphosphate (ATP) sont synthétisés *de novo* à partir de trois acides aminés non essentiels, la glycine (G), l'acide glutamique (E) et l'acide aspartique (D) impliqués dans la synthèse du cycle imidazole dans le précurseur purique. L'inosinate monophosphate (IMP) est ensuite métabolisé en adénosine monophosphate (AMP) et en guanosine monophosphate (GMP) (**Figure 32B**). Ces acides aminés sont aussi des précurseurs des voies métaboliques et des neurotransmetteurs essentiels aux fonctions rétinienne (Kalloniatis et al., 2013). La production de GMP implique une déshydrogénation par IMP en xanthosine-5'-phosphate (XMP) par des IMP déshydrogénases tétramères (IMPDH1 ou 2), l'étape limitant la vitesse de la synthèse *de novo* des nucléotides de guanine. La preuve que les photorécepteurs synthétisent le GMP par la voie *de novo* provient de la génétique. Des mutations autosomiques dominantes du gène *IMPDH1* provoquent une dégénérescence des photorécepteurs à bâtonnets chez les patients souffrant de la rétinite pigmentaire 10 (RP10) (Kennan et al., 2002). Les enzymes mutantes sont sujettes à l'agrégation, ce qui pourrait provoquer une dégénérescence des photorécepteurs via l'accumulation de protéines insolubles. Alternativement, la protéine mutante semble exercer un effet transdominant sur l'activité enzymatique de la copie normale de la protéine IMPDH1 en imposant sa conformation aberrante au tétramère IMPDH1 (Wang et al., 2011). La comparaison de l'expression rétinienne d'*Impdh1* à celle de *Hprt1* plaide en faveur d'une synthèse *de novo* de GMP par des photorécepteurs à bâtonnets (Aherne et al., 2004). GDP et ADP sont synthétisés par des guanylate et adénylate kinases. Le GTP est produit par le cycle de Krebs et l'ATP principalement par l'ATP synthase de la chaîne respiratoire mitochondriale, mais aussi par la glycolyse.

Les ribonucléotides peuvent alternativement être produits par une voie de récupération à partir de précurseurs nucléosidiques (uridine, cytidine, guanosine et adénosine) issus du renouvellement des acides nucléiques ou même de l'alimentation, par une série de réactions impliquant l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HPRT) dans le cas du recyclage du GMP. Les nucléosides sont des molécules hydrophiles et nécessitent des transporteurs de la famille *solute carrier* (SLC) pour pénétrer dans les cellules. Deux familles de transporteurs membranaires ont été identifiées qui transportent les nucléosides puriques et pyrimidiques, les transporteurs équilibrants de nucléosides (TEN) ; SLC29A1 et SLC29A2 et les transporteurs concentrés de nucléosides (TCN) ; SLC28A1, SLC28A2 et SLC28A3. Les membres des deux

familles transportent des nucléosides purines et pyrimidiques mais ils diffèrent principalement par leur mode d'action. Les TEN (11 domaines transmembranaires) sont des transporteurs facilités qui facilitent le transport le long du gradient de concentration de nucléosides et les TCN sont des transporteurs à couplage ionique (13 domaines transmembranaires), ils transportent activement les nucléosides en y couplant un gradient de sodium dirigé vers l'intérieur (Baldwin et al., 2004; Gray et al., 2004). SLC29A1 est localisé à la membrane apicale et travaille de concert avec les TENs, localisés aux membranes basolatérale de l'épithélium, pour assister le flux nucléosidique transépithélial. L'expression de *Slc29a1* (transportant des purines et des pyrimidines) par l'EPR de rat est induit par la présence de son ADN complémentaire (ADNc) dans une banque d'expression construite à partir de tissu RPE adulte (Kole et al., 2016), tandis que l'expression de *Slc29a2* (transportant purines et pyrimidines) a une expression de type rhodopsine dans la rétine de souris (Ait-Ali et al., 2015). Ces observations suggèrent que les photorécepteurs sont capables d'utiliser des nucléosides circulants transportés à travers l'EPR via des transporteurs de nucléosides facilités pour synthétiser des ribo- et désoxyribonucléotides.

6.11. La réversion de l'oxydation par les systèmes des thiorédoxines et des glutarédoxines

Le pouvoir redox du système thiorédoxine (thiorédoxines, comme RdCVFL, thiorédoxine réductase (TXNRD) et NADPH), et du système glutathion (GSH) (GSH, glutathion réductase et NADPH) repose tous les deux sur le métabolisme du glucose par la voie des pentoses phosphates (Leveillard and Ait-Ali, 2017; Leveillard and Sahel, 2017). Selon la théorie du vieillissement des radicaux libres, proposée pour la première fois par Harman en 1956 (Harman, 1956), les radicaux libres (ERO) sont produits en continu dans la cellule en tant que produit du système aérobie et produisent des dommages oxydatifs pendant le vieillissement (Bokov et al., 2004). La restriction calorique, qui abaisse le métabolisme du glucose, est le seul schéma sans équivoque efficace pour prolonger considérablement la durée de vie de la plupart des organismes et est connue pour augmenter la résistance à divers stress oxydatifs chez de nombreux animaux (Finkel, 2015). Les espèces azotées réactives (ERA) sont produites lorsque l'ion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ réagit avec l'oxyde nitrique (NO) produit par les NO synthases (NOS1-3). Afin de contrecarrer les dommages des macromolécules par les ERO et les ERA, des conditions d'oxydoréduction appropriées ou pouvoir redox, doivent être maintenues dans l'environnement

intracellulaire. Par conséquent, les organismes aérobies ont développé plusieurs systèmes antioxydants. Des molécules antioxydantes telles que l'acide urique, le glutathion (GSH) et les vitamines C et E éliminent les ERO et les ERA pour prévenir les dommages oxydatifs. Les enzymes antioxydantes détoxifient les ERO/ERA, en composés chimiquement moins réactifs. Paradoxalement, le rôle protecteur des antioxydants a été remis en cause par l'observation selon laquelle chez l'homme les antioxydants empêchent les effets bénéfiques pour la santé de l'exercice physique (Ristow et al., 2009).

Alternativement, les enzymes réparatrices réduisent les groupes oxydés dans les macromolécules. Il est important de noter que l'oxydation réversible du groupe thiol dans les cystéines et les méthionines est le rationnel de la signalisation redox (Pillay et al., 2016). La cystéine est un acide aminé rarement utilisé qui représente environ 2% des acides aminés dans les protéines eucaryotes. Les ERO et les ERA peuvent induire des signaux redox au moyen de modifications oxydatives des cystéines et méthionines. Le gros atome de soufre polarisable dans un groupe thiol est riche en électrons et hautement nucléophile. Par conséquent, les cystéines peuvent subir une large gamme de réactions chimiques déjà décrites plus haut et même être S-thiolé en CS-SG (Kim et al., 2015). Les modifications de l'acide sulfonique, la forme la plus oxydée du groupe thiol, sont irréversibles et sont donc des dommages délétères, tout comme les adduits 4-hydroxy-2-nonéanal (HNE) (Chung et al., 2013). Les cystéines diffèrent dans leurs propriétés de réactivité en fonction du microenvironnement de la protéine, et toutes les cystéines ne sont pas sensibles aux oxydations. La plupart de ces oxydations sont réversibles par une réduction catalysée par des oxydoréductases, telles que les thiorédoxines (TXN1 et 2), les glutarédoxines (GLRX1-3 et 5) et la sulfirédoxine (SRXN1) pour la S-sulfinylation (SO₂H). Le prototype des thiorédoxines, TXN1, est une protéine de 12 kDa avec un groupe disulfure/dithiol conservé actif redox C³²GPC³⁵ (**Figure 33A**). TXN1 réduit catalyse la réduction des liaisons disulfure dans de nombreuses protéines, et la TXN1 oxydé est réduit de manière réversible par l'action des thiorédoxines réductases (TXNRD1-3) et du NADPH (Holmgren, 1985). De plus, TXN est aussi sécrété par les cellules par un mécanisme jusqu'alors inconnu qui ne dépend pas d'un peptide signal (Rubartelli et al., 1992). Les souris transgéniques surexprimant TXN1 humain ont une augmentation statistiquement significative de la durée de vie (Mitsui et al., 2002).

Dans la cellule les conditions oxydantes provoquent la formation de groupements disulfures hétérologues sans recours à une enzyme entre les protéines et le glutathion (GSH), l'un des tampons thiols les plus courants et les plus importants dans la cellule. Le GSH réduit

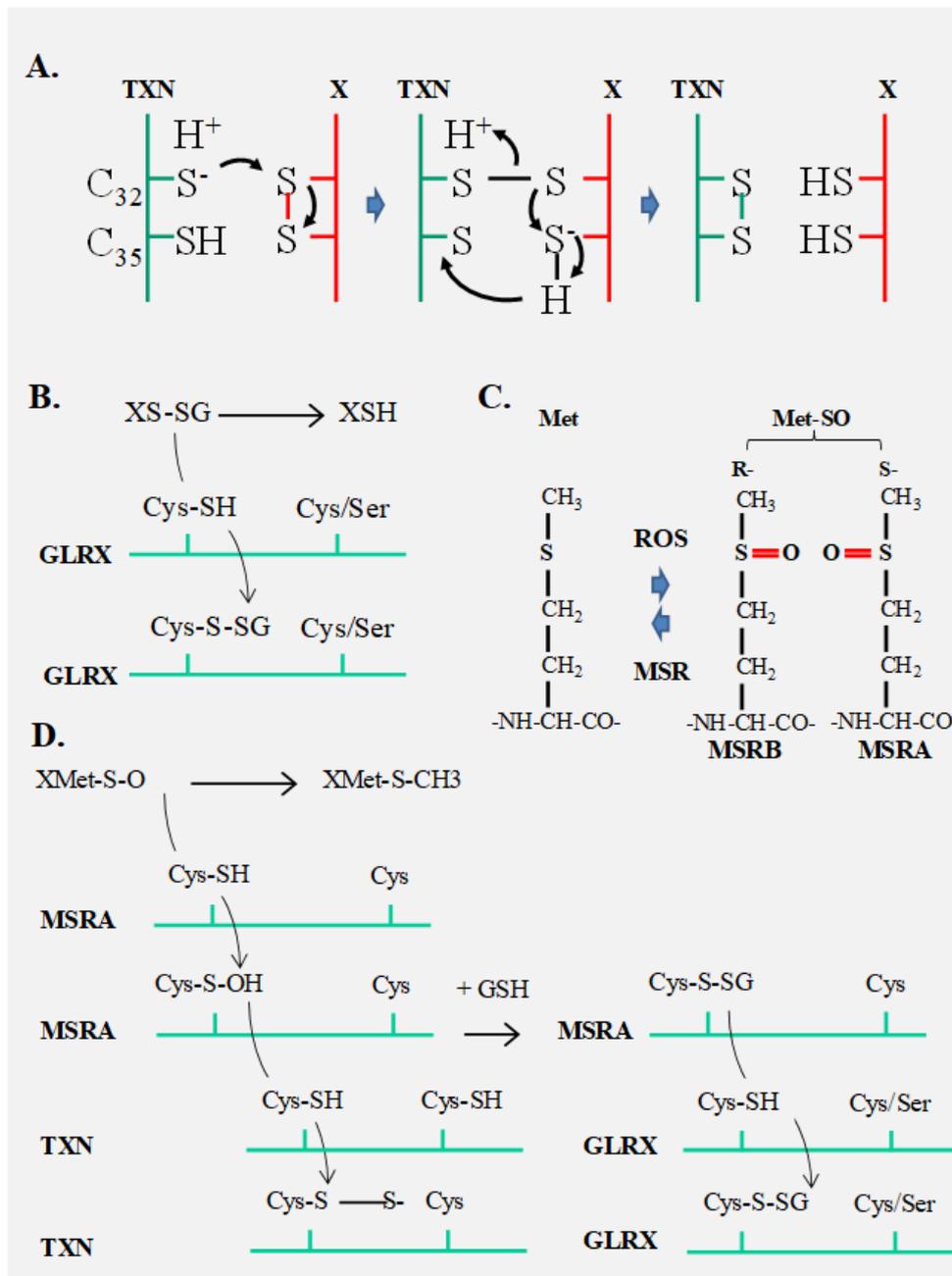


Figure 33 : Système de réduction de cystéines et méthionines. **A.** Mode d'action des thiorédoxines, TXN : thiorédoxine **B.** Déglutathionylation d'une protéine par la glutarédoxine, GLRX : glutarédoxine, SG : Glutathion oxydé **C.** Oxydation des méthionines par le stress oxydatif. L'oxydation de la méthionine (Met-SO) produit un mélange racémique de deux stéréoisomères, la méthionine S-sulfoxyde et la méthionine R-sulfoxyde, en raison de l'asymétrie de l'atome de soufre, MSR : méthionine sulfoxyde réductase **D.** Mode d'action des méthionine sulfoxyde réductases et recyclage grâce à la thiorédoxine et la glutarédoxine. MSRA : méthionine sulfoxyde réductase A, TXN : thiorédoxine, GLRX : glutarédoxine, GSH : glutathion.

est oxydé en GSSG ou en protéine-S-SG (xS-SG). Cette réaction est appelée S-glutathionylation (Grek et al., 2013). La S-glutathionylation est une protection des thiols protéiques dans des conditions oxydantes, car elle est réversible (Herrero and de la Torre-Ruiz, 2007). La S-glutathionylation empêche l'oxydation séquentielle des groupes thiol en acides sulfénique, sulfénique et sulfonique, ce dernier étant irréversible et donc la protéine est irrémédiablement endommagée (Xiong et al., 2011). Lorsque les conditions sont réunies, la déglutathionylation, la réduction de xS-SG est catalysée par les glutarédoxines (GLRX) via une réaction de monothiol qui ne dépend que du résidu cystéine du site actif N-terminal (**Figure 33B**). Le GSSG est réduit par la glutathion réductase mitochondriale (GSR). La GSR nécessite de la riboflavine (vitamine B2) sous la forme coenzyme flavine adénine dinucléotide (FAD) pour effectuer la réduction du GSH : $FADH_2 + GSSG > FAD + GSH$ (Ashoori and Saedisomeolia, 2014).

La méthionine est également sensible à l'oxydation non enzymatique par les ERO. Le sulfoxyde de méthionine (Met-SO) peut être encore oxydé en sulfone (Met-SO₂) par une oxydation irréversible. L'oxydation de la méthionine (Met-SO) produit un mélange racémique de deux stéréo-isomères, la méthionine S-sulfoxyde et la méthionine R-sulfoxyde, en raison de l'asymétrie de l'atome de soufre (**Figure 33C**). Cette oxydation réduite par les méthionine sulfoxyde réductases : MSRA et MSRB1-3, respectivement la plupart des MSR possèdent deux résidus cystéine (2-Cys-MSR), une cystéine catalytique et une cystéine de recyclage. Pour MSRA et MSRB, la cystéine catalytique du MSR attaque d'abord l'atome de soufre de Met-SO dans une réaction nucléophile. La cystéine catalytique forme une liaison disulfure avec la cystéine de recyclage, le MSR est oxydé et Met-SO est réduit en méthionine dans la réaction (**Figure 33D**). Le recyclage des MSR implique les TXN ou les GLRX.

Les désoxyribonucléotides sont tous fabriqués à partir d'un précurseur de ribonucléotides par l'action de la ribonucléotide réductase (RNR), un tétramère de deux sous-unités, R1 et R2 (Gesteland et al., 2006) (**Figure 34A**). Au cours de la catalyse de la ribonucléotide réductase, un radical cystéinyl, nécessaire à l'extraction de l'hydrogène au niveau du substrat de ribose C3', est formé. Après l'achèvement d'un cycle, une liaison disulfure a été formée entre la paire de cystéine conservée au site actif de R1 qui est transférée à un dithiol C-terminal, par échange de liaison disulfure. Ensuite, la liaison disulfure résultante à la queue C-terminale est réduite par les systèmes thiorédoxine (TXN) / glutarédoxine (GLRX) résultant en un R1 actif pour continuer le prochain cycle de catalyse RNR (Sengupta and Holmgren, 2014) (**Figure 34B**).

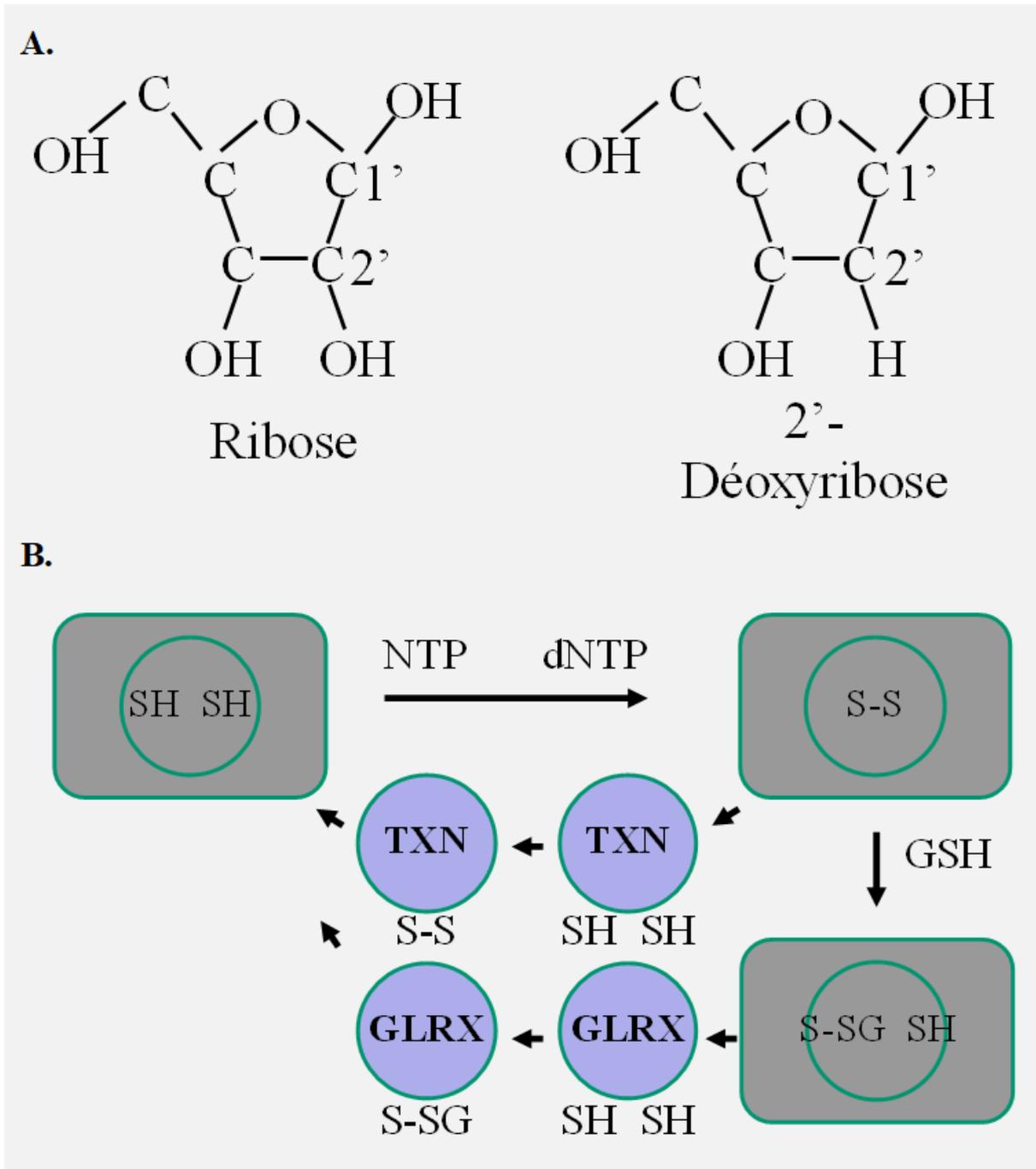


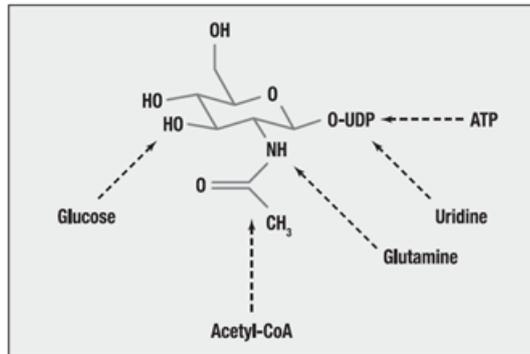
Figure 34 : Production de déoxyribonucléotide par la ribonucléotide réductase. A. Structure chimique d'un ribose et 2'Déoxyribose. **B.** Catalyse et recyclage de la ribonucléotide réductase. RNR : ribonucléotide réductase, NTP : ribonucléotide triphosphate, dNTP : déoxyribonucléotide triphosphate, TXN : thiorédoxine, GLRX : glutarédoxine et GSH : glutathione.

Ainsi, la réduction des ribonucléotides, l'étape limitante de la synthèse de l'ADN, dépend du pouvoir réducteur fourni par le NADPH réduit aux les enzymes TXN et GLRX. En tant que neurones post-mitotiques, les photorécepteurs ne répliquent pas leur génome mais l'exposent à un microenvironnement hautement oxydant qui endommage l'ADN (Cortina et al., 2003; Menu dit Huart et al., 2004). Des mutations dans les enzymes de réparation de l'ADN provoquent la dégénérescence des photorécepteurs (Jaarsma et al., 2013). Par exemple, le syndrome de Cockayne, une maladie rare de la réparation de l'ADN, provient de mutations autosomiques récessives des gènes *CSA* ou *CSB* codant les enzymes de la voie de réparation par excision des nucléotides. Cette voie de réparation de l'ADN est impliquée dans l'élimination des lésions de l'ADN du génome, y compris les liaisons induites par les UV entre les pyrimidines adjacentes. La souris *Csb^{mm}*, un modèle du syndrome de Cockayne, subit une perte progressive des photorécepteurs en vieillissant. Ceci implique préférentiellement les bâtonnets, les cônes étant épargnés, en accord avec le fait que les dommages induits par la lumière affectent principalement les bâtonnets (Elachouri et al., 2015; Gorgels et al., 2007).

6.12. La voie de biosynthèse des hexosamines

La O-N-acétylglucosaminylation (O-GlcNAcylation) est une modification post-traductionnelle réversible qui contrôle l'activité, la localisation ou la stabilité des protéines en réponse à l'environnement nutritionnel de la cellule. Elle correspond à l'addition de N-acétylglucosamine sur des résidus sérine ou thréonine des protéines. (Collins and Chatham, 2020). La modification de la O-GlcNAcylation est induite dans diverses conditions de stress cellulaire, comme par exemple l'hyperglycémie (Gurel and Sheibani, 2018). Cette modification réversible dépend de la disponibilité du glucose et constitue un mécanisme par lequel les activités cellulaires sont régulées en fonction de l'apport de nutriments. La O-GlcNAcylation est le produit final de la voie de biosynthèse de l'hexosamine (HBP) une branche de la glycolyse. Seuls 2 à 3% du fructose-6-P entrent dans la HBP, 97 à 98% dans la glycolyse. La HBP nécessite du glucose, de la glutamine, de l'acétyl-CoA et de l'uridine triphosphate (UTP) (**Figure 35A**). L'enzyme limitante de la O-GlcNAcylation est la glutamine-fructose-6-phosphate aminotransférase (GFAT) qui catalyse la production de glucosamine-6-phosphate (GlcN-6P) en utilisant à la fois le fructose-6-phosphate, un métabolite de la glycolyse, et la glutamine (**Figure 35B**).

A.



B.

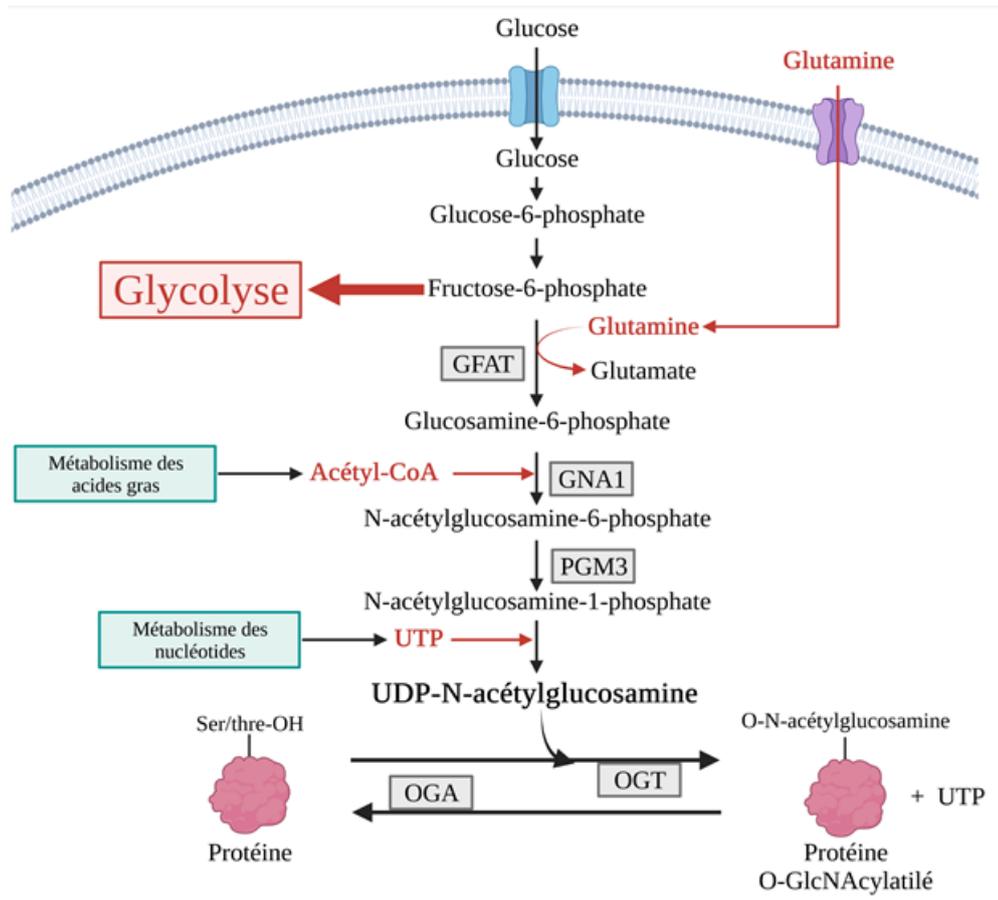


Figure 35 : La voie de la biosynthèse des hexosamines. A. Le groupement N-acétylglucosamine constitué de glucose, de glutamine, d'UDP, d'acétyl-CoA, l'uridine triphosphate (UTP) B. Voie de la synthèse des hexosamines. GFAT : glutamine-fructose-6-phosphate amidotransférase, GNA1 : glucosamine-6P-N-acétyltransférase, PGM3 : phosphoacétylglucosamine mutase-3, OGT : UDP-N-acétylglucosamine-peptide-N-acétylglucosaminyl-transférase, OGA : protéine-3-O-N-acétyl-D-glucosaminyl-L-serine/thréonine N-acétylglucosaminyl hydrolase.

Le GlcN-6P est métabolisé par la GlcN-6P-N-acétyltransférase (GNA1) en acétyl-GlcN-6P à l'aide d'acétyl-CoA, produit par le métabolisme des acides gras. L'acétyl-GlcN-6P est converti en acétyl-GlcN-1P par la phosphoacétylglucosamine mutase-3 (PGM3). L'acétyl-GlcN-1P est finalement métabolisé en UDP-GlcNAc par l'UDP-N-acétylhexosamine pyrophosphorylase (UAP1) en utilisant l'UTP, produit par le métabolisme des acides nucléiques. La O-GlcNAcylation des résidus sérine ou thréonine dans les protéines est un processus réversible régulé par deux enzymes : l'UDP-N-acétylglucosamine-peptide-N-acétylglucosaminyl-transférase (OGT) et la protéine O-GlcNAcase (OGA).

De nombreuses protéines qui régulent le métabolisme du glucose sont les cibles de O-GlcNAcylation, y compris le transporteur de glucose répondant à l'insuline 4 (GLUT4). Une O-GlcNAcylation augmentée est liée au développement de la résistance à l'insuline dans le diabète de type 2 et contribue à la physiopathologie des complications diabétiques, y compris la rétinopathie diabétique (Issad et al., 2010). L'expression du récepteur nucléaire de la sous-famille 4 du groupe A membre 1 (NR4A1) est augmentée dans la rétine d'un modèle animal d'obésité/pré-diabétique, induite par une alimentation riche en acide gras saturés. L'expression de NR4A1 promeut l'expression de l'ARNm de GFAT2 et la O-GlcNAcylation dans les cellules rétiniennes (Dai et al., 2018). De plus, la O-GlcNAcylation réduit la signalisation de l'insuline. Le substrat du récepteur de l'insuline humaine 1 (IRS1) est phosphorylé sur les résidus tyrosine par le récepteur de l'insuline (INSR), un récepteur tyrosine kinase, ce qui provoque sa liaison aux protéines cellulaires contenant des domaines *src homology* (SH)2 telles que la sous-unité p85 de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). Ces phosphorylations sont produites par des kinases utilisant l'ATP produit par le métabolisme du glucose via la glycolyse et l'OXPHO. La phosphorylation à la sérine 307 (S³⁰⁷) de l'IRS1 par la protéine ribosomique S6 kinase β -1 (S6K1) bloque la protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), qui déphosphoryle INSR et l'IRS1, mettant ainsi fin à la signalisation de l'insuline. Mais l'IRS1 est également O-GlcNAcylé sur S³⁰⁷, ce qui prévient sa phosphorylation en réponse à l'insuline dans le cadre d'une boucle de rétroaction (Jahangir et al., 2014) (**Figure 36**). Le rôle principal de l'insuline est d'éliminer le glucose du sang via GLUT4, qui se déplace vers la surface cellulaire pour permettre une entrée accrue de glucose dans les cellules (McNay and Pearson-Leary, 2020). En l'absence d'insuline, GLUT4 est retenu dans des compartiments de stockage intracellulaires. Lors de la stimulation par l'insuline, GLUT4 se déplace de ces compartiments vers la surface cellulaire où il transporte le glucose du milieu extracellulaire dans la cellule. L'insulinorésistance induite par

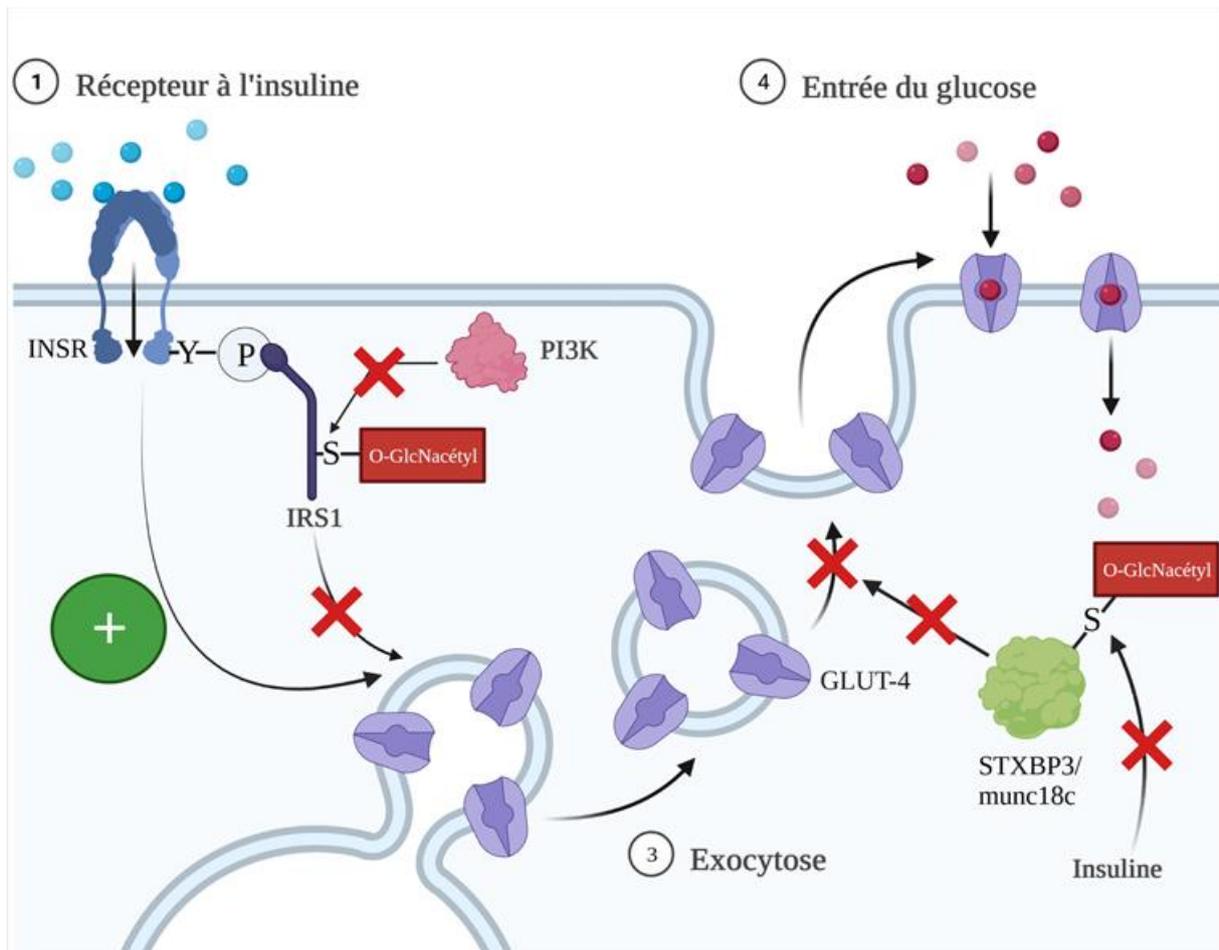


Figure 36 : La O-GlcNAcylation dans la translocation du récepteur GLUT4 répondant à l'insuline. L'insuline stimule l'expression de GLUT4 et sa translocation dans la rétine. La O-GlcNAcylation du substrat du récepteur de l'insuline humaine 1 (IRS1) prévient sa phosphorylation par PI3K et bloque la signalisation. La O-GlcNAcylation de STXBP3/munc18c bloque la fusion des vésicules contenant GLUT4. INSR : récepteur de l'insuline, PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase.

l'hexosamine résulte en partie de la diminution de l'absorption du glucose due à une perturbation de la translocation de GLUT4. En effet, la protéine *syntaxin-binding protein 3* (STXBP3/munc18c) qui est impliquée dans la fusion des vésicules intracellulaires contenant GLUT4 est O-GlcNAcylée sur un résidu phosphorylé après stimulation par l'insuline (Ruan et al., 2013). L'insuline stimule l'expression de GLUT4 et éventuellement sa translocation dans la rétine (Sanchez-Chavez et al., 2012). L'insuline retarde la mort des cônes dans un modèle murin de rétinopathie pigmentaire (Corrochano et al., 2008; Punzo et al., 2009), mais l'implication de GLUT4 dans cette activité protectrice n'a pas été décryptée.

Comme nous l'avons évoqué plus haut, TXNIP se lie à la TXN1 sous sa forme réduite, mais non sa forme oxydée (Tsubaki et al., 2020). L'expression du gène TXNIP est réduite par l'insuline et stimulée par le glucose (Parikh et al., 2007). TXNIP peut moduler l'expression et le trafic de GLUT1 pour empêcher l'absorption de glucose, mais on ne sait pas si TXNIP interfère avec la translocation de GLUT4 à la surface cellulaire.

6.13. Synthèse de la sérine

La D-3-phosphoglycérate déshydrogénase (PHGDH), une enzyme limitant la vitesse de synthèse de la sérine, catalyse l'oxydation réversible du 3-phospho-D-glycérate en 3-phosphonoxyypyruvate, la première étape de la voie de biosynthèse de la L-sérine phosphorylée (**Figure 37**). Alors que la sérine rétinienne est principalement dérivée du carbone glycolytique hépatique et non du carbone glycolytique rétinien chez les souris nouveau-nées (Singh et al., 2019), la perte de fonction de la PHGDH est associée à la télangiectasie maculaire de type 2 (MacTel), une maladie neurovasculaire dégénérative rare de la rétine. (Scerri et al., 2017). Le déficit fonctionnel de la PHGDH entraîne une diminution de la biosynthèse de la sérine et une accumulation d'espèces de céramides toxiques, les désoxy sphingolipides, dans les cellules de l'EPR (Eade et al., 2021).

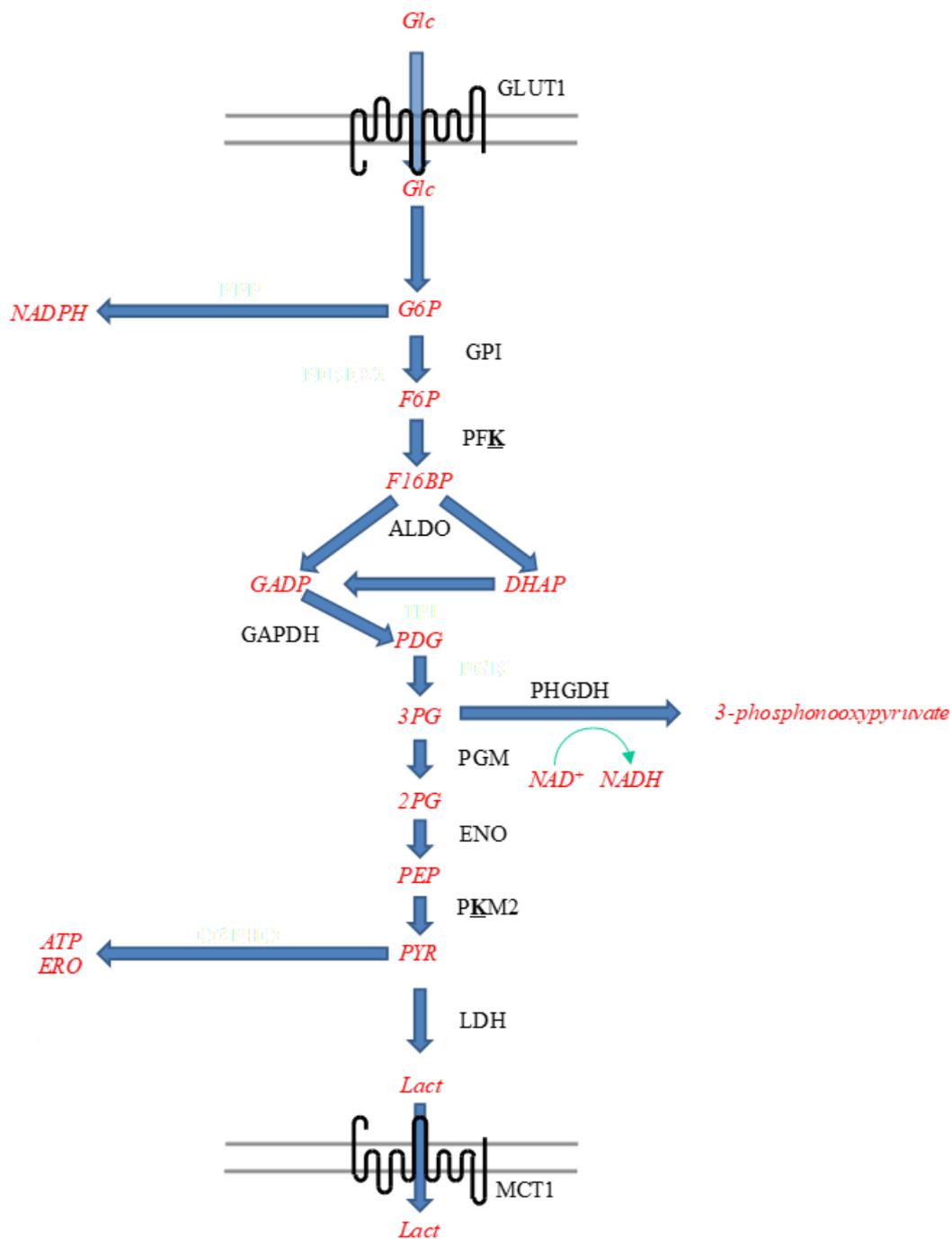
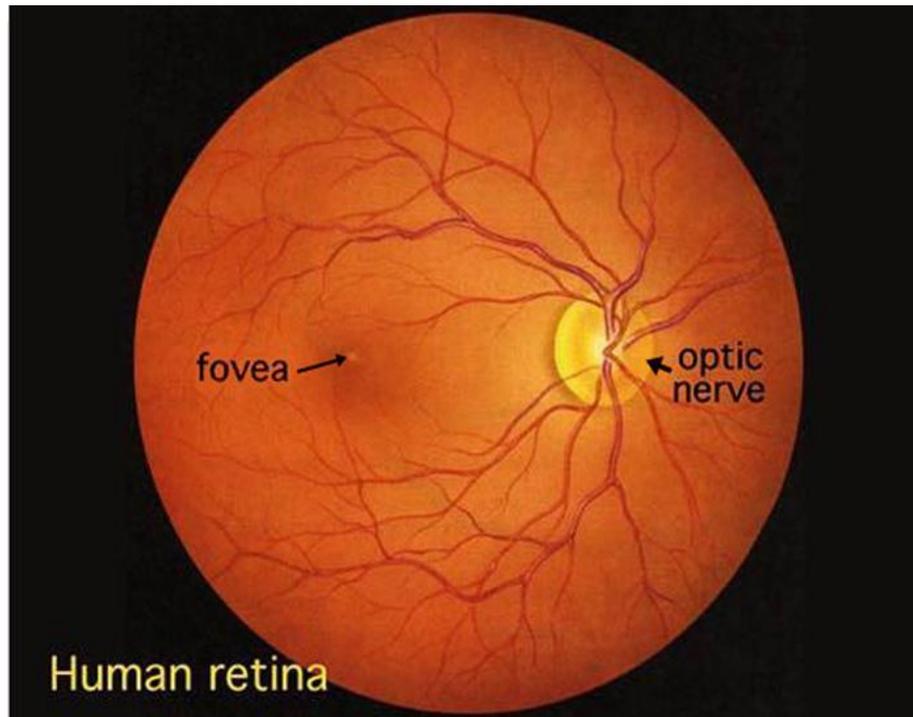


Figure 37 : Synthèse de la sérine. Glc : glucose, G6P : glucose-6-phosphate, NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate forme réduite, GPI : glucose-6-phosphate isomérase, F6P : fructose-6-phosphate, PFK : phosphofructokinase, F16BP : fructose-1,6-biphosphate, ALDO : aldolase, GADP : glycéraldéhyde-3-phosphate, DHAP : dihydroxyacétone phosphate, GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, PDG : 1,3 diphosphoglycérate, 3PG : 3-phospho-glycérate, PHGDH : D-3-phosphoglycérate déshydrogénase, PGM : phosphoglycérate mutase, 2PG : 2-phospho-glycérate, ENO : éno-lase, PEP : phosphoénolpyruvate, PKM2 : pyruvate kinase isoforme M2, PYR : pyruvate, LDH : lactate déshydrogénase, LACT : lactate, MCT1 : *Monocarboxylate transporter 1*, ATP : adénosine triphosphate, ERO : espèces réactives de l’oxygène.

A.



B.



Figure 38 : Fonds d'œil chez l'homme. A. Rétine saine. B. Rétine atteinte de rétinopathie pigmentaire *retinitis pigmentosa*. <http://webvision.med.utah.edu>

7. Les dégénérescences rétiniennes héréditaires

Les dégénérescences rétiniennes héréditaires sont un groupe de maladies dégénératives de la rétine qui peuvent conduire à la cécité avec des mutations dans des gènes essentiels à la fonction rétinienne (Duncan et al., 2018; Gregory-Evans et al., 2013). Le nombre de nouveaux loci qui causent des dégénérescences rétiniennes héréditaires augmente à un rythme qui correspond à l'identification des gènes responsables, de sorte que le nombre de loci est aujourd'hui de 316, avec 280 gènes responsables identifiés (<https://sph.uth.edu/retnet/>) (**Table I**)².

7.1. La rétinopathie pigmentaire

La rétinopathie pigmentaire (RP) est la forme la plus courante de ces maladies. La RP est une maladie dégénérative de la rétine caractérisée par des dépôts pigmentaires prédominants dans la rétine périphérique et par une relative préservation de la rétine centrale (**Figure 38**). En clinique, cela se traduit par une perte progressive de la vision nocturne qui a pour origine la mort des bâtonnets par apoptose. Cette apoptose est suivie secondairement par le dysfonctionnement et la mort des photorécepteurs à cônes concentrés au centre de la rétine, la fovéa. La perte des deux types de photorécepteurs se traduit par une perte totale de la vision, la cécité (**Figure 39**) (Portera-Cailliau et al., 1994). Cette pathologie touche près de 2 millions de personnes dans le monde (Hamel, 2006; Hartong et al., 2006) et reste la cause la plus fréquente de cécité chez des adultes, dans les pays industrialisés. En 1989, le gène RHO, codant la rhodopsine et responsable de RP dans une famille irlandaise a été identifié et localisé sur le bras long du chromosome 3. Cette découverte marquait le point de départ des études génétiques de la RP. Quelques temps après, fut découvert une seconde mutation dans le gène de la rhodopsine au sein d'une population de malades américains souffrant de RP. Depuis les années 1990, les mutations responsables de RP, touchent les gènes exprimés sélectivement par les bâtonnets (Kajiwara et al., 1994; McLaughlin et al., 1993; Rosenfeld et al., 1992) notamment les gènes codant des protéines de la cascade de phototransduction (rhodopsine,...), mais aussi des protéines du cytosquelette, des facteurs de transcription comme CRX (Swain et al., 1997) des facteurs d'épissage comme PRPF31 (Vithana et al., 2001), mais aussi des protéines exprimés par l'EPR comme MERTK (Nandrot et al., 2000). Comment une mutation dans un gène exprimé

² La Table I se trouve en annexe à la fin.

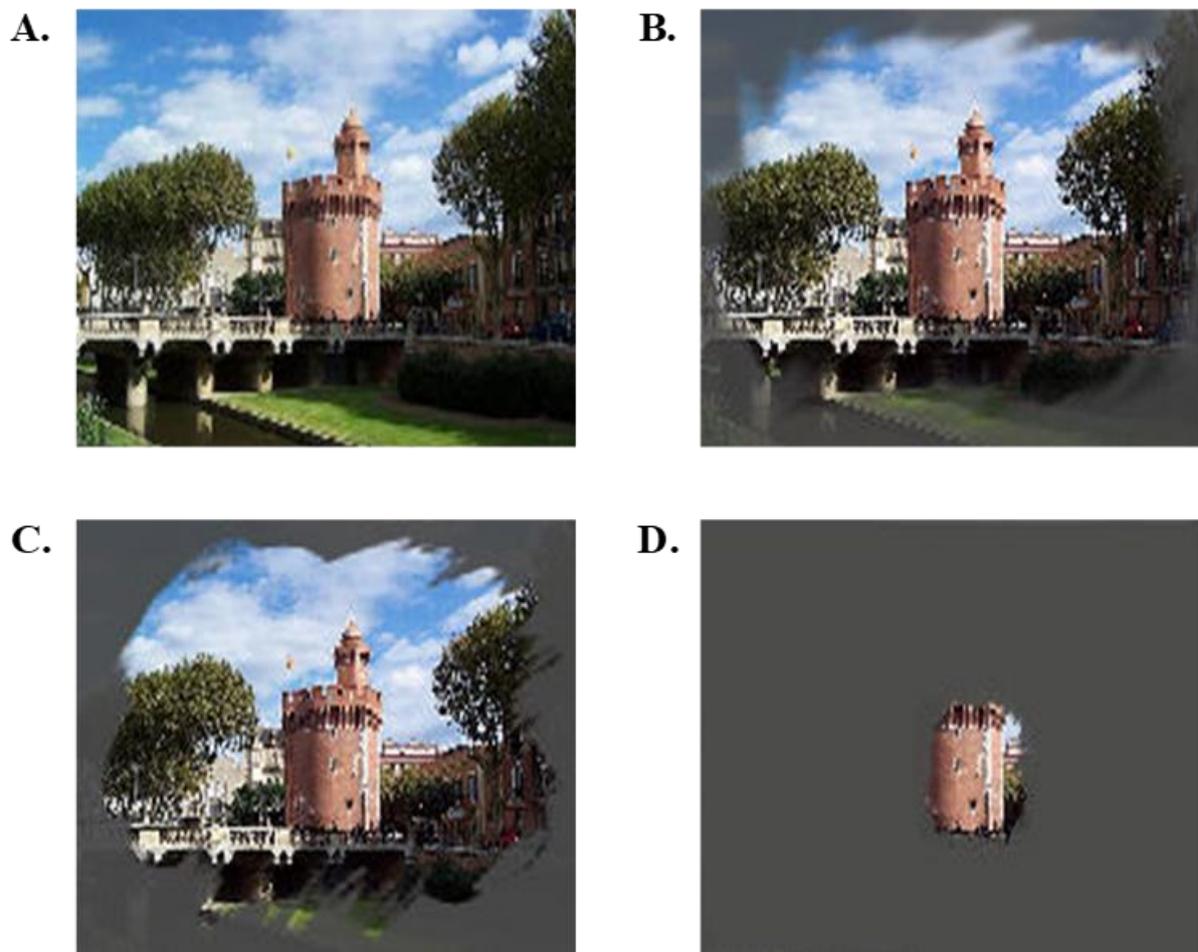


Figure 39 : Évolution de la vision chez un patient atteint de rétinopathie pigmentaire. A. Vision normale. **B.** Rétrécissement du champ visuel. **C.** Vision tubulaire (perte de la fonction des bâtonnets en périphérie de la rétine). **D.** Perte de la vision centrale.

par toutes les cellules du corps peut-t-il provoquer une RP non-syndromique reste une question sans réponse satisfaisante (Hamieh and Nandrot, 2019)

Bien que l'on sache comment ces mutations perturbent la fonction des photorécepteurs, les mécanismes précis qui conduisent à la mort de ces derniers ne sont toujours pas bien compris. Étant donné la nature extrêmement hétérogène de la RP, l'identification et la compréhension des mécanismes communs de mort cellulaire sont essentielles si nous voulons développer des traitements applicables à tous les allèles responsables de la maladie (Newton and Megaw, 2020). L'apoptose est la forme la plus étudiée de mort cellulaire programmée et est considérée depuis longtemps comme le mécanisme prédominant dans les maladies neurodégénératives, y compris la dégénérescence rétinienne (Choudhury et al., 2013; Radi et al., 2014). L'activation intrinsèque de l'apoptose par la détection de dommages cellulaires ou la perte de signaux de survie entraîne une augmentation de l'expression de protéines pro-apoptotiques telles que Bax, ce qui entraîne la libération de protéines mitochondriales, dont le cytochrome c (Elmore, 2007). L'apoptose peut également être activée de manière extrinsèque à la suite d'une interaction entre les ligands produits par les cellules immunitaires et les récepteurs de mort, tels que le facteur de nécrose tumorale (TNF), à la surface des cellules endommagées (Igney and Krammer, 2002).

Malgré le fait que la mort des photorécepteurs par apoptose ait été observée dans des modèles de dégénérescence rétinienne (Comitato et al., 2014), il est de plus en plus évident que des mécanismes de mort cellulaire indépendants de la caspase sont également impliqués dans de nombreuses maladies cécitantes, dont la RP (Arango-Gonzalez et al., 2014; Viringipurampeer et al., 2019). Plusieurs mécanismes ont été associés au déclenchement de la mort des photorécepteurs à bâtonnets dans des modèles murins de RP via les voies décrites précédemment. Il s'agit notamment de l'accumulation de protéines mal repliées ou mal localisées, entraînant un stress du réticulum endoplasmique (RE), une dérégulation de la signalisation du GMPc, une accumulation de Ca^{2+} , un stress oxydatif et des réponses inflammatoires. Il a été démontré que les niveaux d'oxygène dans la rétine externe augmentent dans les modèles de rat de RP à mesure que la dégénérescence progresse, en raison de la diminution de la consommation d'oxygène suite à la mort d'une partie des cellules des bâtonnets (Yu et al., 2004; Yu et al., 2000). L'exposition à des niveaux élevés d'oxygène qui en résulte devrait entraîner une augmentation du stress oxydatif dans les bâtonnets restants. Cependant, les microglies activées peuvent également constituer une source de superoxydes dans la rétine externe. Le stress du réticulum endoplasmique (RE) résulte d'un déséquilibre entre la demande

de synthèse protéique et la capacité du RE à plier les protéines. Ce déséquilibre peut être atténué par l'activation de la réponse aux protéines non repliées, un processus adaptatif qui réduit la charge de protéines non repliées dans le RE et rétablit l'homéostasie (Hetz and Papa, 2018). Le stress du RE causé par l'accumulation de protéines mutées qui ne peuvent pas se replier correctement est considéré comme l'un des mécanismes pathologiques résultant des mutations dominantes de la rhodopsine causant la RP. De plus, des chercheurs ont émis l'hypothèse que l'élévation de la GMPc entraîne une augmentation de l'afflux de Ca^{2+} par l'intermédiaire des canaux CNG (cyclic nucleotide-gated) (Ma et al., 2015a) . Les niveaux de GMPc sont élevés dans plusieurs modèles animaux de RP avec des mutations dans *Pde6b*, comme la souris *rd1* (Farber and Lolley, 1974). Cela suggère que l'influx incontrôlé de Ca^{2+} par des canaux CNG ouverts pourrait être responsable de l'initiation de la mort des photorécepteurs chez la souris *rd1*. Plusieurs études ont suggéré que l'accumulation de Ca^{2+} favorise la mort des photorécepteurs par apoptose dépendante des caspases. Une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire a été observée dans les photorécepteurs *rd1 in vitro*, accompagnée d'une augmentation de l'activation de la calpaïne et de la translocation nucléaire du facteur induisant l'apoptose (AIF) et de la caspase-12 (Sanges et al., 2006). Dans de nombreux modèles animaux de RP, une infiltration accrue de microglie, de glie de Müller et de macrophages activés se produit avant ou pendant les premiers stades de la dégénérescence des bâtonnets (Blank et al., 2017; Hughes et al., 2003). Il a été suggéré que les macrophages circulants dérivés des monocytes favorisent la mort des cellules des bâtonnets dans la RP (Guo et al., 2012).

7.2. La dégénérescence maculaire lié à l'âge

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de handicap visuel chez les personnes de plus de 50 ans. Toutes formes confondues, cette maladie concerne environ 8 % de la population française, mais sa fréquence augmente largement avec l'âge : elle touche 1 % des personnes de 50 à 55 ans, environ 10 % des 65–75 ans et de 25 à 30 % des plus de 75 ans. Cette pathologie affecte la macula, une région de la rétine qui contient en son centre la fovéa (Guillonnet et al., 2017). Cette région n'existe pas chez les espèces non primates, et par conséquent un modèle de rongeur de la DMLA est toujours un élément manquant de la recherche sur la DMLA. La maladie débute par une phase précoce, sans dégénérescence, appelée maculopathie liée à l'âge (MLA) ou « sèche précoce » (Bird et al., 1995). Cette phase se caractérise par l'accumulation de petits dépôts blanchâtres (ou « drüsen mous ») à l'intérieur et autour de la macula.

Ces dépôts sont visibles lors d'un simple examen de fond d'œil. Cette phase est le plus souvent asymptomatique, mais le patient peut éventuellement percevoir des déformations des lignes droites (« métamorphopsies ») et des taches floues. Une MLA peut rester stable tout au long de la vie. Néanmoins, dans environ la moitié des cas et sous l'influence de plusieurs facteurs, la MLA évolue en formes dégénératives tardives, atrophique ou humide (Sarks, 1976). Ces deux formes tardives ont une incidence à peu près équivalente. Elles conduisent à une dégradation irréversible de la macula et à une perte de la vision centrale affectant un seul œil ou les deux.

La première forme tardive appelé forme atrophique (ou « sèche avancée ») correspond à la disparition progressive des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), puis à celle des photorécepteurs situés au niveau de la macula. Il se forme alors une zone atrophique étendue dans la macula, visible par une simple observation de la rétine (fond d'œil). Dans la zone atrophique, malgré l'absence d'EPR, des cônes résiduels (et dans une moindre mesure des bâtonnets) survivent, mais ils sont dépourvus de leur segment externe nécessaire à la perception de la lumière (Bird et al., 2014; Eandi et al., 2016). Ce processus est lent et durant cette période, le patient conserve une vision relativement satisfaisante malgré une gêne pour la reconnaissance de détails. La deuxième forme tardive dite forme humide, ou néovasculaire ou exsudative, se traduit par une prolifération de nouveaux vaisseaux anormaux sous la rétine. Ces vaisseaux proviennent pour la plupart de la choroïde (néovascularisation choroïdienne), mais dans environ 10 à 15 % des cas de DMLA exsudative, la néovascularisation sous-rétinienne provient de la vascularisation rétinienne (angiomatose rétinienne)(Ghazi, 2002). Ces vaisseaux fragiles laissent diffuser du sérum, responsable d'un soulèvement de la rétine, et/ou du sang entraînant l'apparition d'hémorragies rétinienne. Cette forme évolue rapidement si elle n'est pas prise en charge, avec une perte de vision centrale en quelques semaines ou même quelques jours (la vision périphérique est maintenue). Ces dernières années, les traitements de la DMLA néovasculaire se sont considérablement améliorés avec le développement de la thérapie anti-angiogénique (anti-facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF)). La thérapie anti-angiogénique diminue la perméabilité et inhibe la formation de néovaisseaux et les changements dégénératifs associés. Néanmoins, dans 30% des cas, après plusieurs années de traitement, la maladie peut évoluer vers une forme atrophique qui est à l'heure actuelle sans traitement (Rofagha et al., 2013).

La DMLA est une maladie polygénique et multifactorielle par opposition aux dégénérescences rétinienne héréditaires mendéliennes, et donc le plus souvent monogéniques,

telles que la RP. L'âge et les antécédents familiaux de DMLA sont les deux principaux facteurs de risque de DMLA, auquel s'ajoute également la génétique et l'environnement. En effet, Il a été démontré qu'une personne ayant un frère ou un parent atteint de DMLA est 12 à 27 fois plus susceptible qu'une personne de la population générale de développer une DMLA (Shahid et al., 2012). Plusieurs polymorphismes génétiques associés à la maladie ont été mis en évidence. Parmi eux, des variants du gène codant le facteur H du complément (Haines et al., 2005; Zipfel et al., 2010) ou encore de celui codant l'HTRA1 (Yang et al., 2006), sont présents chez 30 % des personnes atteintes de DMLA contre seulement 10 % dans la population générale. En outre, la présence simultanée de trois variants (facteur H du complément, HTRA1 et facteurs C2-FB du complément) chez un même individu peut multiplier le risque de développer une DMLA par un facteur allant jusqu'à 250 (Fajnkuchen and Cohen, 2008). Néanmoins, aucun de ces polymorphismes ne peut déclencher la maladie à lui seul. Ces variants ne sont donc pas des marqueurs diagnostics. Les facteurs environnementaux sont également des facteurs de risques. Le tabagisme est le facteur le plus régulièrement associé à la DMLA. En effet, le tabac aurait un impact sur la réduction des pigments caroténoïdes maculaires, du flux sanguin choroïdien, sur le niveaux d'antioxydants sériques et sur les voies de détoxification de l'épithélium pigmentaire rétinien (Klein et al., 2004). L'obésité et l'alimentation sont également, dans une moindre mesure des facteurs associés à la DMLA.

En raison du vieillissement de la population, on s'attend à une forte augmentation du nombre de patients atteints de DMLA. La sénescence choroïdienne, l'inflammation et le dysfonctionnement de l'EPR avec le renouvellement défectueux du segment externe des photorécepteurs qui en résulte, sont les principales hypothèses proposées pour sa pathogenèse (Guillonnet et al., 2017). Récemment certaines hypothèses ont été émises sur l'importance de l'homéostasie de la rétine et sa dérégulation lors d'inflammations chroniques typiques observées lors de DMLA (Leveillard et al., 2019).

7.3. Les autres dégénérescences rétiniennes.

L'amaurose congénitale de Leber (LCA) est une affection autosomique récessive distincte des autres dystrophies rétiniennes et responsable d'une cécité congénitale. Cette pathologie est la forme la plus sévère des dystrophies rétiniennes héréditaires car le diagnostic est généralement posé à la naissance ou au cours des premiers mois de vie chez un enfant atteint de cécité totale (Perrault et al., 1996). Seize gènes différents ont été identifiés comme responsables de l'ACL.

Ces gènes sont tous exprimés dans les photorécepteurs ou l'épithélium pigmentaire rétinien, mais sont impliqués dans des mécanismes complètement différents. Les patients souffrant d'achromatopsie ont peu ou pas de fonction des cônes et une absence totale de perception des couleurs (Hirji et al., 2018; Kohl et al., 2000; Kohl et al., 1998). La maladie de Stargardt (STGD1) provoque une dégénérescence progressive des photorécepteurs de la macula au centre de la rétine qui se caractérise généralement par une perte progressive de la vision centrale entraînant une vision trouble et aggravant parfois la difficulté de s'adapter à l'obscurité. La vision périphérique est généralement normale (Allikmets, 1997). Cette pathologie apparaît en général entre l'âge de 6 et 15 ans. Contrairement à la RP, les dystrophies cônes-bâtonnets sont caractérisées par la séquence inverse de la RP, c'est-à-dire une atteinte primaire des cônes ou par une perte concomitante des deux types de photorécepteurs (Hamel, 2007). Il existe d'autres dégénérescence rétiniennes héréditaires moins handicapantes. Dans la cécité nocturne congénitale stationnaire (CSNB) caractérisé par la perte de la vision nocturne, seuls les bâtonnets sont affectés puisqu'ils sont non fonctionnels, mais viables (Zeitz et al., 2015). Toutes ces maladies décrites ci-dessus constituent les principales maladies rétiniennes héréditaires non syndromiques (Cremers et al., 2018). Parmi les formes syndromiques, on trouve le syndrome d'Usher, la cause la plus fréquente de surdité héréditaire provoquant également une RP (Eudy et al., 1998; Weil et al., 1995) et le syndrome de Bardet Biedl qui est une ciliopathie caractérisée par une dystrophie rétinienne accompagnée d'obésité, de polydactylie, d'insuffisance rénale, d'hypogonadisme et de troubles cognitifs (Katsanis et al., 2000; Mockel et al., 2011). Les gènes qui causent ce syndrome participent à la formation d'un complexe protéique stable nommé le BBSome impliqué dans le trafic vésiculaire via le cil connecteur entre le segment interne et externe des photorécepteurs (Nachury et al., 2007).

La génétique des dégénérescences rétiniennes héréditaires est très complexe (**Table I**). Parmi les gènes de la RP dont le profil a pu être examiné, le profil d'expression type bâtonnets représente 45% (Blond and Leveillard, 2019). La liste des gènes porteurs de mutations causant la RP est enrichie en gènes exprimés par les photorécepteurs (bâtonnets et cônes). Pratiquement tous les gènes impliqués dans la cascade de phototransduction et dans le cycle de la vitamine A portent des mutations chez des patients souffrant de dégénérescences rétiniennes héréditaires (Humphries et al., 1992; Thompson and Gal, 2003). Il est intéressant de s'arrêter sur le gène *RPE65* qui a été identifié comme un gène codant une protéine de 65 kDa exprimée spécifiquement par l'EPR (Hamel et al., 1993). *RPE65* est impliqué dans l'amaurose congénitale de Leber, la seule forme de dégénérescence rétinienne héréditaire traitée par thérapie génique

corrective à ce jour (Acland et al., 2001; Bainbridge et al., 2008; Cehajic-Kapetanovic et al., 2020; Cideciyan et al., 2013; Maguire et al., 2008; Patel et al., 2016; Russell et al., 2017).

8. Les thérapies des dégénérescences rétiniennes héréditaires

8.1 La thérapie génique

Les dégénérescences rétiniennes héréditaires sont des maladies génétiques dont les signes cliniques sont hétérogènes, mais qui mènent inexorablement à la cécité. Ces maladies émergent désormais comme cibles de thérapies géniques pour des essais cliniques (Kumaran et al., 2018; Takahashi et al., 2018; Trapani and Auricchio, 2019). La ferveur pour ces thérapies est motivée par le récent traitement de l'amaurose congénitale de Leber (LCA) une maladie cécitante grave avec mutation autosomiques récessives du gène *RPE65* (LCA2) par un vecteur viral adéno-associé recombinant (AAV) qui corrige le déficit génétique chez ces patients (Apte, 2018; Kaiser, 2011). La protéine RPE65 a été découverte en 1993 comme étant une protéine de 65 kDa exprimée spécifiquement par l'EPR (Hamel et al., 1993). Le même groupe a rapporté en 1997 que des mutations perte de fonction dans le gène codant RPE65 causent certaines formes de LCA (LCA2) (Marlhens et al., 1997), et que RPE65 est essentiel pour la trans-isomérisation des esters tout-*trans* rétinol, en observant une accumulation de ces esters dans l'EPR de la souris *Rpe65*^{-/-} (Redmond et al., 1998). L'accélération de cette recherche est liée à la découverte d'un modèle animal de LCA2 de grande taille, un chien briard (Aguirre et al., 1998). En 2001, un consortium de vétérinaires, de cliniciens et biologistes a montré le bénéfice pour la vision de l'injection sous-rétinienne d'un AAV de sérotype 2 codant RPE65 dans ce modèle canin (Acland et al., 2001). Lancelot, le premier chien briard dont la vision de l'œil traité a été restaurée a été pris en photo devant le congrès américain lors d'une réunion destinée à redonner espoir dans la thérapie génique après des années de doute (Barbour, 2000; Lehrman, 1999; Marshall, 1999). Cela a encouragé trois groupes indépendants à lancer les premières études chez l'homme. Celles-ci ont conduit au succès de la phase I d'essais cliniques, publiés en 2008 (Bainbridge et al., 2008; Cideciyan et al., 2008; Maguire et al., 2008). Néanmoins, le bénéfice du traitement sur une longue durée était controversé (Ledford, 2015). Le groupe dirigé par Jean Bennett a rapporté l'absence d'effets indésirables associés au traitement de l'œil controlatéral des patients (Bennett et al., 2012), tandis que les deux autres groupes ont signalé l'absence de bénéfice pour les patients traités sur le long terme

(Bainbridge et al., 2015; Cideciyan et al., 2013; Jacobson et al., 2015b). L'absence de persistance du bénéfice du traitement chez certains patients a été interprétée en s'appuyant sur l'histoire naturelle de la maladie (Beltran et al., 2015; Boye et al., 2014). L'absence de conversion du tout-*trans*-rétinol en 11-*cis*-rétinal lié à une mutation du gène *RPE65* interrompt la réapprovisionnement des photorécepteurs en opsines fonctionnelles et sensibles à la lumière (Wright et al., 2015). L'administration d'une copie fonctionnelle de *RPE65* par thérapie génique correctrice rétablit ce déficit visuel. Mais, comme les patients LCA2 subissent une dégénérescence des photorécepteurs dès la première décennie de vie, la thérapie ne semble pas enrayer le processus de perte des photorécepteurs qui se poursuit après traitement ce qui limite le bénéfice de cette thérapie (Caruso et al., 2010). Par conséquent, si la maladie a progressé jusqu'à un certain stade, la restauration de la fonction de RPE65 améliore la fonction visuelle mais ne serait pas en mesure de stopper la dégénérescence des photorécepteurs. D'un autre côté, Les résultats d'un essai clinique randomisé de phase 3 financé par *Spark Therapeutics* sur les bénéfices de l'injection sous-rétinienne d'AAV2-hRPE65v2 développée par Jean Bennett ont été publiés en juillet 2017. Cette étude inclut des patients pour lesquels la vision a été préservée pendant 3 ans (Russell et al., 2017). La *food and drug administration* (FDA) des États-Unis a approuvé la thérapie génique utilisant AAV2-hRPE65v2 (Luxturna®) pour le traitement des patients présentant des mutations bialléliques *RPE65* en décembre 2017, suivie par l'agence européenne des médicaments (AEM) en novembre 2018 (Apte, 2018). La société *Spark Therapeutics* a annoncé que la société suivra les patients traités pendant 15 ans.

Jean Bennett et son équipe ont été les premiers à se lancer dans cette grande aventure. De nombreuses autres dégénérescences rétiniennes héréditaires récessives pourraient être traitées en restaurant la fonction du gène altérée par les mutations en introduisant une copie normale de ce gène (Trapani and Auricchio, 2019). Le seul argument négatif contre cette approche est un coût très élevé pour la société car il existe plus d'une centaine de gènes qu'il faudrait corriger un par un (Darrow, 2019). Les problèmes de coût par rapport aux avantages deviendront de plus en plus importants à mesure qu'une vague de nouvelles thérapies coûteuses sera testée sur des populations de patients d'effectif de plus en plus réduit seront développées et approuvées (Blond and Leveillard, 2019).

Pour les formes dominantes de dégénérescences rétiniennes héréditaires, la situation est plus complexe comme l'illustrent les mutations dominantes du gène du facteur d'épissage *PRPF31* (Vithana et al., 2001). Étonnamment, la plupart des pedigrees familiaux contiennent des individus porteurs affectés et non affectés. Ceci s'explique par une haplo-insuffisance

variable (Rose and Bhattacharya, 2016). Ces familles sont composées de membres de compositions génétiques polymorphes. Dans certains cas, le taux de protéines résiduelles, exprimé grâce à l'allèle non muté, sera suffisant pour une fonction rétinienne normale et dans ce cas-là, le sujet sera asymptotique. Dans d'autres cas, chez un autre membre de ce pedigree, la mutation dominante de *PRPF31* entraînera une expression de la protéine résiduelle insuffisante pour une fonction rétinienne normale et ce sujet sera symptomatique. Dans ce dernier cas, l'administration dans la rétine d'une copie normale du gène *PRPF31* devrait permettre dépasser ce seuil d'expression transformant des patients en porteurs asymptotiques. Ceci est un cas de transmission dominante avec haplo-insuffisance.

La situation est encore beaucoup plus problématique dans le cas des mutations du gène de la rhodopsine (*RHO*), le premier gène identifié comme responsable de la RP (Dryja et al., 1990a). Les mutations dominantes entraînent soit un gain de fonction, soit un effet dominant négatif (Mendes et al., 2005). Les mutations de *RHO* ont été classées en fonction de leur caractéristiques biochimiques ou cellulaires : déficits de transport vers le segment externe (classe I), repliement (classe II), endocytose (classe III), stabilité protéique (classe IV), augmentation du taux d'activation de la transducine (classe V) ou activation constitutive (classe VI). Il a été démontré que la protéine correctement repliée était bénéfique à la fonction des bâtonnets dans un modèle de rat dominant porteur d'une mutation de classe II (Gorbatyuk et al., 2010). La première tentative thérapeutique sur un modèle de rongeur pour cette maladie fut réalisée en 1998. Les chercheurs utilisèrent un système de ribozyme modifié, un ARN catalytique qui déclenche spécifiquement la destruction de l'ARNm codant la rhodopsine mutante de classe II, RHO^{P23H} (LaVail et al., 2000; Lewin et al., 1998). La limite évidente d'une telle approche est que le ribozyme catalytique est conçu pour cibler une mutation spécifique, alors que plus de 150 mutations ponctuelles distinctes du gène de la rhodopsine provoquent la RP (Hauswirth and Lewin, 2000). Aux États-Unis, la majorité des mutations de la rhodopsine à l'origine de la maladie est attribuable à une seule variation de séquence au niveau du codon 23, mais cette mutation est extrêmement rare en Europe (Audo et al., 2010; Fernandez-San Jose et al., 2015; Malanson and Lem, 2009). La maladie associée à des mutations dans ce codon se traduit par un phénotype clinique relativement bénin (Bonilha et al., 2015; Oh et al., 2003). Pour contourner la pléthore de mutations, une approche basée sur l'interférence ARN a été explorée et validée dans divers modèles de RP avec des mutations dominantes dans le gène de la rhodopsine (Cideciyan et al., 2018; O'Reilly et al., 2007). La stratégie combine l'extinction

de l'expression du gène endogène de la rhodopsine, à la fois l'allèle muté et l'allèle sauvage de la rhodopsine et l'apport simultanée d'ARNm qui code pour la rhodopsine normale qui est conçu pour être résistant à l'ARN interférent en utilisant la dégénérescence du code génétique (Kiang et al., 2005). Une autre technique thérapeutique a été développée par Botta et coll qui utilise la capacité du facteur de transcription *krüppel-like factor 15* (KLF15) à reconnaître un élément d'ADN dans le promoteur de la rhodopsine pour éteindre son expression après l'administration d'un vecteur AAV conduisant à l'expression ectopique de KLF15 dans les photorécepteurs à bâtonnets (Botta et al., 2017).

8.2. L'édition du génome

Les progrès récents dans l'édition du génome à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9, qui consiste de manière simple et efficace à couper l'ADN à un endroit bien précis du génome dans n'importe quelles cellules, ont conduit au développement d'approches thérapeutiques de la RP par édition du génome *in vivo* (Suzuki et al., 2016; Vagni et al., 2019). Le ciblage *in vivo* du gène *neural retina-specific leucine zipper* (*NRL*) au sein des bâtonnets à l'aide de la technologie CRISPR-Cas9 a été utilisé pour réprimer la différenciation des bâtonnets afin de contourner l'effet délétère des mutations de gènes exprimés par les bâtonnets lors de leur maturation (Moreno et al., 2018).

8.3. La neuroprotection

D'autres approches de thérapie indépendantes des mutations ont été développées, visant à prévenir un événement commun de la perte des bâtonnets dans la RP. Les chercheurs ont commencé par cibler l'apoptose puisque c'est le destin final des bâtonnets dans les modèles animaux et chez les patients atteints de RP (Marigo, 2007; Samardzija et al., 2006). La surexpression de l'histone désacétylase 4 (HDAC4), ou même de son domaine N-terminal, supprime la mort cellulaire et prolonge la survie des bâtonnets dans un modèle autosomique récessif de RP, la souris *rd1*, un modèle autosomique de RP (Guo et al., 2015). L'administration du facteur neurotrophique ciliaire (CNTF) protège les photorécepteurs de divers modèles murins de RP (Lipinski et al., 2015), mais son utilisation comme traitement de la RP n'a pas été confirmée lors de l'essai clinique de phase 3 (Birch et al., 2016). La régulation à la baisse de l'activation de la microglie à l'aide du microARN, miR-204 (Karali et al., 2020) ou de la

fractalkine, une forme soluble de la chimiokine CX3CL1 prévient la mort cellulaire des photorécepteurs dans plusieurs modèles murins de RP (Wang et al., 2019a). Les dommages oxydatifs ont été ciblés avec succès en délivrant le facteur nucléaire du facteur de transcription, *erythroid 2 like 2* (NFE2L2), connu aussi sous le nom de NRF2, qui régule des centaines de gènes qui protègent les photorécepteurs des effets délétères du stress oxydant (Xiong et al., 2015). Le fer est sans doute impliqué dans les dommages résultant de l'oxydation puisque la transferrine injectée par voie intrapéritonéale empêche la dégénérescence des photorécepteurs chez les souris *rd10*, un modèle autosomique de RP (Picard et al., 2010). D'autres approches ont été utilisées pour subvenir aux besoins métaboliques des photorécepteurs (Petit and Punzo, 2015; Zhang et al., 2016).

La limite principale de ces approches ciblant les bâtonnets est que les patients atteints de RP sont souvent identifiés par les ophtalmologistes après une consultation entreprise à un stade où les photorécepteurs à bâtonnets sont déjà morts. La dégénérescence des bâtonnets conduit à la cécité nocturne. Ainsi, pour les patients vivant en milieu urbain, les problèmes de vision nocturne peuvent ne pas apparaître avant que la maladie rétinienne ne soit à un stade avancé. Par conséquent, prévenir la dégénérescence des bâtonnets ne sera plus difficile pour ces patients.

Il existe également des preuves d'un excès de stress oxydatif dans les yeux des patients atteints de RP. La N-acétylcystéine (NAC) est un dérivé de la L-cystéine qui neutralise elle-même les espèces réactives de l'oxygène, mais qui est également convertie en cystéine utilisée pour biosynthétiser le glutathion, un composant majeur dans le maintien du potentiel redox du cytoplasme de la cellule. Dans le modèle de souris *rd10* de RP, l'administration orale de NAC a favorisé la survie prolongée des cônes et le maintien de la fonction électrorétinographique des cônes. Une étude de phase I visant à évaluer l'innocuité, la tolérabilité et les effets du traitement par la NAC a été réalisée (Campochiaro et al., 2020). Trente sujets ayant reçu un diagnostic clinique de RP avec des symptômes d'héméralopie et de réduction du champ visuel périphérique ont été recrutés dans l'étude. Les résultats suggèrent qu'une partie de la réduction de la sensibilité maculaire observée dans les yeux des patients non traités atteints de RP modérément avancée est probablement due initialement à un dysfonctionnement des cônes plutôt qu'à la mort de ces derniers et que la réduction du stress oxydatif par l'administration de NAC peut améliorer la fonction des cônes, entraînant une amélioration de la sensibilité maculaire et de légères améliorations de l'acuité visuelle. Mais un total de 70 événements indésirables (EI) sont survenus pendant les 36 semaines de l'essai. On a estimé que 11 EI étaient probablement liés à la NAC et 9 d'entre eux concernaient le système gastro-intestinal. La plupart étaient d'intensité

légère à modérée et se sont résolus spontanément sans interruption de la posologie. Cependant, chez 3 sujets, l'apparition des symptômes a coïncidé avec une augmentation de la dose, de sorte que le bénéfice du traitement est contrebalancé par les effets secondaires de la molécule synthétique.

9. Rod-derived Cone Viability Factor

Le diagnostic de RP existe probablement historiquement depuis des centaines, voire des milliers d'années, mais n'a été reconnu comme une forme aggravée de cécité nocturne qu'après l'invention de l'ophtalmoscope en 1851. Dans la RP, il y a une progression de la cécité nocturne qui provient de la mort des photorécepteurs en bâtonnets par apoptose, suivi par la dégénérescence des cônes qui conduit à la cécité totale (Hartong et al., 2006; Portera-Cailliau et al., 1994). La cécité nocturne stationnaire congénitale (CSNB) n'entraîne pas la perte de la vision centrale. Le pedigree le plus remarquable du CSNB comprenant 2 121 personnes remonte à Jean Nougaret, boucher du XVII^e siècle (1637-1719) de Vendémian dans l'Hérault. En 1831, un descendant de la cinquième génération a demandé une exemption du service militaire en raison de sa mauvaise vision nocturne. Malheureusement pour lui, l'examen révéla que le jeune homme savait lire lors d'un test réalisé avec l'éclairage d'une bougie, donc dans des conditions photopiques qui impliquent la fonction des cônes. Le médecin a donc conclu que cette personne simulait et elle fut condamnée à sept ans de service militaire. Ce n'est qu'en 1838 que la transmission familiale de sa cécité nocturne a été démontrée par l'ophtalmologiste belge Florent Cunier, libérant finalement cette personne du service militaire (Snyder, 1963). En 1996, une mutation faux-sens du gène codant pour la sous-unité alpha de la transducine des bâtonnet (*GNAT1*) à l'origine de la pathologie de la famille Nougaret a été identifiée chez des membres de onzième génération (Dryja et al., 1996). Cette histoire divertissante a son importance aujourd'hui puisque certaines personnes au sein de cet immense pedigree, incertaines d'être affectées, se sont révélées être aussi aveugles que leurs proches par la même mutation du gène *GNAT1* (Rosenberg et al., 1991). La perturbation de la vision nocturne de la CSNB est négligée par ceux qui en sont atteints car elle est très subjective, surtout pour les individus vivant aujourd'hui en milieu urbain, bien éclairé (Zeitz et al., 2015). Par conséquent, poser un diagnostic sur une RP en phase précoce ou une CSNB n'est pas chose facile de par le peu d'impact sur la vie quotidienne que peuvent faire ressentir les premiers symptômes. Dans le cas de la RP, si un diagnostic précoce était établi, l'effet de certaines thérapies serait plus à même

de stopper la perte de la vision centrale. Cela a conduit le professeur Alan Wright à déclarer que le maintien des cônes en vie aiderait quelque 1,5 million de personnes dans le monde à voir ainsi que Jean Nougaret et ses descendants (Wright, 1997). Plus récemment, le professeur Henry Kaplan a réaffirmé que si la thérapie pouvait prévenir ou inverser l'apparition de la dégénérescence des cônes dans la macula, la plupart des patients seraient capables de mener une vie normale (Kaplan et al., 2017). Cette stratégie est médicalement applicable puisque chez les patients et dans le cas d'un modèle canin de RP, la discrimination visuelle peut être opérationnelle avec un nombre très limité de cônes fonctionnels (Geller and Sieving, 1993; Petersen-Jones et al., 2018).

Les causes de la dégénérescence et finalement de la mort des cônes sont restées obscures pendant des années (Cronin et al., 2007). L'identification de la première mutation causant la RP chez l'homme a laissé la communauté scientifique perplexe. Après avoir localisé le gène sur un court intervalle du bras long du chromosome 3, une mutation dominante du gène codant la rhodopsine (*RHO*), le pigment visuel des bâtonnets, a été identifiée (Applebury, 1990; Daiger et al., 1989; Dryja et al., 1990b). Les mesures de l'électrorétinogramme (ERG) des membres affectés de cette famille ont confirmé que la RP progresse avec une baisse de la réponse des bâtonnets anormalement précoce, vers une réponse ultérieurement altérée des cônes. Pour les cas avancés, la RP est associée à une perte complète des bâtonnets et quelques cônes fovéaux persistant avec des segments externes raccourcis et désorganisés (Kolb and Gouras, 1974). La raison pour laquelle une mutation dans un gène exprimé exclusivement dans les bâtonnets peut conduire à une dégénérescence généralisée des bâtonnets et des cônes chez ces patients était déroutante (Berson, 1990). Il a été observé que la fonction du segment externe du cône reste normale jusqu'à ce que plus de 75% du segment externe du bâtonnet soit perdu (Cideciyan et al., 1998).

Cette séquence de dégénérescence en deux phases a été initialement décrite chez des souris de dégénérescence rétinienne (*rd1*) par Carter-Dawson et coll. (Carter-Dawson et al., 1978). La souris *rd1* porte une mutation récessive du gène de la sous-unité bêta de la phosphodiésterase cGMP-dépendante, *Pde6b*, exprimé sélectivement par des bâtonnets (Bowes et al., 1990). Des mutations dans le gène orthologue humain, *PDE6B*, sont à l'origine d'une RP autosomique récessive (McLaughlin et al., 1993). L'élimination spécifique des photorécepteurs à bâtonnets chez une souris transgénique entraîne l'incapacité des photorécepteurs à cônes à renouveler leurs segments externes (McCall et al., 1996; Usukura et al., 1994). Ce phénomène a été observé

dans divers modèles animaux de RP, notamment des rongeurs, des porcs, des chiens et même des crapauds (Choi et al., 2011; McCall et al., 1996; Mieziowska et al., 1993; Scott et al., 2017). De plus, l'analyse de la cinétique de la mort des bâtonnets et des cônes dans plusieurs modèles murins de RP exclut que les bâtonnets mourants intoxiquent les cônes (Punzo et al., 2009). La transplantation d'une couche de photorécepteurs de type sauvage (97% de bâtonnets chez la souris) dans l'espace sous-rétinien de la souris *rdl* ralentit la dégénérescence secondaire des cônes (Mohand-Said et al., 2000; Mohand-Said et al., 1997). Nous avons montré que cet effet protecteur est dû à des molécules solubles provenant de la rétine neurale et non de l'EPR adjacent (Mohand-Said et al., 1998). Une caractérisation partielle de cette interaction trophique a montré que l'activité est portée par des molécules ayant un poids moléculaire apparent compatible avec celui de protéines (Fintz et al., 2003). Dans la même étude, nous avons montré que la fraction est active sur une culture enrichie en cônes réalisée à partir d'embryons de poulet, modèle développé à l'origine par Ruben Adler (Adler and Hatlee, 1989; Millet-Puel et al., 2021). L'existence de protéines protectrices des cônes dans la matrice extracellulaire entourant les photorécepteurs a été suggérée par une étude reposant sur ce système biologique, dans lequel les photorécepteurs dégénèrent spontanément en culture entre 7 et 10 jours après ensemencement (Hewitt et al., 1990). La dégénérescence des bâtonnets de la rétine *rdl* pouvait donc entraîner la perte d'expression de facteurs protéiques sécrétés nécessaires à la survie des cônes. Chez les patients atteints de RP, le dysfonctionnement secondaire des cônes conduit à la cécité puisque les cônes sont responsables non seulement de la vision des couleurs, mais aussi de toutes les fonctions utiles (perception des détails, lecture)

e la vision à la lumière du jour (Weleber and Gregory-Evans, 2006). Les personnes atteintes de maladies génétiques ou du vieillissement qui altèrent la fonction des cônes sont fortement handicapées. Cela a favorisé un très grand nombre d'études sur les dégénérescences rétiniennes héréditaires (DIR) dans le but de trouver des traitements pour ces maladies cécitantes (Duncan et al., 2018; Roska and Sahel, 2018). L'identification des protéines capables de prévenir la dégénérescence spontanée des cellules dans la culture enrichie en cônes a été réalisée (Leveillard et al., 2004).

La rétine des vertébrés est composée des deux types de photorécepteurs, les photorécepteurs à bâtonnets pour la vision à faible intensité de lumière et les photorécepteurs à cône pour la lumière à forte intensité, la couleur et l'acuité visuelle. L'acuité visuelle des primates repose sur une région au centre de la rétine, appelée la fovéa, qui est enrichie en cônes, mais dans l'ensemble, les cônes ne représentent que 5% de tous les photorécepteurs chez les

primates. Par conséquent, l'étude et l'analyse des cônes dans la rétine de primate mais surtout la préparation de culture de cônes est techniquement problématique. Toutes les autres espèces de mammifères n'ont pas de fovéa et le pourcentage de cônes est encore plus faible pour les rongeurs (3%) qui sont le plus couramment utilisés dans la recherche sur la rétine. Ce n'est pas le cas pour les espèces aviaires, pour lesquelles les cônes dominent la rétine des oiseaux. Les dinosaures, qui ont dominé l'écosystème lors de l'apparition des mammifères au cours de l'évolution, sont à l'origine phylogénétique des oiseaux (Brownstein, 2019). La conséquence d'une telle compétition entre les dinosaures et les premiers mammifères a conduit à ce que les mammifères sont principalement nocturnes avec des rétines dominées par des bâtonnets. Ce n'est que plus tard au cours de l'évolution que la vision diurne de certaines espèces de mammifères, parmi lesquelles les primates, est devenue un avantage au regard de la pression de sélection. Néanmoins, la période ancestrale demeure un atavisme de la vision des mammifères (Borges et al., 2018; Heesy and Hall, 2010). En étudiant la différenciation des cellules rétinienne, Adler et Hatlee ont montré que les photorécepteurs représentaient environ 70% des cellules différenciées rétinienne dans les cultures dérivées de poulet au jour embryonnaire 6 (ED6) ou au stade 29 selon la classification de Hamburger et Hamilton (Adler and Hatlee, 1989; Hamburger and Hamilton, 1951). En raison de la prévalence de cônes dans la rétine de poulet, des cultures de cellules rétinienne d'embryons de poulet ED6 ont été développées en tant que cultures enrichies en cônes (Millet-Puel et al., 2021).

Au cours du criblage à haut débit, une banque d'ADN complémentaire (ADNc) rétinien a été transfecté dans des cellules COS-1. L'équivalent de 210 000 clones contenant entre autres les protéines sécrétées ont été testés sur des cônes de cultures enrichies en cônes et la viabilité a été mesurée après sept jours de culture. Un ADNc avec un cadre de lecture ouvert de 109 acides aminés a été identifié et la protéine a été nommée facteur de viabilité de cône dérivé de bâtonnets ou *Rod derived Cone Viability Factor* (RdCVF). RdCVF est un variant d'épissage du gène *nucleoredoxin-like-1* (*NXNLI*) correspondant à la rétention d'intron et à un codon d'arrêt conservé dans le cadre de lecture (OMIM # 608791) traduit à partir d'un ARN messager d'environ 7 kb (Ait-Ali et al., 2015). L'expression de *NXNLI* est dépendante des bâtonnets dans la rétine de souris et humaine et son promoteur est régulé par l'homéoprotéine CRX (Delyfer et al., 2011; Lambard et al., 2010; Reichman et al., 2010).

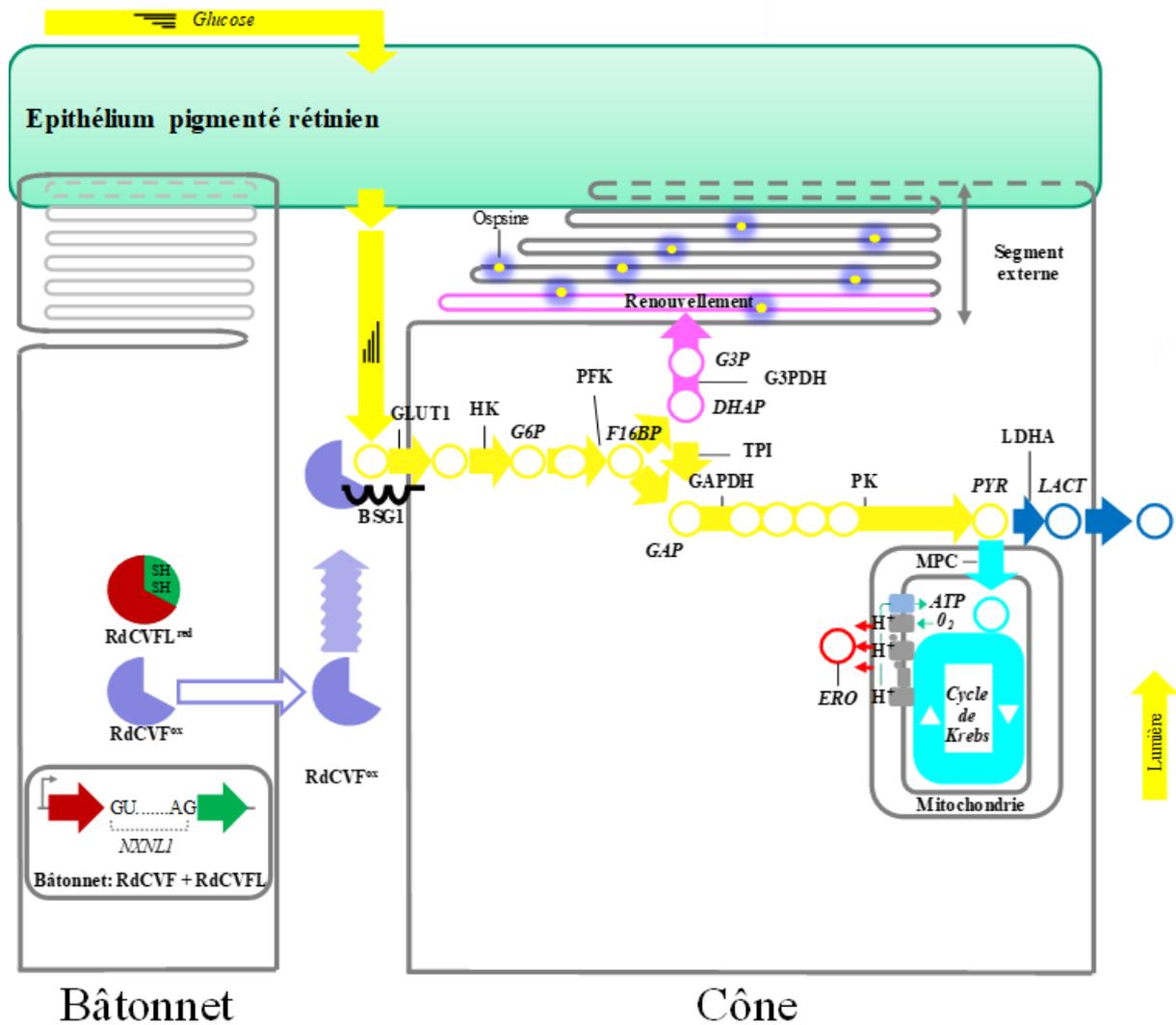


Figure 40 : Signalisation métabolique de RdCVF. BSG : Basigin, HK : hexokinase, G6P : glucose-6-phosphate, PFK : phosphofruktokinase, F16BP : fructose-1,6-biphosphate, G3P : glycérol-3-phosphate, DHAP: dihydroxyacétone phosphate, G3PDH: Glycérol-3-phosphate déshydrogénase, TPI : triose phosphate isomérase, GAP : glycéraldéhyde-3-phosphate, GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, PK : pyruvate kinase, PYR : pyruvate, LDHA : lactate déshydrogénase A, LACT : lactate, MPC : *mitochondrial pyruvate carrier*, ATP : adénosine triphosphate, ERO : espèces réactives de l'oxygène.

L'injection de la protéine RdCVF recombinante protège les cônes de la souris *rd1* (Leveillard et al., 2004). Dans un modèle transgénique de RP autosomique dominante avec l'expression de la protéine mutante rhodopsine sous le contrôle d'un promoteur des bâtonnets, nous avons montré que la protéine RdCVF humaine synthétique prévient la perte de fonction des cônes grâce à l'enregistrement de l'ERG photopique (Yang et al., 2009). La protection, observée sur une période de 3 mois, est associée à la préservation des segments externes des cônes, la structure subcellulaire qui porte les molécules photosensibles, les opsines (Leveillard and Sahel, 2010; Sahel et al., 2013). Des résultats similaires ont été obtenus par l'administration de RdCVF par thérapie génique (Sahel et al., 2013). Plus récemment, nous avons montré que la fonction des cônes peut être préservée chez la souris *rd10*, un deuxième modèle de RP récessive, en délivrant RdCVF à l'aide d'un vecteur AAV recombinant (Byrne et al., 2015). L'effet de RdCVF est indépendant de l'origine génétique de la maladie, donc une thérapie visant à prévenir la perte de vision centrale devrait bénéficier à tous les patients atteints de RP quelle que soit la mutation qu'ils portent dans l'un des 69 gènes connus à ce jour (**Table I**).

Un récepteur de surface cellulaire pour RdCVF a été identifié par *far-western blotting* (Ait-Ali et al., 2015), le récepteur basigin-1 (BSG1, UniProt - P18572). L'unique domaine transmembranaire de la protéine BSG est exprimée sous deux isoformes différentes. La protéine BSG2 possède deux domaines extracellulaires d'immunoglobuline (Ig) et est largement exprimée dans de nombreux organes où elle est impliquée dans l'adressage des transporteurs de lactate à la membrane. La protéine BSG1, produite par épissage alternatif, possède un troisième domaine Ig et son expression est restreinte aux photorécepteurs (Ochrietor et al., 2003). Nous avons observé que RdCVF interagit spécifiquement avec un complexe composé de BSG1 et du transporteur de glucose GLUT1 (SLC2A1, UniProt - P17809) à la surface des cônes conduisant à l'augmentation de l'entrée de glucose dans les cônes. Le glucose est métabolisé par les cônes via la glycolyse aérobie (Leveillard, 2015). La bifurcation de la phosphorylation oxydative se produit après la production de pyruvate par glycolyse. Le pyruvate peut être transporté vers les mitochondries par le transporteur de pyruvate mitochondrial (MPC) (**Figure 26**) où il est métabolisé par le cycle de Krebs (**Figure 27**) qui est lié à la chaîne respiratoire mitochondriale pour produire de l'ATP dans des conditions aérobies (**Figure 28**). L'ensemble du processus est connu sous le nom de phosphorylation oxydative (OXPHO). Le pyruvate peut également être métabolisé pour produire du lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) (**Figure 19**). Le lactate est ensuite transporté hors de la cellule par des transporteurs de lactate ou monocarboxylate transporteur (MCT). La protéine RdCVF stimule la glycolyse aérobie pour fournir des

RdCVF-L

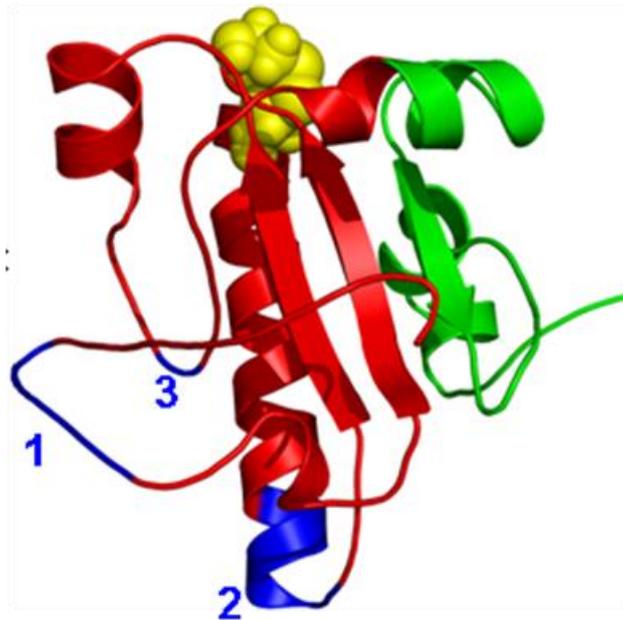


Figure 41 : Structure de la protéine RdCVFL forme longue. Les parties en rouge correspondent à l'homologie avec la trypanredoxine. Les parties en vert correspondent à l'extension en C-terminal de RdCVFL. Les parties en bleu (1, 2 et 3) sont spécifiques de la famille des Nucleoredoxin-like, *NXNL*. Les atomes en jaune représentent le site actif CXXC des thiorédoxines. D'après (Chalmel et al., 2007).

triglycérides qui sont utilisés par les cônes pour le renouvellement de leurs segments externes (**Figure 40**). Pour des raisons qui ne sont que partiellement connues, la glycolyse aérobie favorise la diversification à mi-parcours de la réaction glycolytique des carbones du glucose au niveau du dihydroxyacétone phosphate (DHAP). Une certaine proportion de DHAP est convertie en glycérol-3-phosphate (G3P) par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH). Le G3P est le précurseur de la tête hydrophile des phospholipides à base d'acides gras, parmi lesquels les acides gras poly-insaturés (AGPI) d'origine nutritionnelle (**Figure 21**). Récemment, il a été démontré expérimentalement que pour les bâtonnets, la glycolyse aérobie est aussi nécessaire au renouvellement du segment externe des bâtonnets, un phénomène parallèle à celui décrit pour les cônes (Chinchore et al., 2017).

10. La thioredoxine RdCVFL

Fait intéressant, l'épissage de l'intron unique du gène *NXNLI* produit un second ARN messager qui code une thiorédoxine enzymatiquement active, RdCVFL (**Figure 41**) (Brennan et al., 2010; Chalmel et al., 2007) (**Figure 42**). Chez la souris *Nxn11*^{-/-}, portant une recombinaison homologue du gène *Nxn11*, les bâtonnets ainsi que les cônes sont touchés. Une réduction liée à l'âge de la fonction des cônes et des bâtonnets ainsi qu'un retard de l'adaptation à l'obscurité de la rétine sont enregistrés par électrorétinogramme (ERG). Ce déficit visuel progresse avec l'âge (Cronin et al., 2010). Le manque d'expression de la thiorédoxine RdCVFL entraîne une augmentation des dommages oxydatifs. Nous avons observé une concentration plus élevée d'adduits moléculaires produits par la peroxydation lipidique dans la rétine de ces souris. La phototransduction est initiée dans le segment externe des photorécepteurs constitués d'empilements de bicouches lipidiques où la molécule d'opsine est enchâssée. Ces membranes sont particulièrement enrichies en AGPI sujettes à l'oxydation (Leveillard and Sahel, 2017). La rétine d'une souris avec une délétion spécifique du gène *Nxn11* dans les cônes est plus sensible aux dommages oxydatifs puisque *Nxn11* est également exprimé par les cônes (3% de tous les photorécepteurs chez la souris) (Mei et al., 2016). Contrairement aux bâtonnets, il n'y a pas de rétention d'intron de l'ARNm *Nxn11* dans les cônes qui n'expriment que la thiorédoxine RdCVFL (**Figure 41**).

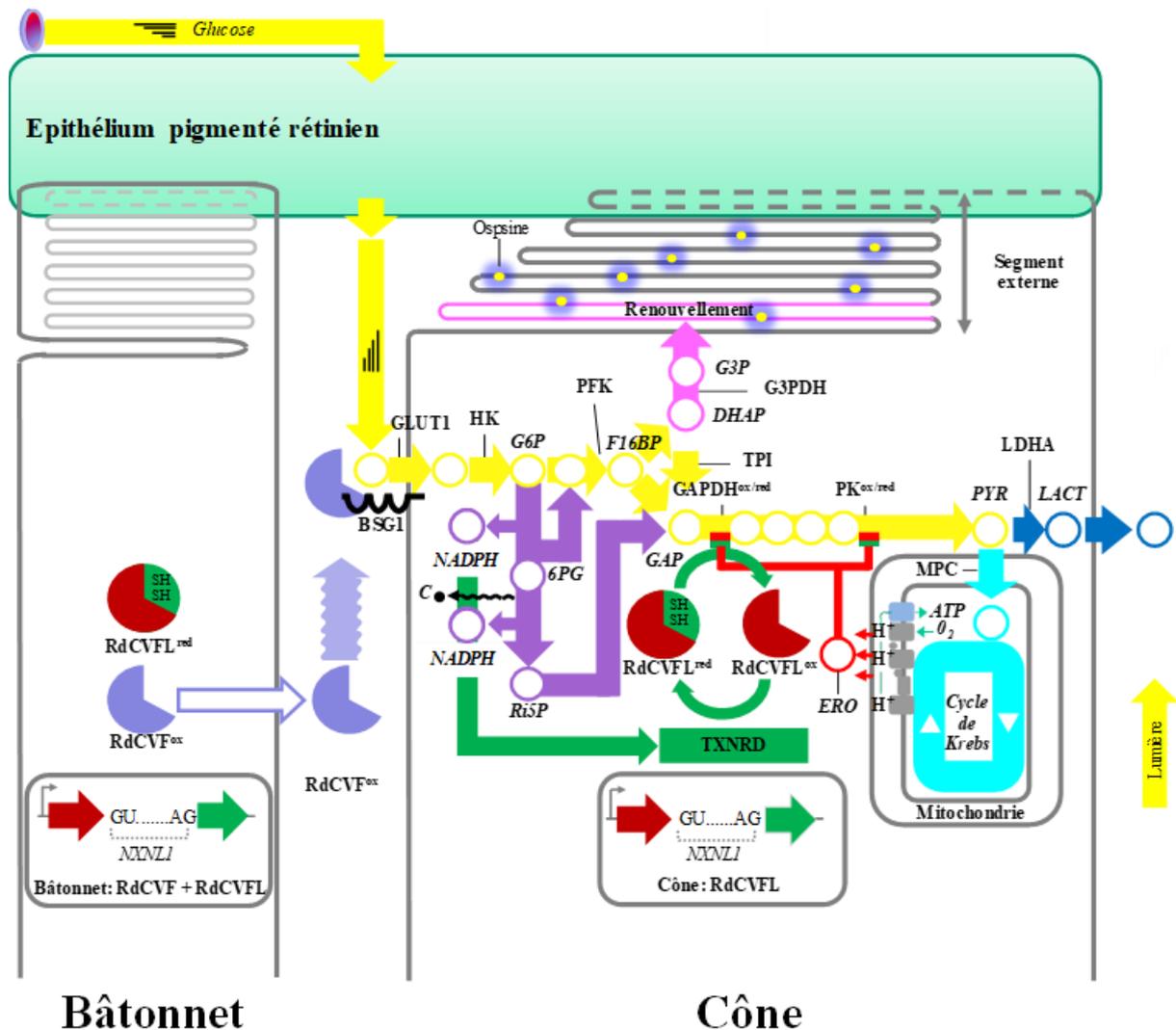


Figure 42 : Signalisation métabolique de RdCVFL. BSG : Basigin, HK : hexokinase, G6P : glucose-6-phosphate, PFK : phosphofructokinase, F16BP : fructos-1,-6-biphosphate, G3P : glycérol-3-phosphate, DHAP : dihydroxyacétone phosphate, G3PDH : glycérol-3-phosphate déshydrogénase, TPI : triose phosphate isomérase, GAP : glyceraldéhyde 3-phosphate, GAPDH : glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, PK : pyruvate kinase, PYR : pyruvate, LDHA : lactate déshydrogénase A, LACT : lactate, MPC : *mitochondrial pyruvate carrier*, ATP : adénosine triphosphate, ERO : espèces réactives de l'oxygène, NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide Phosphate forme réduite, 6PG : 6-phosphogluconate, Ri5P : ribose-5-phosphate, TXNRD : thiorédoxine réductase.

Les ERO sont produites dans des conditions physiologiques par fuite de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Figure 28**) et inhibent les enzymes clés de la voie glycolytique (Anastasiou et al., 2011; Hildebrandt et al., 2015). Le système thiorédoxine réduit les groupes thiol oxydés des cystéines dans les protéines parmi lesquelles les enzymes glycolytiques et restaure leur fonction (Lopez-Grueso et al., 2019) (**Figure 33**). Les enzymes thiorédoxine, parmi lesquelles RdCVFL, doivent être réduites par la thiorédoxine réductase (TXNRD1) car les cystéines catalytiques s'oxydent lorsque l'enzyme réduit son substrat (Ren et al., 2018). TXNRD1 a besoin de son cofacteur NADPH produit par la voie des pentoses phosphates (PPP) sous sa forme réduite pour fonctionner (**Figure 31**). Par conséquent, le pouvoir réducteur de RdCVFL dans les cônes est proportionnel à l'absorption de glucose et à la redérivation du flux glycolytique vers le PPP. L'inhibition de la glycolyse par les ERO conduit à l'accumulation de glucose-6-phosphate (G6P), le premier métabolite produit à partir du glucose dans la cellule, qui est redirigé vers le PPP produisant deux molécules de NADPH par réduction de l'activité TXNRD1 (Camacho et al., 2019; Leveillard and Sahel, 2017). Dans cette signalisation métabolique et redox, le pouvoir réducteur du RdCVFL repose sur le métabolisme du glucose par les cônes dont l'entrée est stimulée par le RdCVF (Leveillard and Ait-Ali, 2017).

Une étude translationnelle est en cours sur la combinaison de l'action non cellulaire, médié par un vecteur viral de RdCVF sur le métabolisme avec l'activité cellulaire autonome de RdCVFL sur l'homéostasie redox (**Figure 43**). Ce programme vise à prévenir la perte de vision centrale, résultant d'un dysfonctionnement des cônes, chez les patients atteints de RP indépendamment des mutations en causes (Clerin et al., 2020)³.

³ <https://arvo2021.arvo.org/meetings/virtual/HzEMYC9KT7jj8sQNr>

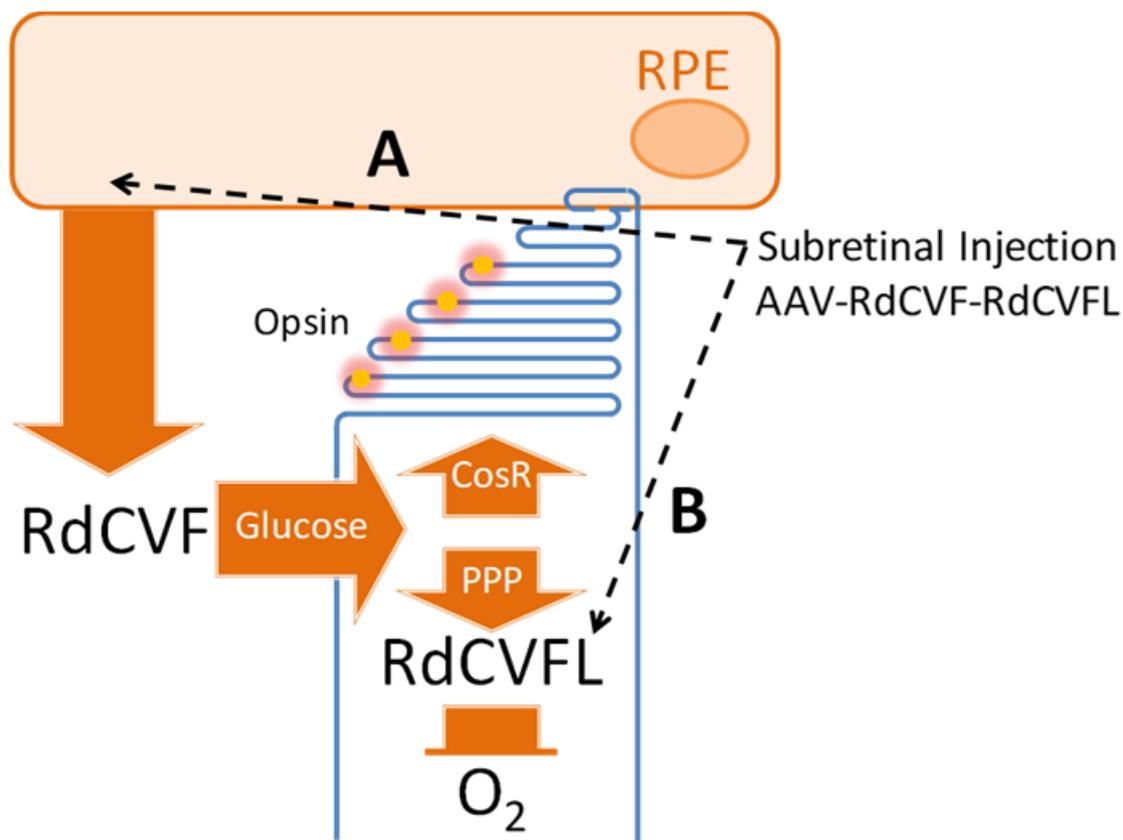
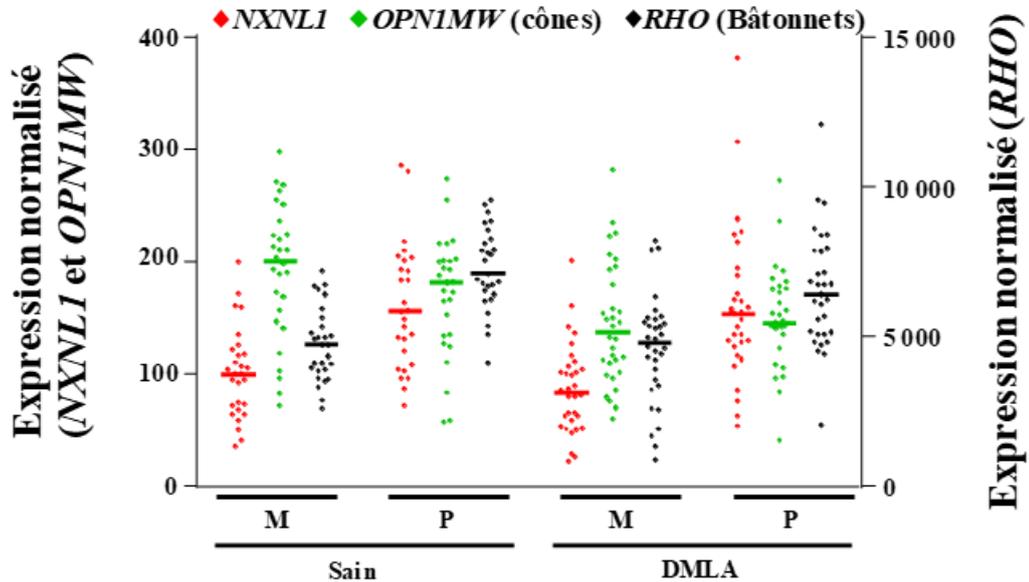


Figure 43 : Stratégie de l'étude translationnelle de la combinaison de l'effet de RdCVF et RdCVFL. Injection sous-rétinienne d'un AAV-RdCVF-RdCVFL pour prévenir la perte des cônes dans la rétinite pigmentaire. **A.** Transduction de l'AAV recombinant au niveau de l'EPR, expression et sécrétion de RdCVF pour stimuler l'entrée du glucose dans les cônes et permettre le renouvellement des segments externes des cônes et stimuler la voie des pentoses phosphates. **B.** Transduction de l'AAV recombinant dans les cônes et expression de RdCVFL afin de réduire le stress oxydatif dans les cônes

A.



B.

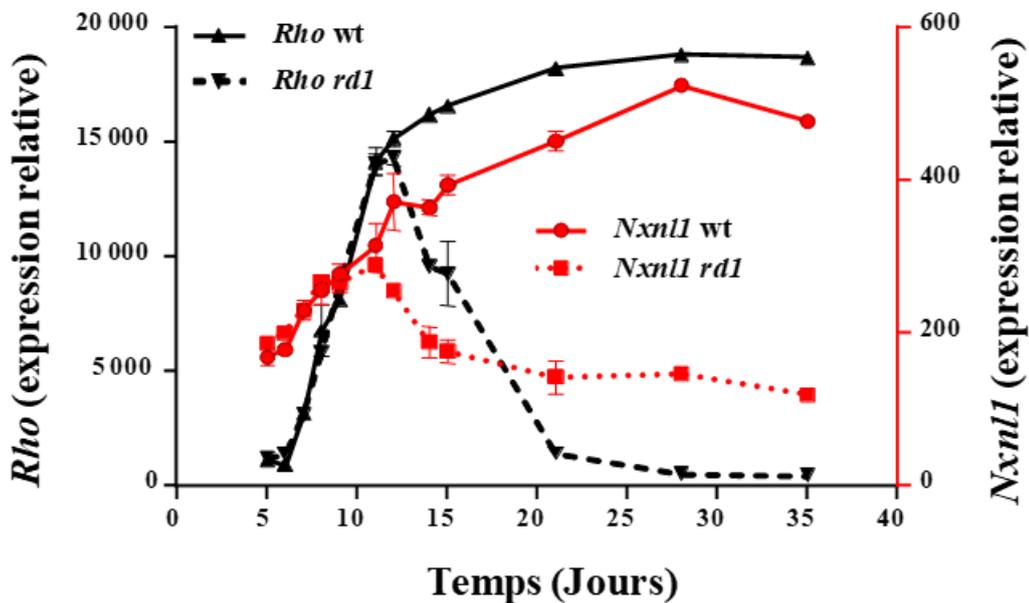


Figure 44 : Le raccourcissement du segment externe du cône dans la macula des patients atteints de DMLA n'est pas le résultat de la perte d'expression de *NXNL1*. A. L'expression de *NXNL1* dans la rétine de patient atteints de DMLA, M : macula, P : périphérie. Adapté de (Blond and Leveillard, 2019; Newman et al., 2012) B. La perte d'expression de *Nxn1l* suit celle du marqueur bâtonnets (*Rho*) dans la rétine *rd1*.

11. Problématique

RdCVF serait donc un traitement de la RP quel que soit la mutation qui affecte les bâtonnets. En revanche, dans la DMLA, bien que les bâtonnets soient affectés en premier (Lyu et al., 2021), l'expression de RdCVF ne semble pas globalement faire défaut (**Fig. 44A**), comme il l'est dans la RP après la mort des bâtonnets (Blond and Leveillard, 2019) (**Fig. 44B**). Ceci même s'il existe des soupçons que dans la DMLA la signalisation métabolique de RdCVF soit perturbée (Klipfel et al., 2021; Leveillard et al., 2019). Ceci nous a conduit à entreprendre une recherche thérapeutique alternative sur la DMLA. Mon projet est issu de cette recherche thérapeutique pour la DMLA à laquelle j'ai participé. La DMLA est la première cause de handicap visuel chez les plus de 50 ans et est une maladie multifactorielle et polygénique. Chez l'homme, la DMLA affecte la vision centrale donc les photorécepteurs à cônes. Bien que le gène *NXNLI* ne contienne pas d'allèles à risque pour la DMLA (Fritsche et al., 2013; Fritsche et al., 2016), le fait que le gène *NXNLI* code deux produits protéiques qui protègent les cônes, suggère que le gène *NXNLI* pourrait être impliqué dans la physiopathologie de la DMLA. De plus, le rôle de l'un des produits du gène, la thiorédoxine RdCVFL, dans la réparation des dommages oxydatifs des cônes est un lien potentiel avec le maintien de la fonction des cônes au cours du processus de vieillissement (Mei et al., 2016). La perte de vision due à la DMLA est actuellement irréversible et la thérapie génique n'est peut-être pas l'approche la plus sûre actuellement à cause de l'âge avancé des sujets à traiter, ce qui pourrait réduire le rapport bénéfice risque. Une relation inverse entre l'âge et l'acceptabilité de la thérapie génique a été constatée, les participants plus jeunes sont plus tolérants envers la thérapie génique que les groupes plus âgés (Delhove et al., 2020). Le développement d'une approche pharmacologique nous a semblé plus appropriée. Nous avons donc recherché des molécules qui protègent les cônes en utilisant la stratégie que nous avons utilisée pour identifier RdCVF et EdCVF (Leveillard et al., 2004; Millet-Puel et al., 2021). Pour cela nous avons criblé une banque d'extraits de plantes médicinales. En effet, durant l'évolution, les végétaux se sont adaptés à leurs niches écologiques et ont dû livrer un combat éternel contre les herbivores, entre autres les insectes (Lyor Bouaziz., 2014). Ce processus de protection, permet durant l'évolution de sélectionner des molécules biologiquement actives ainsi que des métabolites secondaires qui sont actuellement une arme de défense des plantes contre les herbivores.

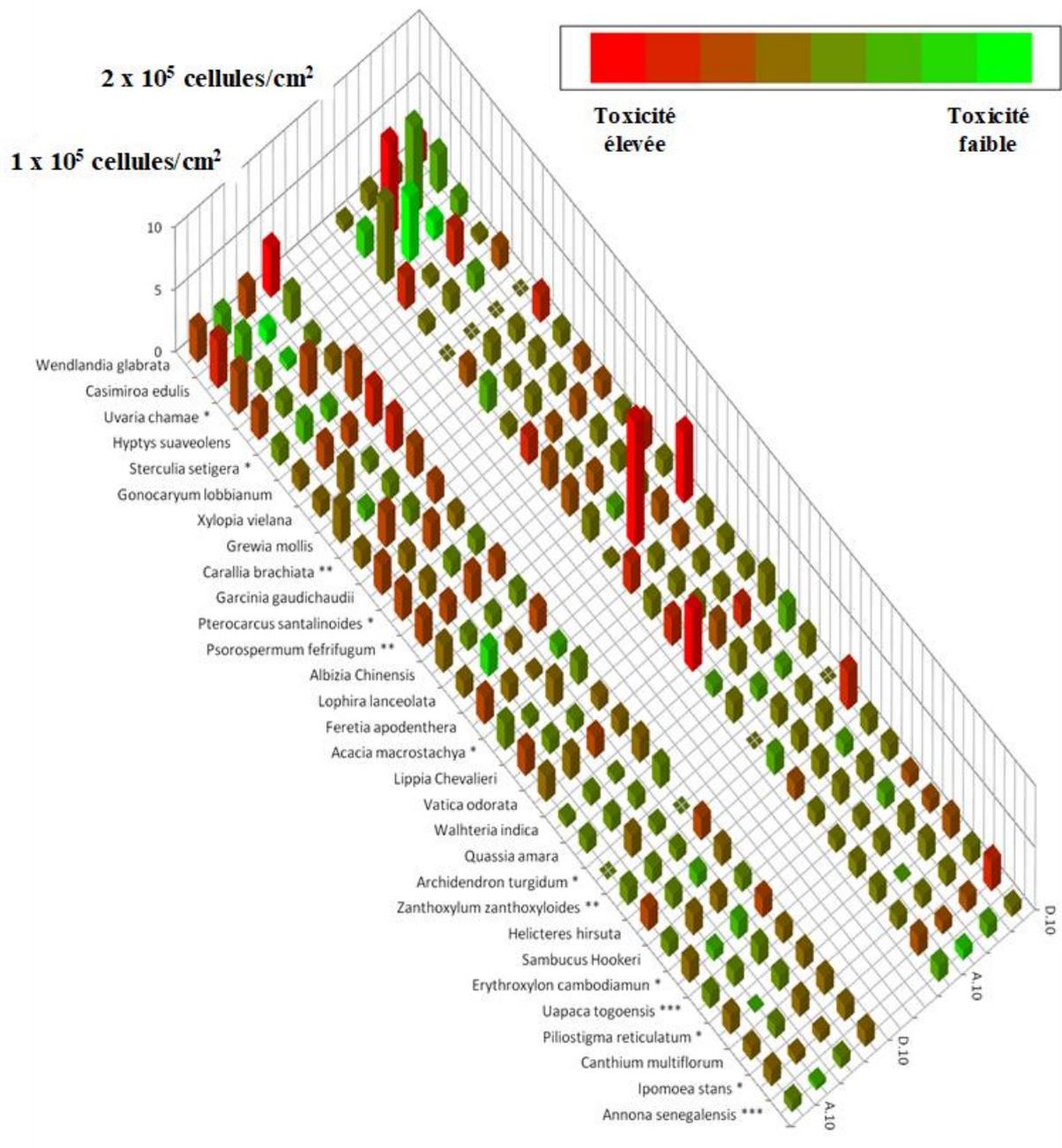


Figure 45 : Classement des 30 plantes positives selon leur facteur moyen de viabilité et de la présence d'une activité toxique à 100 µg/ml. L'amplitude des histogrammes représente le facteur de viabilité de chaque extrait. Les verts clairs plus intenses sont les extraits des plantes actives avec une toxicité faible à 100 µg/ml. Les couleurs rouges de plus en plus intenses indiquent le niveau de toxicité. Cette dernière se définit par le rapport $T = \frac{\text{moyenne du facteur de viabilité (FV) } 100 \mu\text{g}}{\text{moyenne FV à } 10 \mu\text{g}}$. A : méthanol polyamide, B : acétate d'éthyle, C : acétate d'éthyle appauvri, D : méthanol appauvri. Les plantes sont classées suivant un FV max pour les essais réalisés à 1×10^5 cellules/cm² (Lyor Bouaziz., 2014).

Les plantes sont un réservoir de molécules pharmacologiques riche d'au moins 200 000 composés. Les plantes utilisées dans les remèdes ancestraux contiennent différentes catégories de métabolites secondaires tels que des alcaloïdes, des terpènes, des hétérosides et des flavonoïdes qui ont le potentiel d'interagir avec les protéines de notre organisme et de modifier leur activité (Koehn and Carter, 2005; Wahid et al., 2020). Considérant qu'il y avait en 2014, 88 354 010 molécules organiques et inorganiques répertoriés dans la base *chemical abstracts service* (CAS), il était impensable de cribler la totalité de ces molécules sur notre modèle de culture enrichie en cônes (Millet-Puel et al., 2021). Nous avons donc choisi de cribler une banque de 800 extraits de plantes provenant de divers écosystèmes dans le monde (Mexique, Burkina Faso, Vietnam, Etats Unies, Nicaragua, Costa Rica et Madagascar). Le criblage en 50 semaines de 200 plaques de culture 96 réalisé avec 700 œufs fertilisés, nous a permis de sélectionner 30 extraits de plantes (**Figure 45**). Nous nous sommes concentré sur un extrait de la plante d'*Uvaria Chamae* provenant du Burkina Faso, en raison de la robustesse de son activité protectrice et selon la morphologie des photorécepteurs cônes traités avec cet extrait (**Figure 46**). Le fractionnement par bioguidage de 100 kg d'extrait de feuilles d'*Uvaria Chamae* fut réalisé par M^{me} Alexandra Lyor Bouaziz et moi-même durant sa thèse et conduisit à l'identification d'une nouvelle acétogénine (C₃₇H₆₆O₇) qui n'est toujours pas répertoriée dans la CAS. Nous avons nommé cette molécule Geralexin, en référence aux 2 personnes qui l'ont découvert, **Géraldine** et **Alexandra**. La structure chimique de cette acétogénine diffère par un hétérocycle lactone ouvert contrairement aux acétogénine, souvent neurotoxiques (Lannuzel et al., 2007), dans lesquelles il est cyclisé. Cette différence de la structure chimique de Geralexin que nous ne pouvons reproduire ici du fait du dépôt d'un brevet, pourrait être en lien avec le fait que cette molécule est neuroprotectrice. Nous avons alors découvert que la Geralexin agit par stimulation de la glycolyse aérobie, comme RdCVF (**Figure 47**). Nous avons ensuite démontré que l'effet protecteur de Geralexin ne requiert pas le récepteur de RdCVF, BSG1. En effet, un micro ARN interférent du récepteur BSG1 ne réduit pas l'effet protecteur de Geralexin (**Figure 48A** et **48B**). L'hydrophobicité et la masse réduite (622) de Geralexin, comparativement aux protéines nous a conduit à rechercher une cible intracellulaire impliquée dans la glycolyse aérobie. Nous avons donc examiné le transcriptome de la souris *rd1* dans la base de données KBaSS (<http://kbass.institut-vision.org/KBaSS/>) mise en place par Frédéric Blond (Blond and Leveillard, 2019). La souris *rd1* est le modèle murin de RP récessive avec dégénérescence primaire des bâtonnets à partir du 8^{ème} jour post-natal jusqu'à leur perte totale au 15^{ème} jour, qui est suivie de la dégénérescence secondaire des cônes. Les gènes dont l'expression diminue durant cette période sont des gènes majoritairement exprimés par les

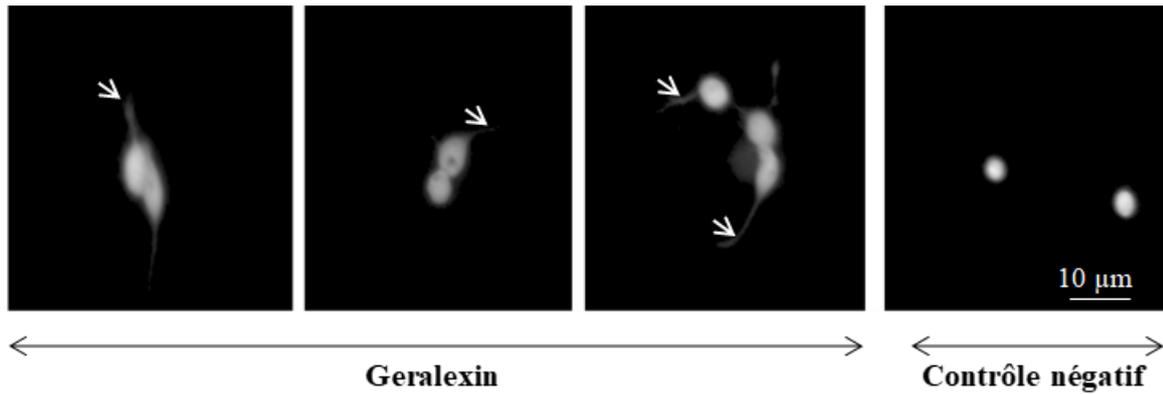


Figure 46 : Effet de la Geralexin sur la morphologie des cônes. Analyse comparative entre la morphologie des cellules en présence et absence de Geralexin. Notez la présence de neurites (flèches blanches) et l'aspect fusiforme des cellules vivantes marquées à l'aide de la calcéïne.

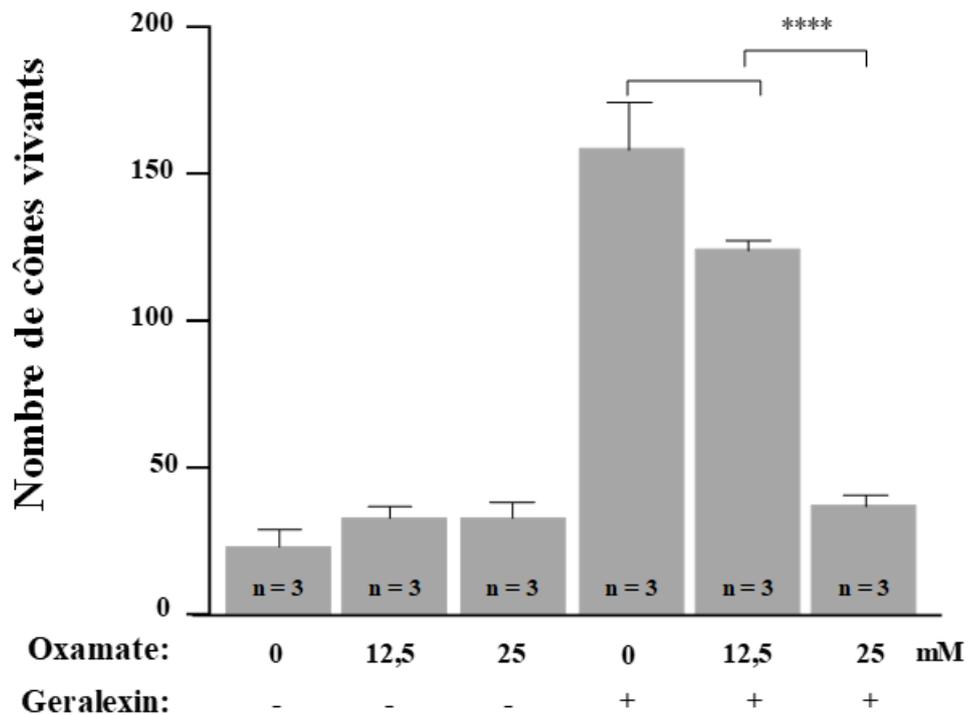


Figure 47 : Inhibition de l'activité trophique de la Geralexin par l'oxamate de sodium. L'oxamate de sodium est un inhibiteur de la lactate déshydrogénase, en bloquant la glycolyse à ce niveau-là, il inhibe l'effet de Geralexin à 10 ng/ml sur la survie des cônes.

bâtonnets du fait qu'ils représentent 97% des photorécepteurs et la moitié des cellules de la rétine. Une représentation astucieuse des données en radar permet, sans effort de concentration, d'examiner le profil d'un grand nombre de gènes (Craig et al., 2010). Le profil d'expression radar des gènes exprimés par les bâtonnets ressemble à l'Afrique alors que le profil d'expression des gènes exprimés par les cônes ressemble au sigle des Rolling stones (Ait-Ali, 2018). Parmi tous les gènes répertoriés dans le cluster 'Africain', le gène *Pfkfb2* qui code pour une enzyme du métabolisme apparaît en position 25 sur 499 gènes et vient à la suite des gènes des photorécepteurs qui portent des mutations de la RP (**Table 2**). *Pfkfb2* code une enzyme bifonctionnelle, la 6-phosphofructo-2 kinase/fructose 2-6 biphosphatase 2 (PFKFB2). Le profil d'expression en radar du gène le *Pfkfb2* montre en effet un profil d'expression Africain (**Figure 49**). Il y a quatre gènes codant la 6-phosphofructo-2 kinase/fructose 2-6 biphosphatase chez les vertébrés mais seul *Pfkfb2* présente ce profil d'expression. L'expression de PFKFB3 dans la rétine est restreint aux cellules horizontales et ganglionnaires (Roy et al., 2021). Cette enzyme nous a semblé être un candidat approprié comme cible de Geralexin, même si nous verrons plus loin que son expression est plus complexe. C'est pour cette raison que nous avons cherché à savoir comment ce gène se positionnait dans la signalisation métabolique de RdCVF. **Ceci a constitué mon travail de thèse.**

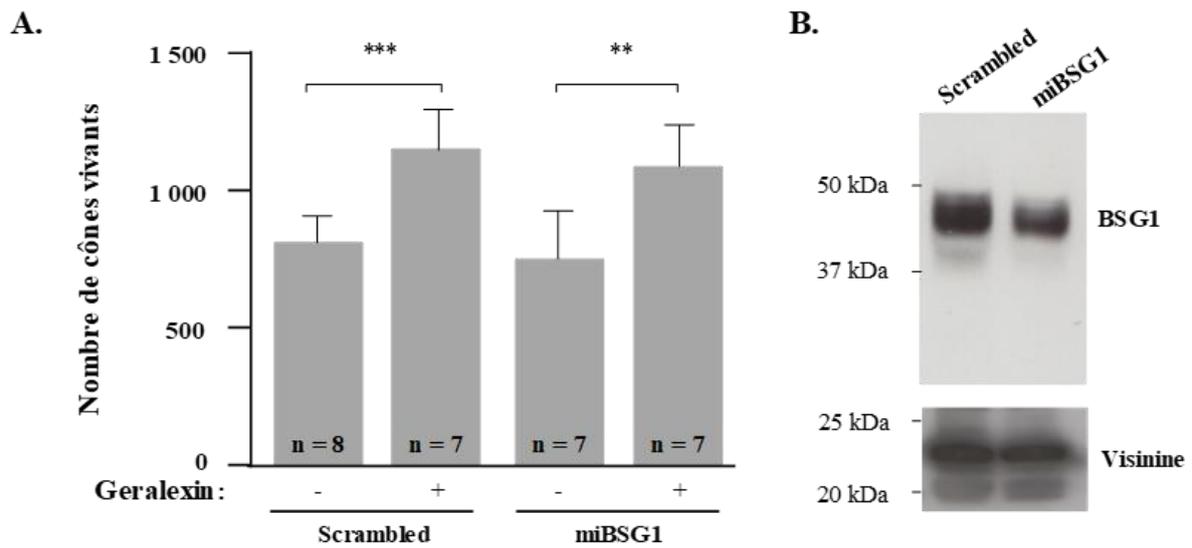


Figure 48 : Etude de l'effet trophique de la Geralexin en présence d'un micro ARN interférent du récepteur BSG1. **A.** Culture de cônes d'embryon de poulet en présence de la Geralexin et d'un micro ARN interférence du récepteur BSG1. **B.** Etude en *western blot* de l'expression de BSG1 dans les cônes d'embryons de poulet en présence du micro ARN interférent.

Gene: *Pfkfb2* Experiment: *Congeniced1 2010*
Arraytype: *Mouse430_2* Software: *RMA*

■ 1429486_at (*Pfkfb2*)

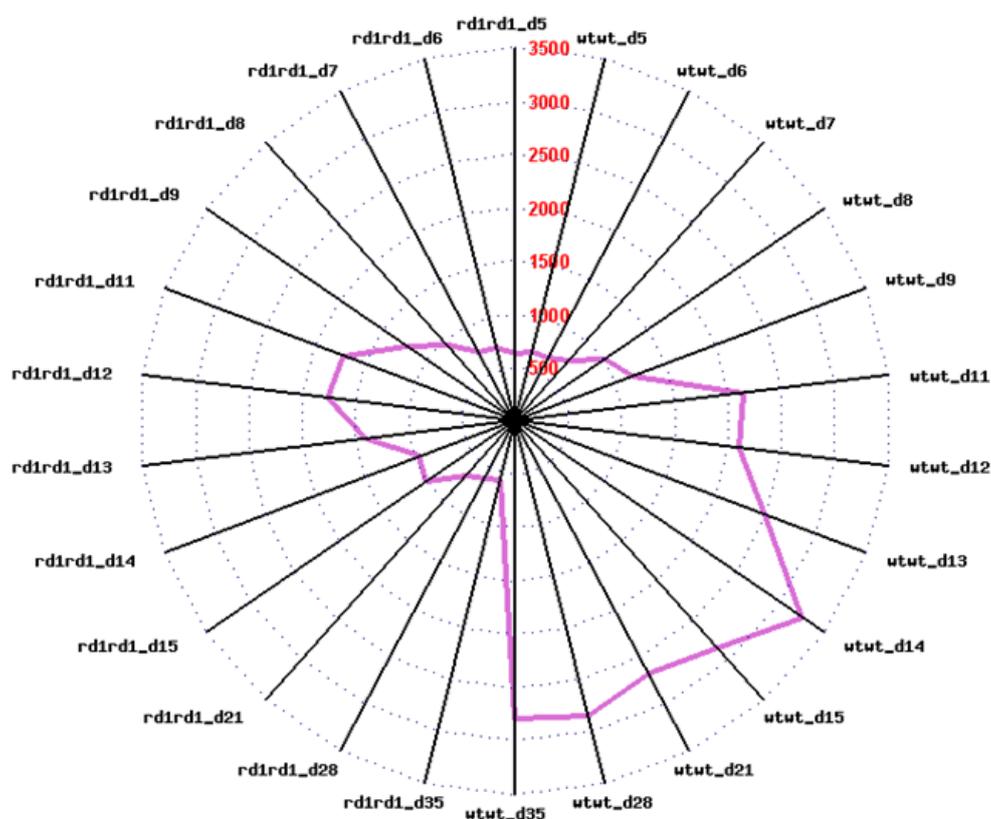
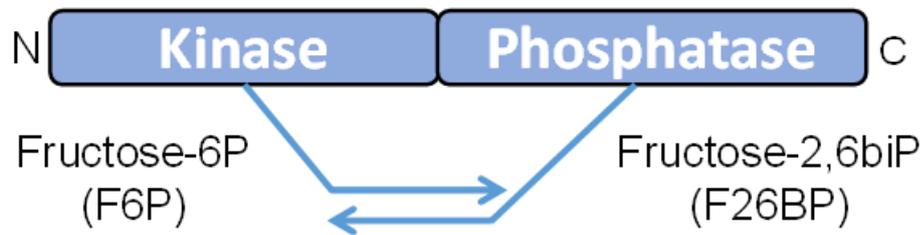


Figure 49 : Etude transcriptomique de la souris *rd1*. Profil d'expression du gène *Pfkfb2* représenté en radar est du type *African-like*, principalement exprimé par les bâtonnets.

RESULTATS

A.



B.

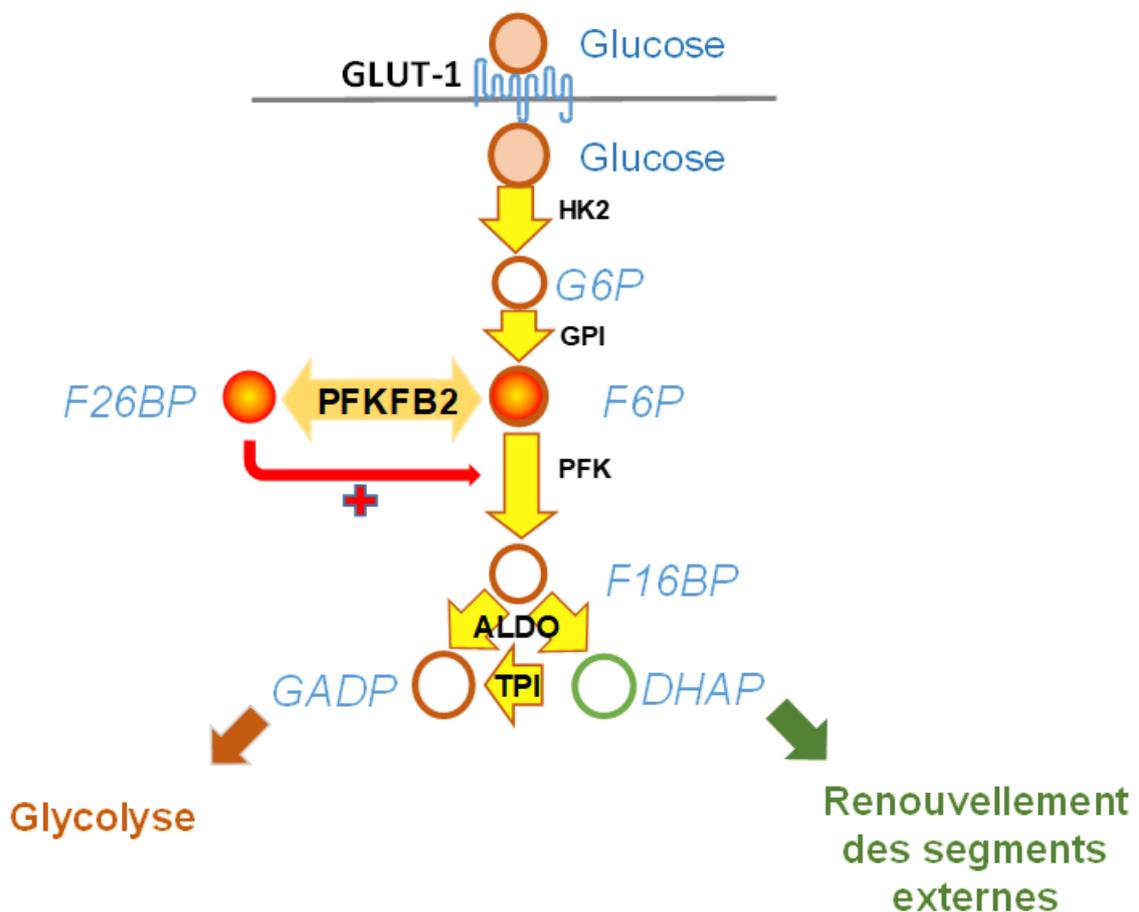


Figure 50 : L'enzyme 6-phosphofructo-2 kinase/fructose 2-6 biphosphatase (PFKFB). A. L'enzyme PFKFB est une enzyme bifonctionnelle avec un domaine kinase et un domaine phosphatase. B. Implication de l'enzyme PFKFB dans la glycolyse. HK2 : hexikinase2 ; GPI : glucose-6-phosphate isomérase ; F26BP : fructose-2,6-biphosphatase ; F6P : fructose-6-phosphate ; PFK : phosphofructokinase ; F16BP : fructose-1,6-biphosphatase ; ALDO : aldolase ; TPI : triose phosphate isomérase ; GADP : glycéraldéhyde-3-phosphate, DHAP : dihydroxyacétone phosphate.

RESULTATS

1. Etude d'expression du gène *Pfkfb2* après surexpression de RdCVF

PFKFB2 est une enzyme bifonctionnelle régulatrice de la glycolyse qui contrôle la concentration du fructose-2,6-biphosphate (F26BP) par l'action de deux domaines fonctionnels, l'un kinase et l'autre phosphatase (Dasgupta et al., 2014) (**Figure 50A**). Cette enzyme intervient dans la glycolyse, en transformant le fructose-6-phosphate (F6P) de la glycolyse, en F26BP (**Figure 50B**). Notre réflexion s'est donc porté dans un premier temps sur le lien existant entre RdCVF et ce gène de la glycolyse. Comme RdCVF stimule la glycolyse aérobie en accélérant l'entrée du glucose dans les cônes, nous avons étudié l'effet de la surexpression de RdCVF sur l'expression du gène *Pfkfb2* dans un modèle murin de la RP, la souris *rd1*. Les souris ont été injectées en intracardiaque à 3 jours avec les vecteurs AAV9.2YF-GFP et AAV9.2YF-RdCVF et sacrifiées à 49 jours lorsque la totalité des bâtonnets avaient dégénérés (Ait-Ali et al., 2015). Les fonds d'œil des sujets injectés avec le vecteur contrôle, AAV9.2YF-GFP et le vecteur test AAV9.2YF-RdCVF montrent que l'expression des vecteurs viraux dans les yeux est étendue avec le sérotype 9 (Dalkara et al., 2012) (**Figure 51A**). Nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression du mRNA *Pfkfb2* par RdCVF (**Figure 51B**). Ce résultat indique que l'action de RdCVF, donc par conséquent l'augmentation de l'entrée du glucose dans les cônes provoque l'augmentation de l'expression de *Pfkfb2*. Il existe donc bien un lien entre la signalisation métabolique de RdCVF et le gène *Pfkfb2*.

2. Etude de l'expression du gène *Pfkfb2* en réponse au glucose

Afin de vérifier l'implication du glucose dans l'expression de *Pfkfb2*, nous avons utilisé des cultures enrichies en cônes issues d'embryons de poulet décrites et développées à l'origine par Ruben Adler en 1989 (Adler and Hatlee, 1989). Ce modèle est particulièrement pertinent car c'est le seul modèle *in vitro* permettant la culture de photorécepteurs à cônes (Millet-Puel et al., 2021). En effet, la couche externe de la rétine des oiseaux est majoritairement constituée de cônes (86%) et possède peu de bâtonnets (14%), à l'inverse de la rétine de la plupart des mammifères (Lopez et al., 2005). Ce modèle cellulaire est un modèle de culture primaire enrichie en cônes d'embryons de poulet (*Gallus gallus*) à 6,5 jours d'incubation, qui correspond

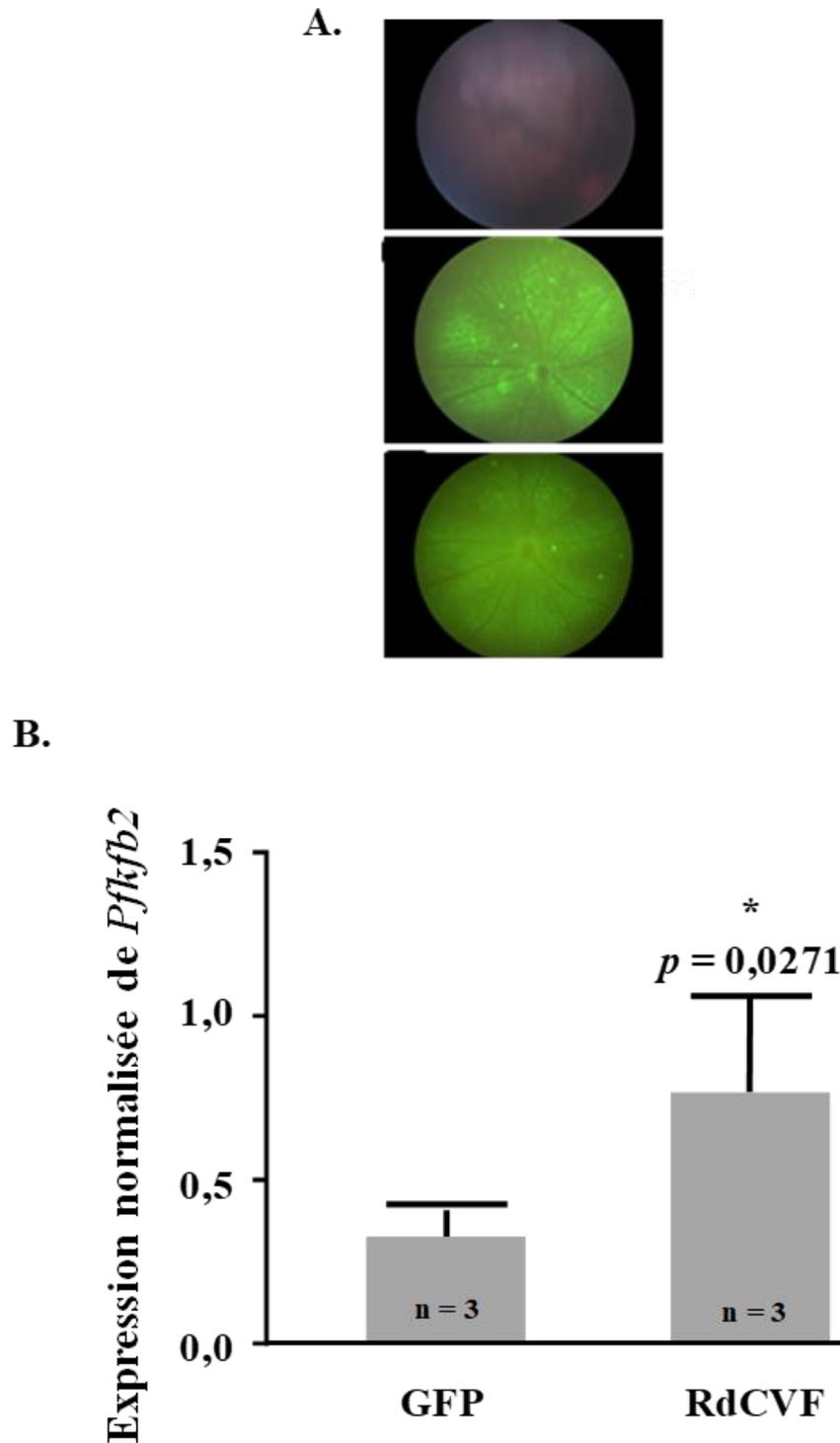
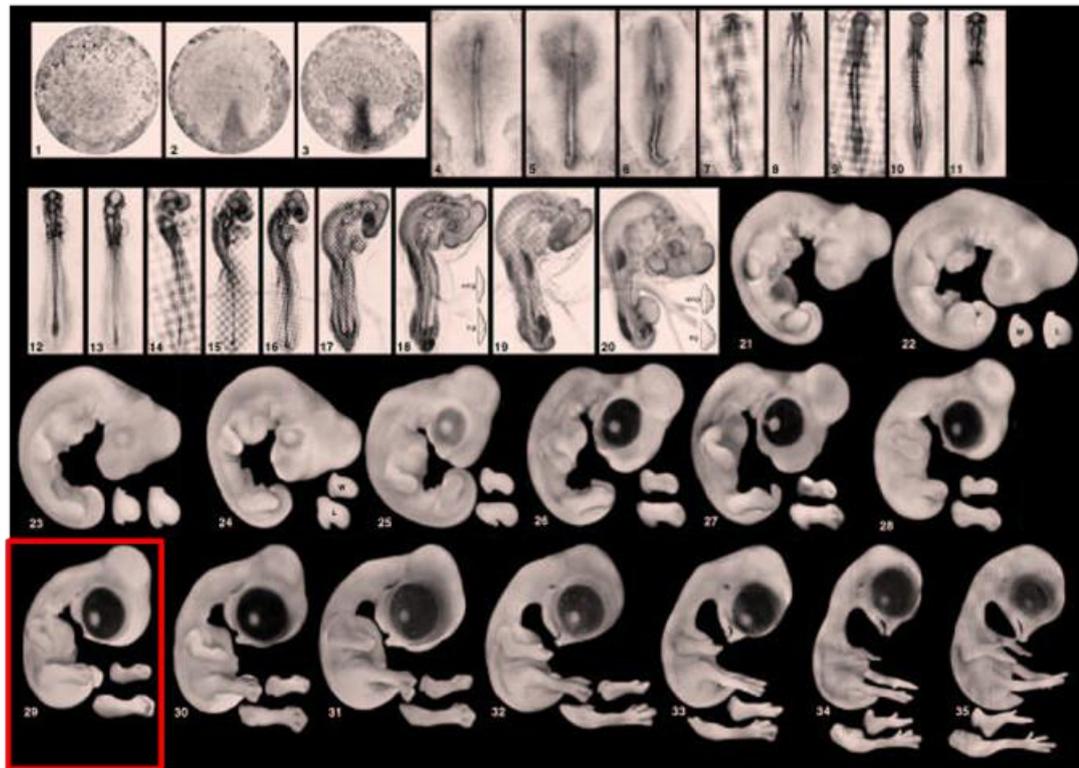


Figure 51 : Etude d'expression du gène *Pfkfb2* après surexpression de RdCVF. A. Fond d'œil des souris injectées avec le vecteur contrôle AAV2.9YF-GFP et le vecteur AAV2.9YF-hRdCVF. **B.** Expression normalisée du messenger du gène *Pfkfb2* dans la rétine de souris *rd1* injectées avec RdCVF. Normalisation de l'expression de *Pfkfb2* grâce au gène de ménage spécifique des photorécepteurs chez le poulet, la *Visinin*. Analyse statistique test de Student valeur $p = 0,0271$ (SEM).

A.



B.

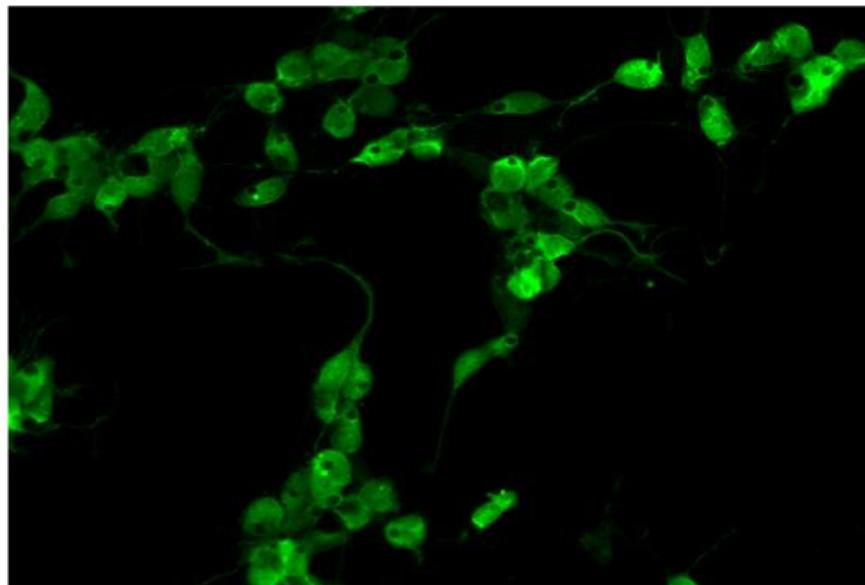


Figure 52 : La culture de cônes d'embryons de poulet au stade 29. A. Classement des stades embryonnaires du poulet selon Hamburger et Hamilton. Le stade embryonnaire 29 encadré en rouge est le stade optimal pour obtenir des cultures enrichies en cônes in vitro, à partir de rétines de ces embryons (Hamburger and Hamilton, 1951; Millet-Puel et al., 2021). B. Culture de cônes d'embryon de poulet stade 29 à 4 jours de culture Les cellules sont marquées avec un anticorps anti-visinine, marqueur spécifique des photorécepteurs chez le poulet.

à un stade de développement embryonnaire 29 chez le poulet (Hamburger and Hamilton, 1951) (**Figure 52A**). A ce stade, les cellules rétiniennes ne sont encore que des précurseurs rétiniens. Contrairement à la situation *in vivo* où la différenciation neuronale précède la différenciation des photorécepteurs, lorsque les cellules rétiniennes sont isolées et mises en culture au stade 29 du développement embryonnaire, la différenciation des photorécepteurs commence avant la différenciation neuronale. Dans ces conditions, en l'absence de signaux de différenciation, les précurseurs vont suivre la voie de différenciation des photorécepteurs. Les précurseurs rétiniens mis en culture au stade 29 se différencient à 70% en photorécepteurs (**Figure 52B**), alors que la mise en culture de précurseurs rétiniens au stade embryonnaire 34 (ED8) ne donne que 30% de photorécepteurs (Adler, 1987). Ces cellules métabolisent le glucose par la glycolyse aérobie (Ait-Ali et al., 2015). De plus, dans ces conditions de culture, les cellules gliales ne peuvent se développer du fait de l'absence de sérum. C'est un modèle cellulaire simple et rapide, idéal pour tester l'efficacité d'une protéine ou bien des conditions particulières agissant sur la survie des photorécepteurs à cônes, *in vitro* (Millet-Puel et al., 2021). Cette technique nous a permis d'identifier RdCVF par criblage haute contenu (Leveillard et al., 2004), et Geralexin. Nous avons donc testé 2 concentrations de glucose : 5 mM qui est la concentration en glucose dans le milieu extracellulaire des cônes *in vitro* et 30 mM, puis nous avons mesuré l'expression du gène *PFKFB2* par la technique rétro transcription-*polymerase chain reaction* (RT-PCR) en temps réel (**Figure 53**). Nous observons que lorsque nous augmentons la concentration de glucose dans le milieu extracellulaire, l'expression du gène *PFKFB2* augmente. Ces résultats confirment que l'expression du gène *PFKFB2* est régulée par le glucose dans les cônes et donc sujette à l'action de RdCVF sur l'activité du transporteur GLUT1, via son interaction avec BSG1 (Ait-Ali et al., 2015).

3. Etude de l'expression du gène *Pfkfb2* en présence de Geralexin

Nous avons aussi testé l'effet que pouvait avoir Geralexin sur l'expression du gène *PFKFB2*, sachant que nous avons mis en évidence que Geralexin protégeait les cônes via la glycolyse aérobie. Utilisant le même système, nous avons étudié l'expression de *PFKFB2* dans les cônes d'embryons de poulet en présence de Geralexin à 10 ng/ml dans le milieu extracellulaire (**Figure 54**). L'analyse RT-PCR montre que le niveau d'expression de *PFKFB2* augmente de façon significative en présence de Geralexin, ce qui confirme que *PFKFB2* est aussi une cible de Geralexin.

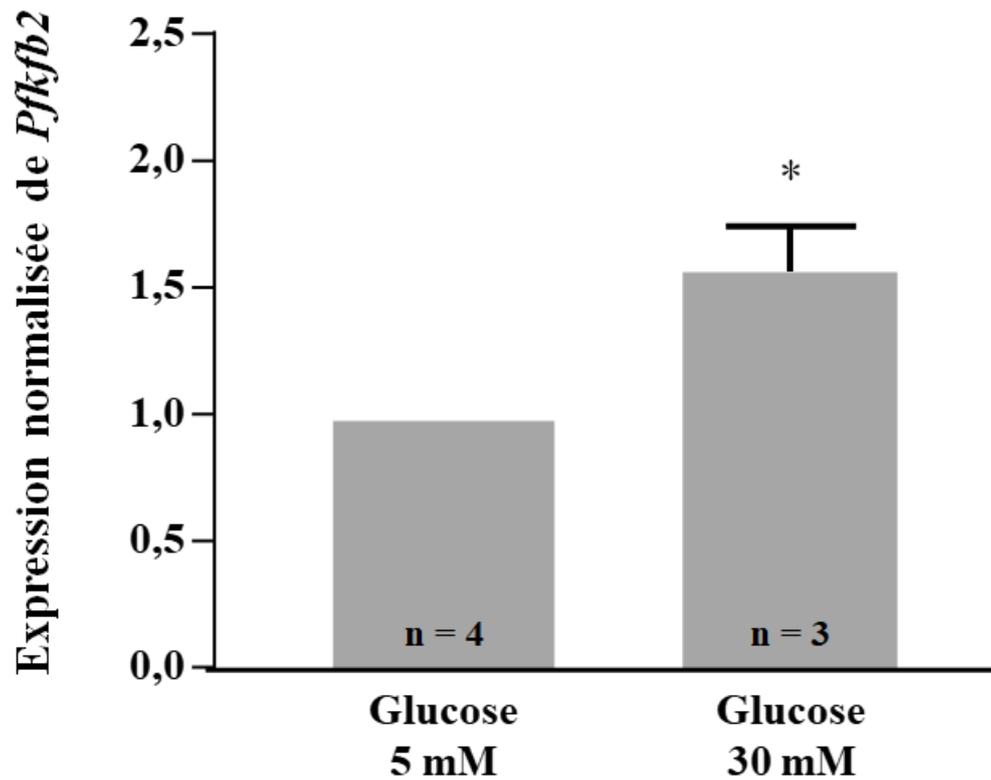


Figure 53 : Expression normalisée de *Pfkfb2* dans les cônes d'embryons de poulet in vitro, en présence de deux concentrations de glucose ; 5 mM ou 30 mM. Expression normalisée grâce au gène de ménage spécifique des photorécepteurs chez le poulet, la *Visinin*. Analyse statistique avec un test de Mann and Whitney valeur $p = 0,0286$ (SEM).

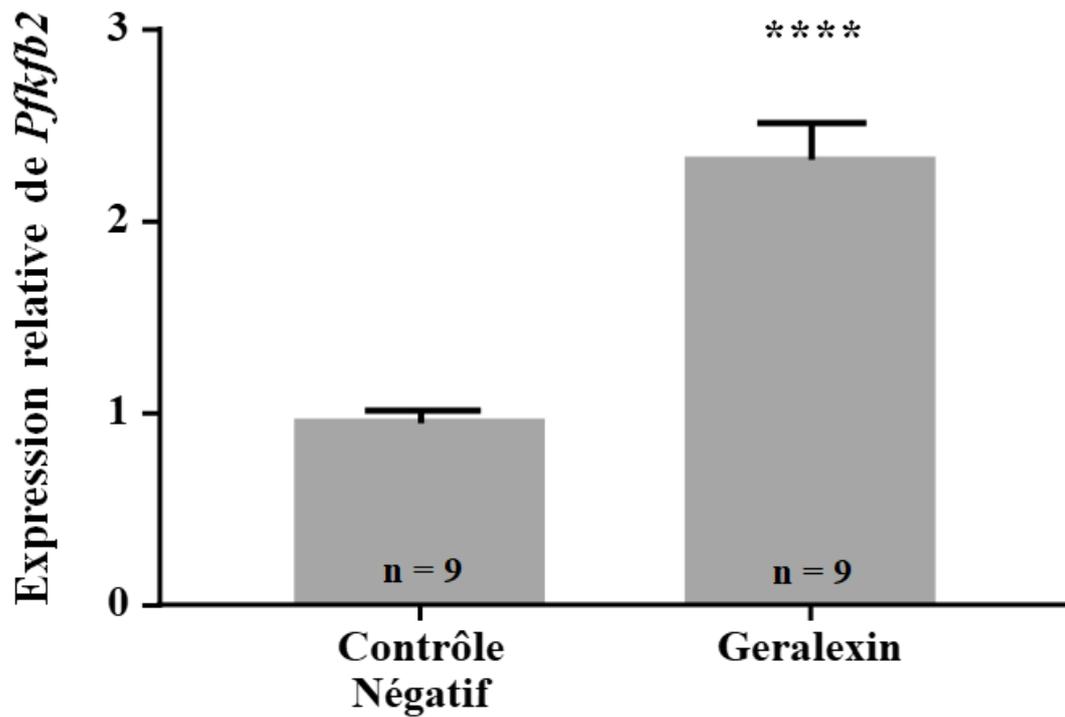


Figure 54 : Expression normalisée de *Pfkfb2* dans les cônes d'embryons de poulet *in vitro*, traités avec Geralexin à 10 ng/ml. Expression normalisée grâce au gène de ménage spécifique des photorécepteurs chez le poulet, la *Visinin*. Analyse statistique avec un test de Mann and Whitney valeur $p < 0,0001$ (SEM).

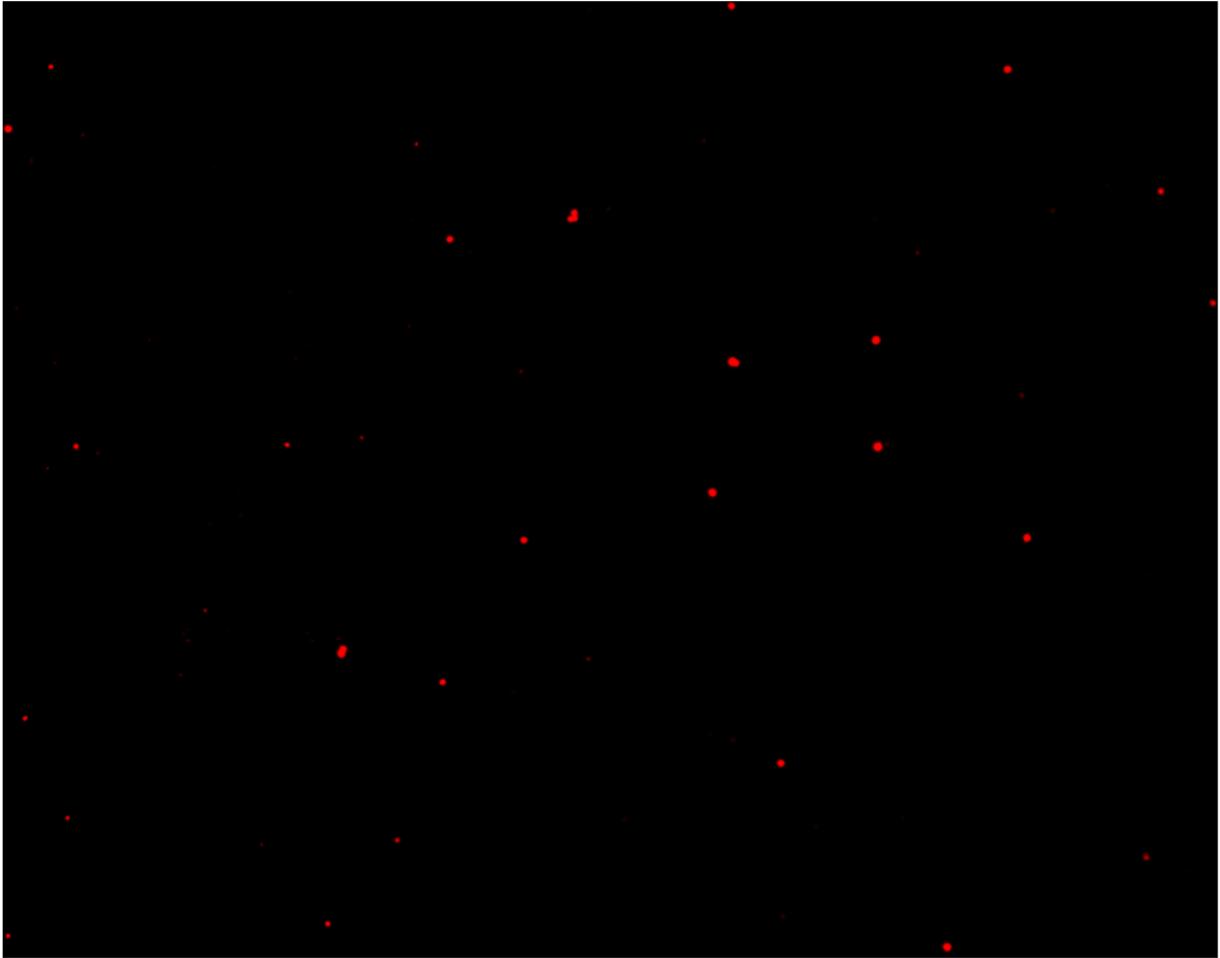


Figure 55 : Cellules transduites avec le plasmide pCAG-RFP. L'analyse de la survie des photorécepteurs à cônes transduits avec les siRNA, est possible grâce à un plasmide contrôle qui code pour la *Red Fluorescent Protein* (RFP) et qui nous a permis de visualiser les cellules électroporées.

4. Etude de l'effet d'un siRNA *Pfkfb2* sur la survie des cônes en présence de Geralexin

Prenant en compte le lien entre *Pfkfb2* et la signalisation métabolique de RdCVF, nous avons testé l'effet du silençage de PFKFB2 sur la survie des cônes. Nous avons testé l'effet de petits ARN interférents ou *small interfering RNA* (siRNA) dirigé contre l'ARN messager du gène *PFKFB2* et mesuré la survie des cônes dans le modèle de cultures de cônes d'embryons de poulet. Les siRNA sont des petits ARN double brin de 21 à 24 paires de bases qui inhibent l'expression d'un gène en dirigeant la dégradation des ARN ou plus fréquemment en inhibant la traduction en protéine. Nous avons introduit ces siRNA, par électrolocation de globe oculaire d'embryons de poulet, ne contenant que la rétine et le vitré. Une fois le tissu dissocié, les cellules de la rétine sont mises en culture selon le protocole décrit précédemment. L'analyse de la survie des photorécepteurs à cônes transduits avec les siRNA, qui ont été possible grâce à un plasmide contrôle qui code pour la *red Fluorescent protein* (RFP) et qui nous a permis de visualiser les cellules électroporées (**Figure 55**). Ces expériences donnent des résultats inattendus. En effet, les cellules dont l'expression du gène *PFKFB2* a été silencieuse, ont un taux de survie augmenté par rapport au contrôle, en contradiction avec un effet positif de PFKFB2 sur la survie des cônes (**Figure 56A**). Le silençage de *PFKFB2* augmente la survie des photorécepteurs à cônes. Nous avons établi que Geralexin stimule l'expression de *PFKFB2* et la survie des cônes, or en présence de siPFKFB2 nous observons que l'effet protecteur de la Geralexin n'est pas modifié lorsque que l'on réduit l'expression de PFKFB2. Cette expérience a été répétée à plusieurs reprises a toujours donné des résultats similaires (**Figure 56B**). Il semble que ce résultat contradictoire soit la due à la somme complexe d'effets négatifs et positifs, antagonistes des deux domaines protéiques de PFKFB2 (**Figure 56C**). Nous n'avons donc pas essayé d'explorer plus en détail ces résultats incompréhensibles et nous avons donc adressée la même question *in vivo*.

5. La lignée murine [*Cone-Cre*^{+/+}: *Pfkfb2*^{loxP/loxP}]

Nous avons créé une lignée murine dans laquelle le gène *Pfkfb2* est inactivé spécifiquement dans les cônes. Nous nous sommes procuré des spermatozoïdes de souris *Pfkfb2*^{tm1a} du *Model Animal Research Center* de l'Université de Nanjing en Chine (Friedel et al., 2007) et nous avons établi une lignée murine *Pfkfb2*^{tm1a} stable. Cette lignée possède des séquences *flippase recognition target* (FRT) entre les exons 2 et 3 du gène de *Pfkfb2* ainsi

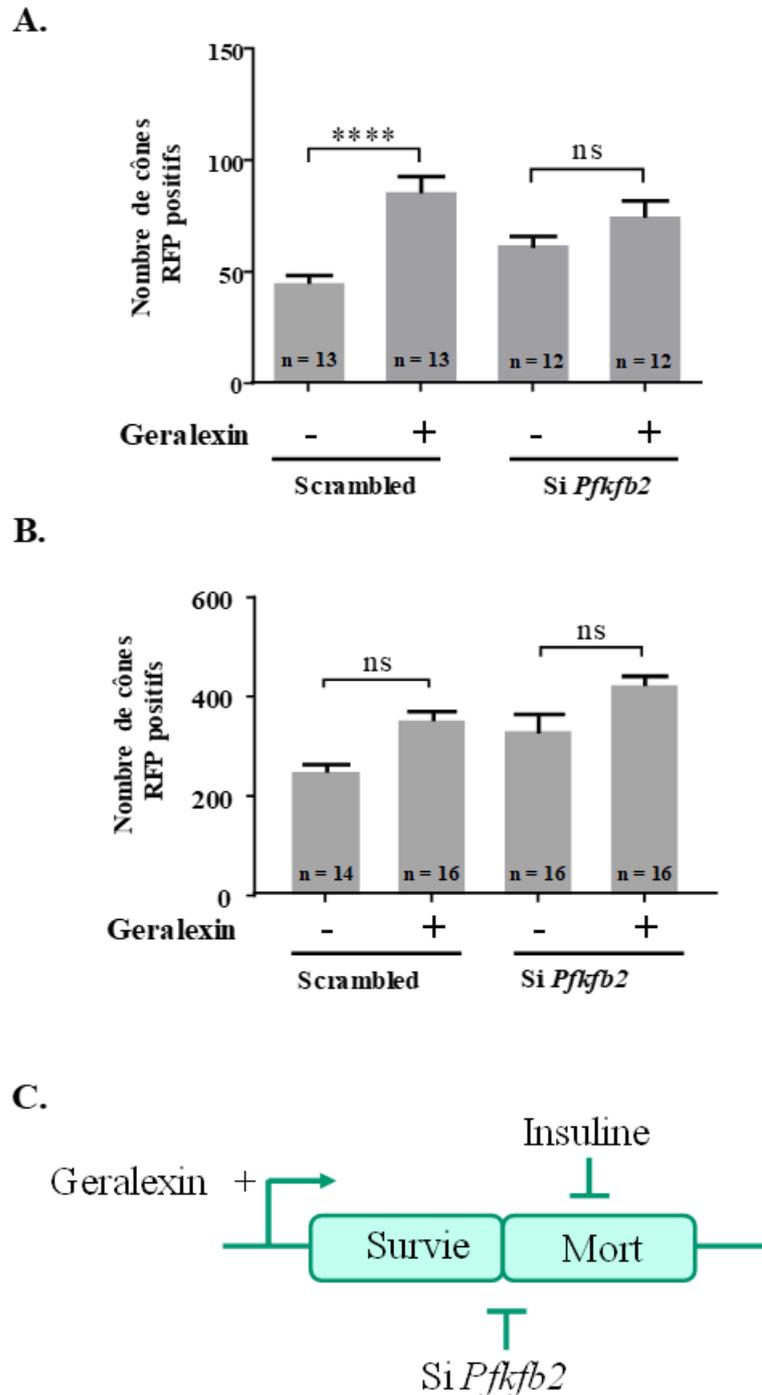


Figure 56 : Etude de l'effet d'un siRNA *Pfkfb2* sur la survie des cônes en présence de Geralexin. **A.** Premier essai de l'effet du siRNA de *Pfkfb2* sur la survie des cônes en présence de Geralexin. Etude statistique faite avec un one-way ANalysis Of VAriance (ANOVA), Test de Tukey comparaison multiple, **** $p < 0,001$ (SEM), ns = non significatif = 0,1307 (SEM). **B.** Deuxième essai de l'effet du siRNA de *Pfkfb2* sur la survie des cônes en présence de Geralexin. Etude statistique faite avec un one-way ANalysis Of VAriance (ANOVA), Test de Tukey comparaison multiple, ns = non significatif $p = 0,0751$ (SEM), ns = non significatif = 0,1244 (SEM). **C.** Les résultats contradictoires de A. et B. sont la due à la somme complexe d'effets négatifs et positifs, antagonistes des deux domaines protéiques de PFKFB2.

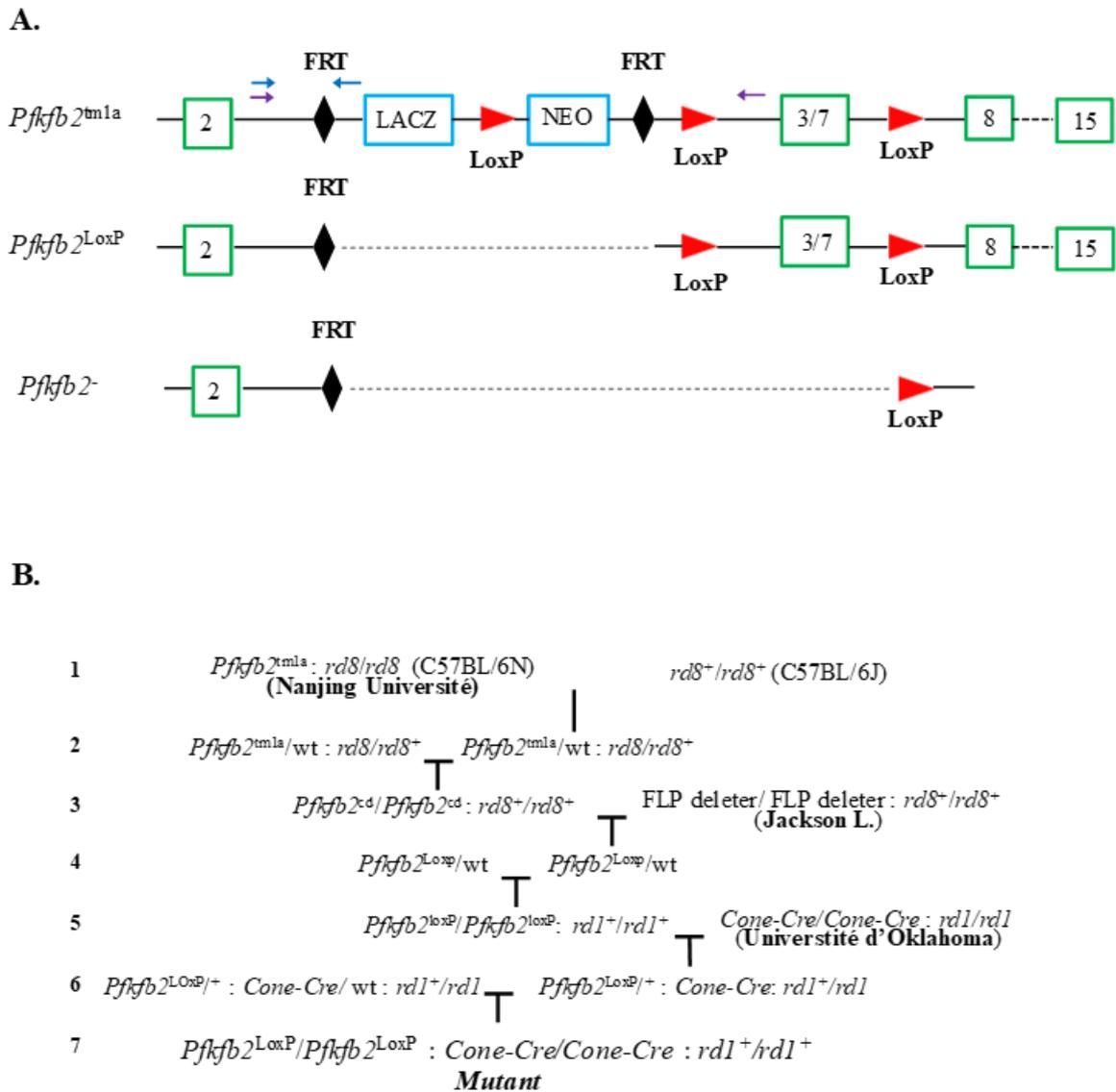


Figure 57 : La lignée murine [*Cone-Cre*^{+/+} ; *Pfkfb2*^{LoxP/LoxP}]. **A.** Le gène *Pfkfb2* dans les lignées murines ; la lignée de départ *Pfkfb2*^{tm1a}, la lignée intermédiaire, et la lignée finale *Pfkfb2*^{LoxP} et [*Cone-Cre*^{+/+} ; *Pfkfb2*^{LoxP/LoxP}]. **B.** Arbre généalogique des lignées produites pour obtenir la lignée murine à étudier [*Cone-Cre*^{+/+} ; *Pfkfb2*^{LoxP/LoxP}].

qu'une cassette d'un gène rapporteur LacZ et une cassette de sélection par la néomycine. Elle possède aussi des séquence *locus of X-over P1* (LoxP) entre les exons 2 et 3 et après l'exon 6 du gène *Pfkfb2* (**Figure 57A**). La lignée obtenue possédait malheureusement un allèle *rd8* dans son génome, mutation qui entraîne, comme l'allèle *rd1*, la dégénérescence des bâtonnets (Chang et al., 2002; Mattapallil et al., 2012). Nous avons donc éliminé cet allèle en croisant la lignée *Pfkfb2*^{tm1a} avec des souris sauvages ne portant pas l'allèle *rd8*. La souris *Pfkfb2*^{cd/cd} a ensuite été croisée avec une souris Flp-deleter [B6.129S4-Gt(ROSA)26Sortm1(FLP1)Dym/RainJ] de Jackson Laboratory. Cette souris exprime de façon précoce, durant le développement, la recombinaise flippase qui permet de retirer la cassette de sélection néomycine et le gène rapporteur LacZ. Pour inactiver *Pfkfb2* spécifiquement dans les cônes, nous avons ensuite croisé la lignée *Pfkfb2*^{LoxP/LoxP} avec une lignée de souris transgénique Cone-Cre obtenue de l'Université de l'Oklahoma (Le et al., 2004). Cette souris exprime la recombinaise CRE sous contrôle du le promoteur OPN1L/MW des opsines humaines verte et rouge (Mei et al., 2016), La recombinaise Cre excise le gène *Pfkfb2* au site LoxP et enlève les exons 3 à 6 de ce gène dans les cônes. Dans les cônes, la recombinaison par CRE produit une protéine PFKFB2 tronquée et non fonctionnelle. Malheureusement, durant le processus d'établissement de la lignée [*Cone-Cre*^{+/+} : *Pfkfb2*^{LoxP/LoxP}] nous nous sommes aperçu que la lignée Cone-Cre qui nous avait été transmise à l'origine possédait une allèle *rd1* dans son génome, nous avons donc croisé cette nouvelle lignée [*Cone-Cre*^{+/+} : *Pfkfb2*^{LoxP/LoxP}] entre elle afin d'éliminer l'allèle *rd1* (**Figure 57B**).

6. Etude phénotypique de la lignée [*Cone-Cre*^{+/+} : *Pfkfb2*^{LoxP/LoxP}]

Une fois la lignée mutante [*Cone-Cre*^{+/+} : *Pfkfb2*^{LoxP/LoxP}], nous avons mesuré la fonction des photorécepteurs de ces souris par électrorétinographie (ERG). Cet examen de l'œil destiné à enregistrer l'activité électrique de la rétine après une stimulation lumineuse permet de distinguer, au moyen de lumières d'intensités différentes, l'activité des cônes, sensibles aux fortes intensités (système photopique), de celle des bâtonnets, sensibles aux faibles intensités (système scotopique). Nous avons mesuré l'activité des photorécepteurs des souris [*Cone-Cre*^{+/+} : *Pfkfb2*^{LoxP/LoxP}] à des âges croissants. Nous n'avons pas observé de différence dans la fonction des bâtonnets des souris [*Cone-Cre*^{+/+} : *Pfkfb2*^{LoxP/LoxP}] par rapport à leur contrôle *Pfkfb2*^{LoxP/LoxP} à douze mois (**Figure 58A et B**). En revanche, à cet âge, l'enregistrement de l'onde b photopique, caractéristique de la fonction des cônes, montre une amplitude de réponse

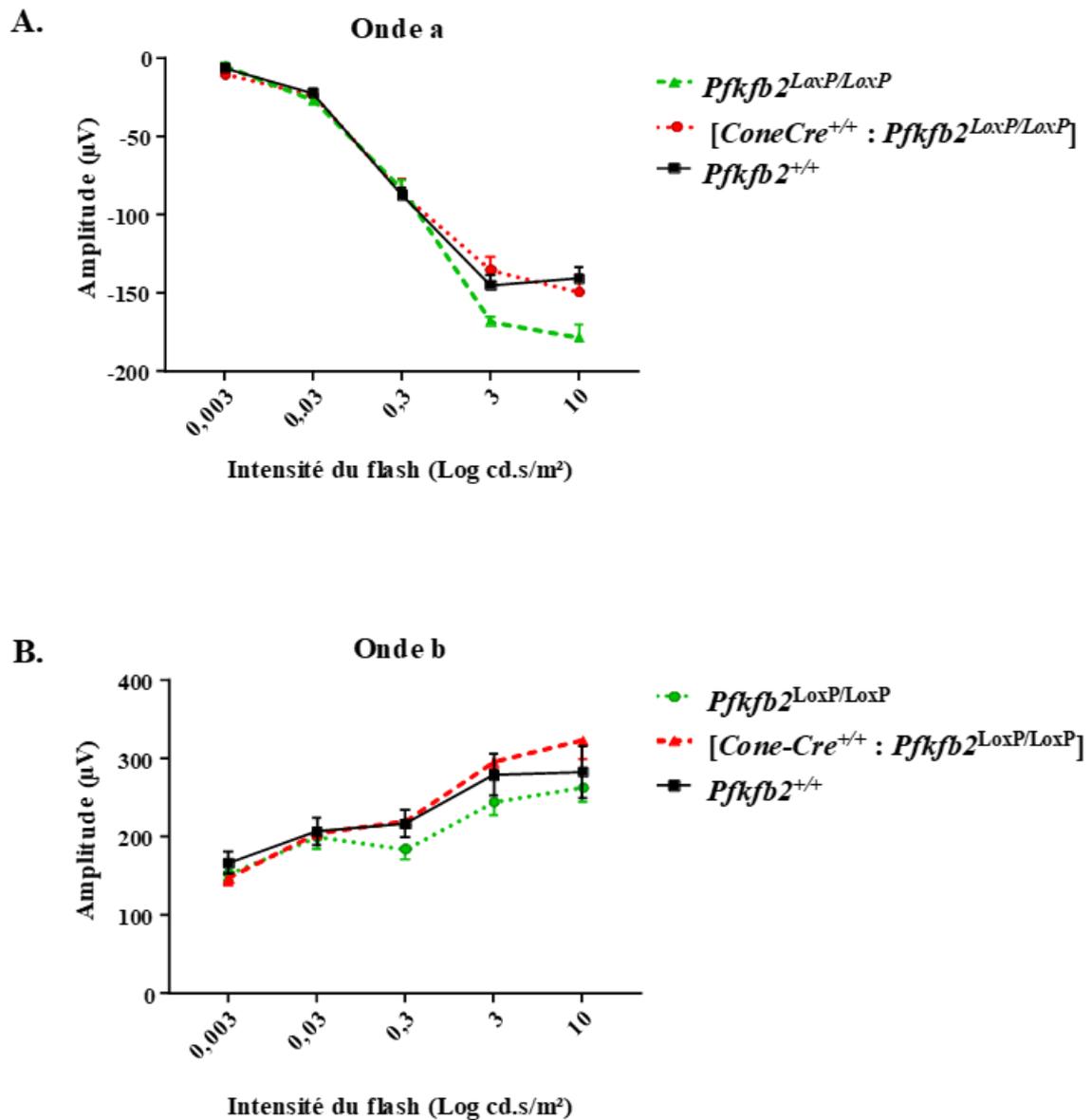


Figure 58 : Analyse de la fonction des bâtonnets chez les souris [*Cone-Cre*^{+/+} : *Pfkfb2*^{LoxP/LoxP}] à 12 mois. **A.** Amplitude en μV de l'onde a en condition scotopique chez les souris [*Cone-Cre*^{+/+} : *Pfkfb2*^{LoxP/LoxP}] ($n = 12$, SEM) et leur contrôle *Pfkfb2*^{LoxP/LoxP} ($n = 8$, SEM). **B.** Amplitude en μV de l'onde b en condition scotopique chez les souris [*Cone-Cre*^{+/+} : *Pfkfb2*^{LoxP/LoxP}] ($n = 12$, SEM) et leur contrôle *Pfkfb2*^{LoxP/LoxP} ($n = 8$, SEM).

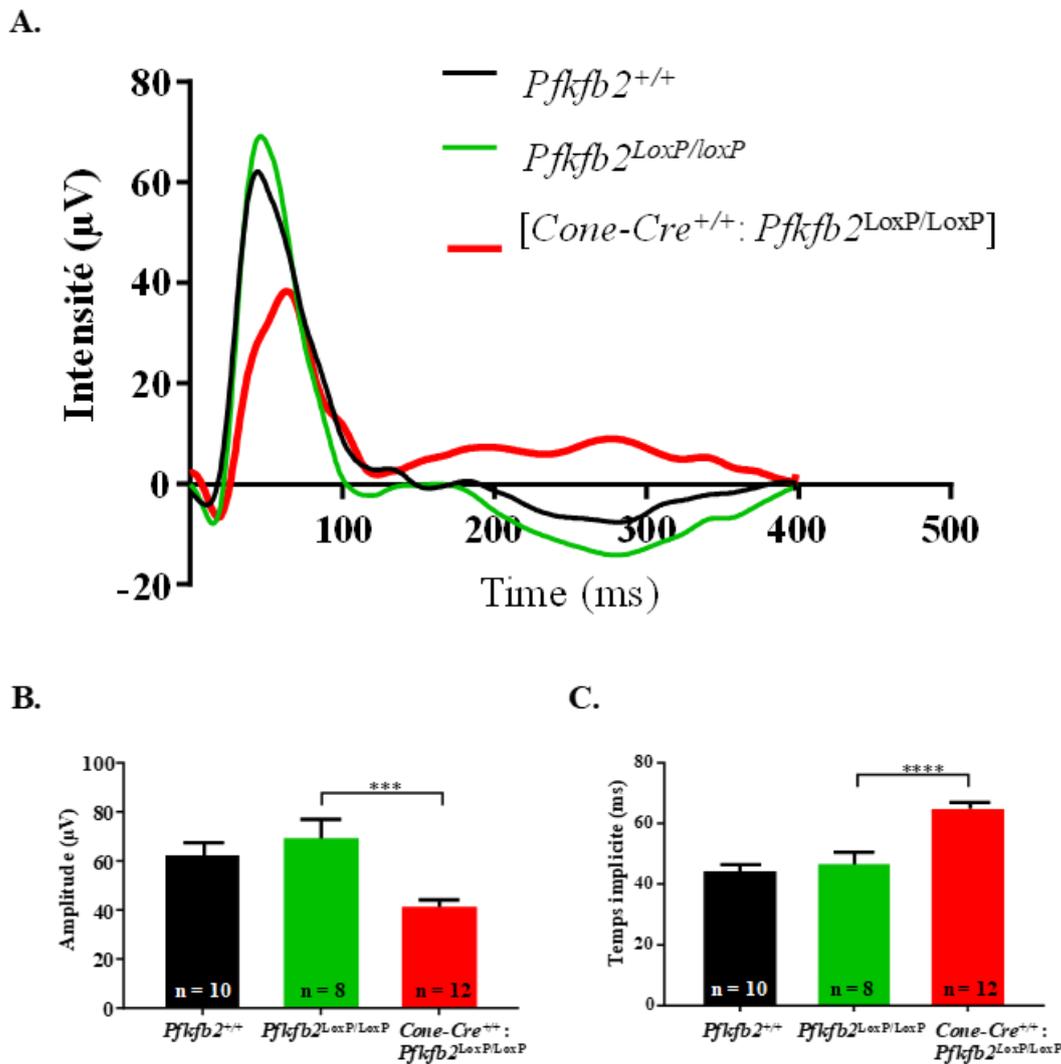


Figure 59 : Analyse de la fonction des cônes chez souris [*Cone-Cre*^{+/+} ; *Pfkfb2*^{LoxP/LoxP}] à 12 mois. A. Electrorétinogramme photopique 3,0 spécifique de la fonction des cônes. Les tracés obtenus sont les moyennes obtenues grâce au logiciel ERG generator. **B.** Amplitude en µV de l'onde b photopique chez les souris [*Cone-Cre*^{+/+} ; *Pfkfb2*^{LoxP/LoxP}] et leur contrôle *Pfkfb2*^{LoxP/LoxP}. Analyse statistique faite avec un test de comparaison multiple Tuckey valeur $p = 0,0004$ (SEM). **C.** Temps implicite de réponse des cônes en ms aux stimuli électriques des souris [*Cone-Cre*^{+/+} ; *Pfkfb2*^{LoxP/LoxP}] et son contrôle *Pfkfb2*^{LoxP/LoxP}. Analyse statistique faite avec un test de comparaison multiple Tuckey valeur $p < 0,0001$ (SEM).

réduite, statistiquement parlant (**Figure 59A et 59B**). Le délai de réponse aux stimuli électriques est augmenté en corollaire (**Figure 59C**). Ces résultats démontrent que l'inactivation du gène *Pfkfb2* dans les cônes réduit la fonctionnalité de ces derniers. Par conséquent *Pfkfb2* est essentiel au maintien de la fonction des cônes à long terme.

7. Expression tissulaire de *Pfkfb2* chez la souris sauvage C57Bl/6J

Il existe quatre isoenzymes PFKFB dans les génomes des vertébrés. Elles ont été nommées d'après le tissu à partir duquel elles ont été purifiées à l'origine, mais elles sont également exprimées dans d'autres tissus, à l'exception de l'isoenzyme testiculaire (PFKFB4) (Rider et al., 2004). L'isoenzyme 2 est connue pour être l'enzyme du cœur mais nous venons de démontrer que *Pfkfb2* est exprimé dans la rétine et est essentielle à la fonctionnalité à long terme des cônes. Nous avons mesuré son niveau d'expression par rapport à la référence, le cœur. L'étude du profil d'expression *in silico* dans différents tissus chez la souris sauvage C57Bl/6J (**Figure 60**) montre que le niveau d'expression de l'ARN messager du gène *Pfkfb2* est dominant dans la rétine, alors qu'elle est référencée comme étant l'isoenzyme du cœur. Pour étendre ces résultats *in silico*, nous avons examiné l'expression de PFKFB2 dans 3 tissus différents par *western blotting* : le cœur, le cerveau et la rétine. Grâce à un anticorps dirigé contre la protéine PFKFB2 (**Table 3**), nous avons observé que l'expression de cette enzyme est bien dominante dans la rétine (**Figure 61**).

8. Expression du gène *Pfkfb2* dans la rétine de souris *rd1*

Comme l'enzyme PFKFB2 est un acteur pressenti de la signalisation de RdCVF dans les cônes, qu'elle est exprimée dans la rétine et est essentielle à la fonctionnalité des cônes à long terme, nous avons étudié le profil d'expression du gène *Pfkfb2* dans la rétine de la souris *rd1* qui est le modèle murin autosomique récessif de RP. Lorsque nous comparons le profil d'expression au cours de la maturation post-natale de la rétine du gène de la rhodopsine, qui est un gène exprimé spécifiquement par les bâtonnets, et le gène de *Pfkfb2*, nous obtenons des profils d'expression très similaires, même si l'amplitude diffère (**Figure 62**). Ceci suggère que le messager de PFKFB2 est exprimé par les bâtonnets, en plus des cônes, ce qui semble être en

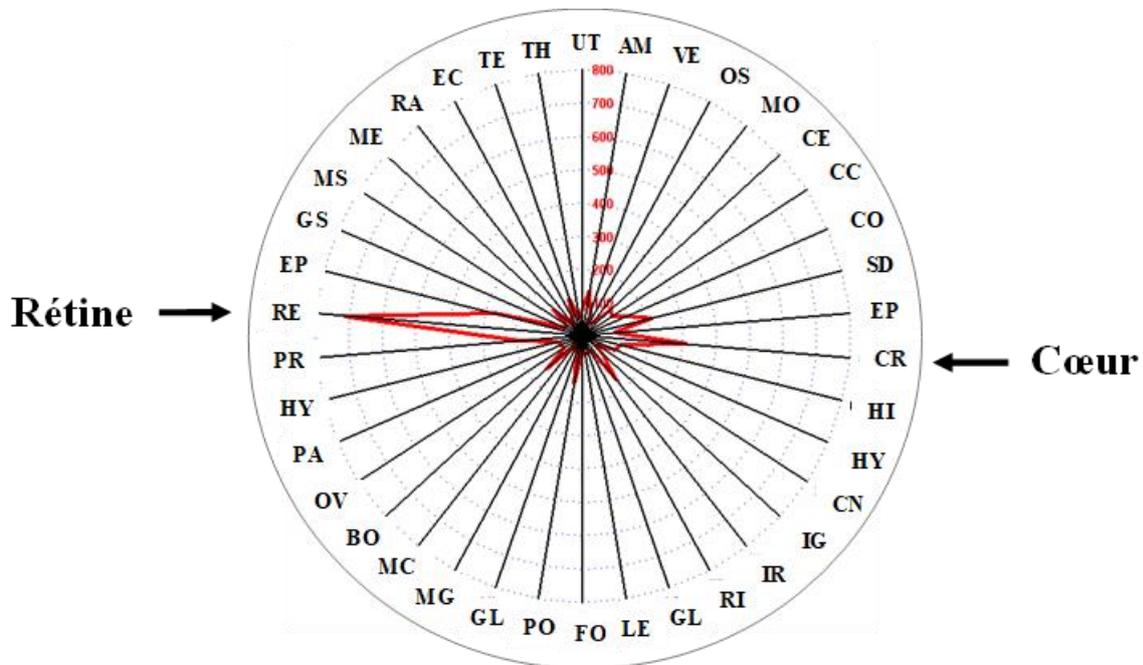
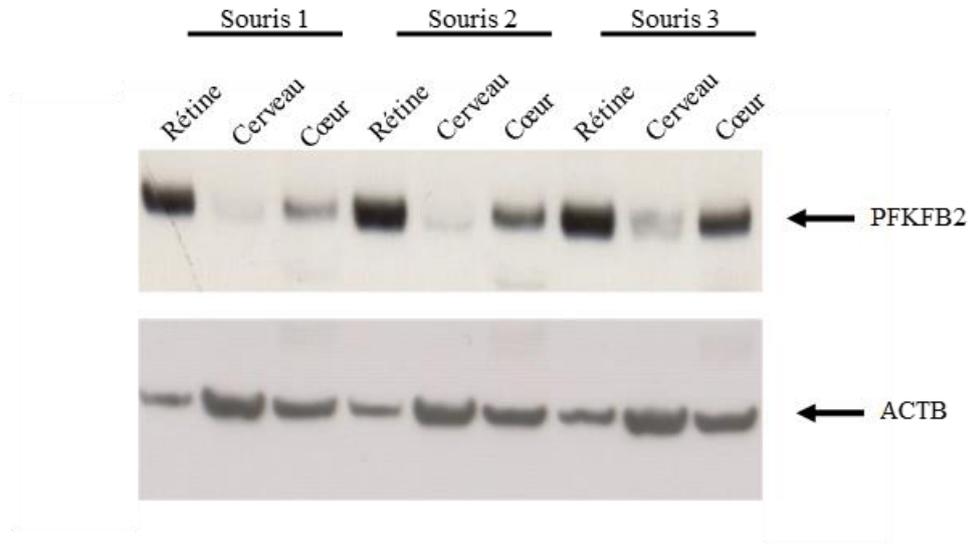


Figure 60 : Expression tissulaire de *Pfkfb2* chez la souris sauvage C57Bl/6J sous forme de radar. Profil d'expression de *Pfkfb2* utilisant la technologie Affymetrix probset 1429486_at. AM : amygdale, VE : vessie, OS : os, MO : moelle, CC : cortex cervical, CE : cervelet, CO : cornée, SD : striatum dorsal, EP : épiderme, CR : cœur, HI : hippocampe, HY: hypothalamus, CN : côlon, IR : iris, IG : intestin grêle, LE : lentille, GL : glande lacrymale, FO : foie, GL : ganglions lymphatiques, RI : rein, PO : poumon, MG : glande mammaire, MC : microglie, BO : bulbe olfactif, OV : ovaire, PA : pancréas, HY : hypophyse, PR : prostate, RE : rétine, EP : épithélium pigmenté, GS : glande salivaire, MS : muscle squelettique, ME : moelle épinière, RA : rate, EC : estomac, TE : testicule, TH : thymocytes CD8+, UT : utérus.

A.



B.

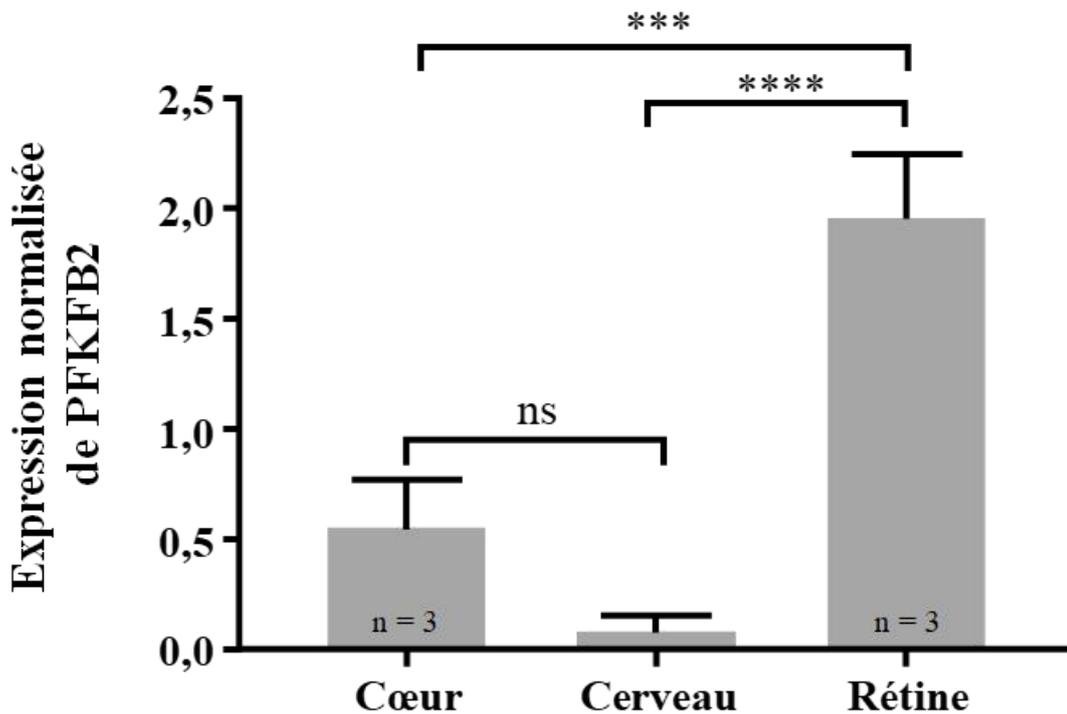


Figure 61 : Expression de *PFKFB2* chez la souris sauvage C57Bl/6J dans différents tissus.
A. Analyse par western blot de l'expression de la protéine PFKFB2 dans le cœur, rétine et cerveau de souris C57Bl/6J âgées de 2 mois. **B.** Quantification de l'expression de PFKFB2 en fonction de l'expression de l'actine. Analyse statistique : test multiple comparaison de Tuckey. Cœur vs rétine valeur $p = 0,0005$ (SEM), rétine vs cerveau valeur $p < 0,0001$ (SEM), cœur vs cerveau valeur $p = 0,0790$ (SEM), ns= non statistiquement significatif.

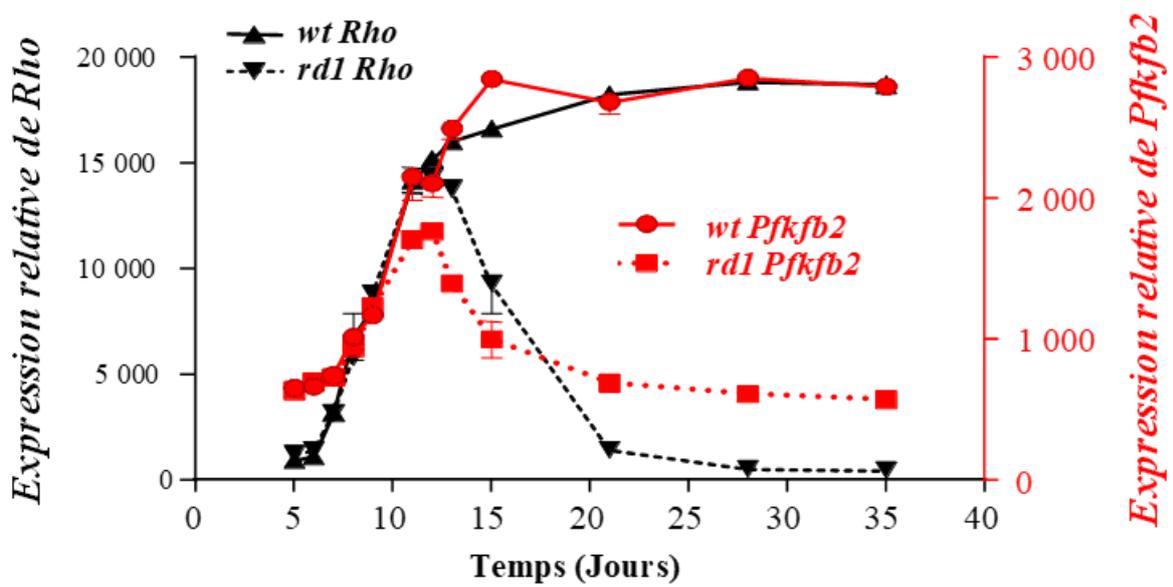


Figure 62 : Profil d'expression au cours du temps de l'ARN messenger du gène *Pfkfb2* chez la souris *rd1*. Comparaison avec le gène de la rhodopsine qui est un gène spécifiquement exprimé par les bâtonnets. Données Affymetrix (Ait-Ali et al., 2015).

contradiction avec les résultats fonctionnels obtenus chez la souris [*Cone-Cre*^{+/+} : *Pfkfb2*^{LoxP/LoxP}].

9. Expression cellulaire de PFKFB2 dans la rétine de souris C57Bl/6J

Pour confirmer l'expression cellulaire de l'enzyme PFKFB2 dans la rétine, nous avons utilisé la technique d'immunohistochimie qui permet de localiser une protéine dans le tissu. Dans ce cas, nous avons utilisé un anticorps de chez AssayBiotech (**Table 3**) après avoir testé d'autres anticorps qui se sont avérés être non spécifiques et dont l'un a malheureusement été utilisé dans une étude publiée en 2017 (Chinchore et al., 2017) (**Figure 63**). Nous avons également utilisé la lectine *Peanut Agglutinin* (PNA) qui marque de façon spécifique les cônes ; en fait la matrice extracellulaire entourant les cônes (Blanks and Johnson, 1984). Les images en microscopie confocale sur coupe de rétine de souris sauvage C57Bl/6J, montrent une co-localisation de PFKFB2 avec la marquage PNA dans les cônes de la rétine de la souris sauvage (**Figure 64**). Cette co-localisation montre que PFKFB2 est exprimée par les cônes, mais pas par les bâtonnets. Comme la rétine de souris est différente de la rétine humaine de par la présence de la fovéa, présente uniquement chez les primates, nous avons vérifié si PFKFB2 était également exprimée dans les cônes humains. Nous nous sommes procuré des rétines humaines post-mortem au *national disease research interchange* (NDRI). Les images montrent également une co-localisation du marquage PNA et de PFKFB2 (**Figure 65**). PFKFB2 est également exprimé dans les cônes de la rétine humaine.

10. Etude tissulaire de l'expression du gène *Pfkfb2*

10.1. Etude de l'expression par hybridation *in situ*

L'enzyme PFKFB2 est exprimée dans les cônes, pourtant l'expression de l'ARN messager *in silico* a un profil Africain, *rod-like* (**Figure 49**). Ceci indique que le mRNA est exprimé par les bâtonnets et les cônes. Afin d'étayer l'analyse transcriptomique faite chez la souris *rd1*, nous avons effectué une analyse par hybridation *in situ* de l'expression de *Pfkfb2* dans la rétine de souris sauvage C57Bl/6J afin de confirmer ou d'infirmer l'expression

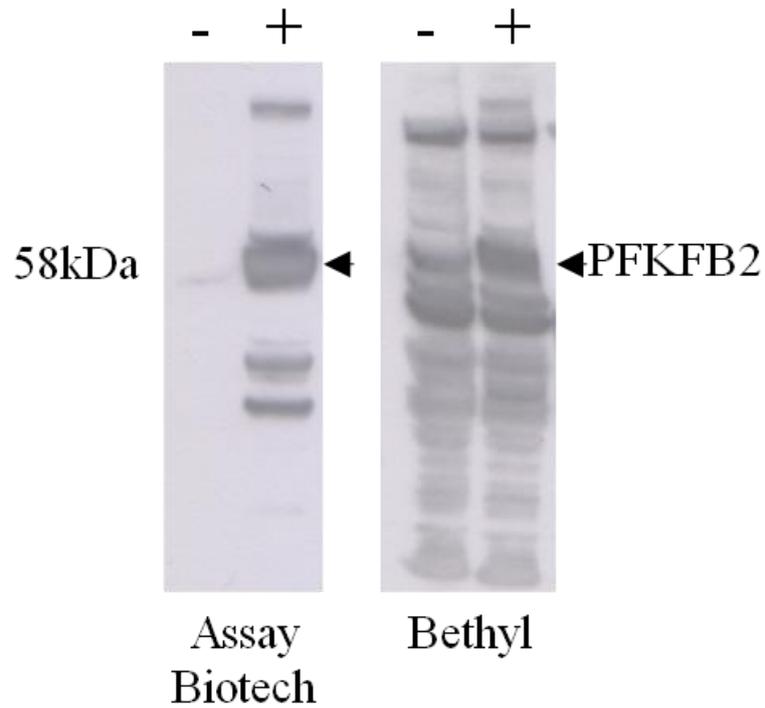


Figure 63 : Mise en évidence de la spécificité de l'anticorps anti-PFKFB2 d'AssayBiteoch. L'anticorps AssayBiotech (Ref: B0761) en comparaison à l'anticorps de Bethyl (Ref : A304-286A), utilisé par le groupe de Connie Cepko (Chinchore et al., 2017). Les signes - ou + correspondent à la transfection de cellules COS-1 avec pcDNA3 et pcDNA3-PFKFB2 respectivement.

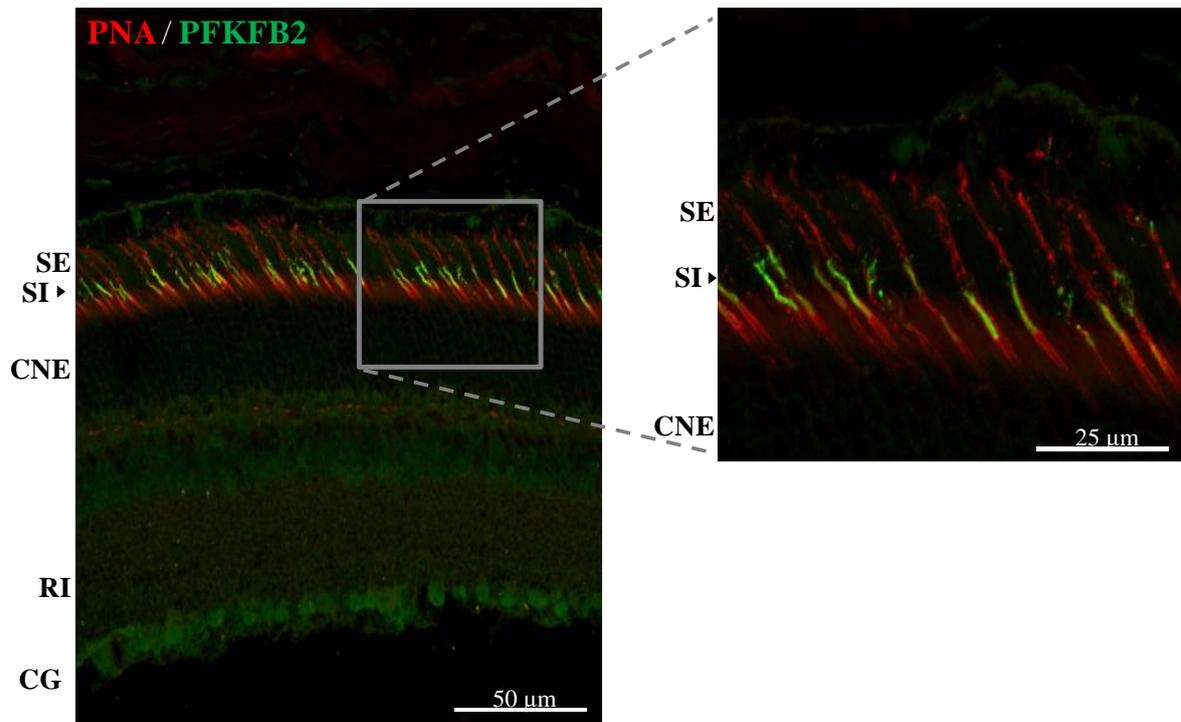


Figure 64 : Expression cellulaire de PFKFB2 dans la rétine de souris sauvage (C54Bl/6J). PFKFB2 co-localise avec le marquage PNA, un marqueur des cônes. SE : segments externe, SI : segments interne, CNE : couche nucléaire externe, RI : rétine interne, CG : couche des ganglionnaires.

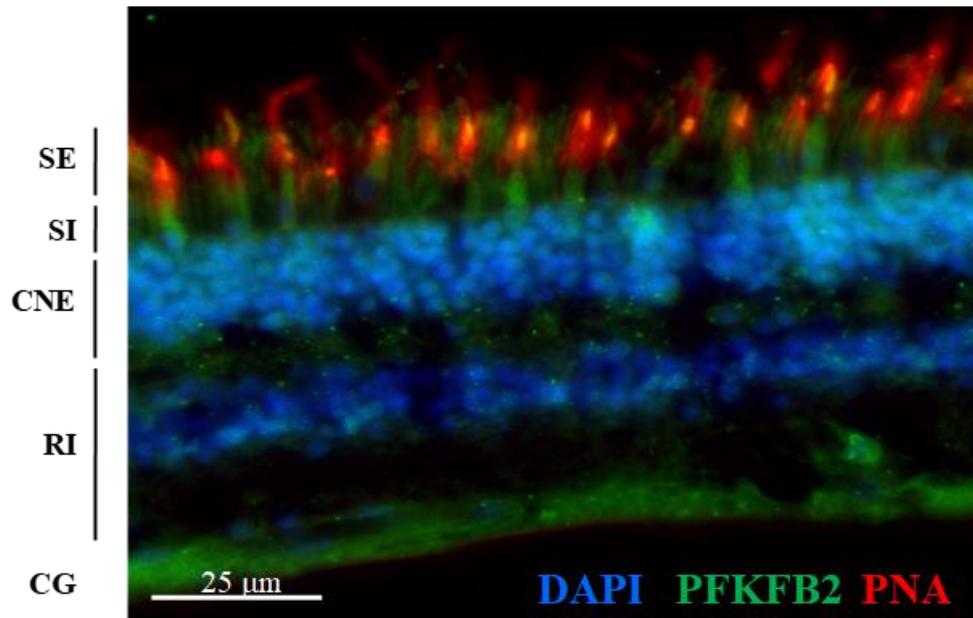


Figure 65 : Expression cellulaire de PFKFB2 dans la rétine humaine. PFKFB2 co-localise avec le marquage PNA. SE : segments externe, SI : segments interne, CNE : couche nucléaire externe, RI : rétine interne, CG : couche des ganglionnaires.

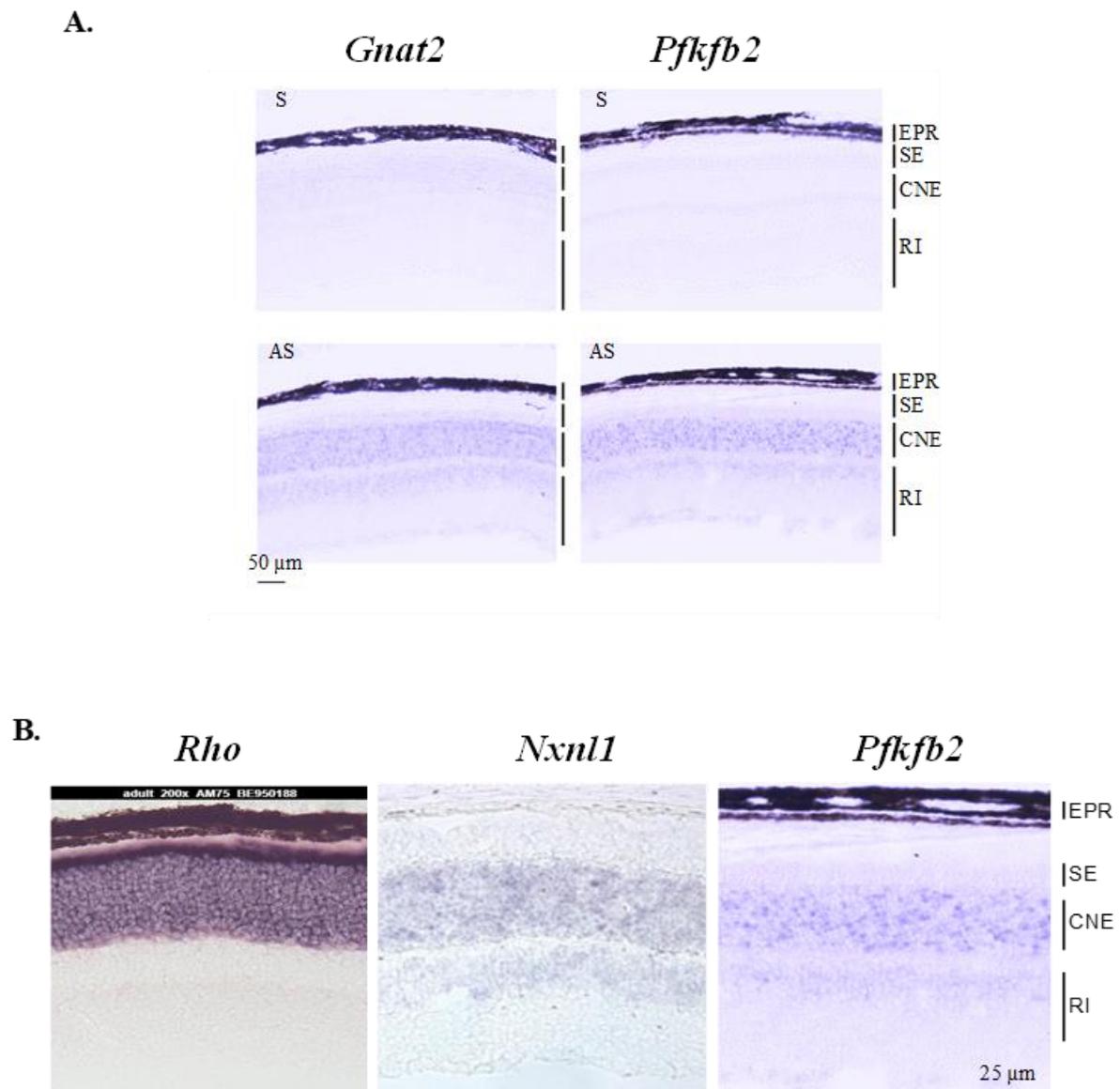


Figure 66 : Etude tissulaire de l'expression de *Pfkfb2* par hybridation *in situ* sur coupe de rétine de souris sauvage C57Bl/6J. A. Hybridation *in situ* sur coupe de rétine de souris C57bl/6J pour mettre en évidence la localisation tissulaire de *Pfkfb2* en comparaison avec *Gnat2*, gène spécifiquement exprimé par les cônes. La localisation des ARN messagers est située dans la couche nucléaire externe. S : sens, AS : antisens, EPR : épithélium pigmentaire rétinien, SE : segments externes, CNE : couche nucléaire externe, RI : rétine interne. **B.** Comparaison de l'expression de l'ARN messager de *Pfkfb2* et des ARN messagers de gènes spécifiquement exprimés par les bâtonnets, *Rho* et pour les bâtonnets et les cônes, *Nxn11* (Blackshaw et al., 2001).

rétinienne que nous avons obtenue par l'utilisation de puces Affymetrix. Cette technique permet de localiser l'ARN sur une coupe histologique de tissu. Le principe repose sur la complémentarité des bases nucléiques entre elles. Nous avons choisi comme contrôle cellulaire des cônes une sonde antisens s'appariant à l'ARN messager de *Gnat2*, un marqueur des cônes (Magovcevic et al., 1995). La transducine est une protéine G qui stimule le couplage de la rhodopsine et de la cGMP-phosphodiesterase lors des impulsions visuelles. Les sous-unités alpha de la transducine dans les bâtonnets et les cônes sont codées par des gènes distincts, *Gnat1* et *Gnat2*. Le gène *Gnat2* code pour la sous-unité alpha des cônes. L'analyse du signal *in situ* (**Figure 66A**) montre une expression des ARNm de *Pfkfb2* dans la couche nucléaire externe de la rétine, au même titre que *Gnat2*. Même si le signal par hybridation *in situ* avec la sonde de *Pfkfb2* antisens ressemble à celui obtenu avec un marqueur des cônes, l'examen de l'expression d'un marqueur des bâtonnets, la rhodopsin (Blackshaw et al., 2001) qui est accessible via le site <https://cepko.med.harvard.edu/>, ou celle du gène *Nxn11*, exprimé par les bâtonnets et les cônes (Mei et al., 2016; Reichman et al., 2010) (**Figure 66B**) ne permet pas de conclure que l'ARN messager de *Pfkfb2* est exprimé uniquement par les cônes.

10.2. Etude de l'expression par RNAseq

Afin de répondre à cette interrogation, nous avons tenté de développer une méthode indirecte. Nous avons opté pour une analyse RNAseq quantitative du transcriptome des cônes et des bâtonnets. Pour y parvenir, il nous faudrait séparer suffisamment de bâtonnets et de cônes par tri cellulaire, afin d'extraire une quantité suffisante d'ARN de chaque type cellulaire et procéder ainsi au séquençage des ARNs dont celui de *Pfkfb2*. Le principe du tri cellulaire que nous avons entrepris repose sur la séparation physique des différentes populations de photorécepteurs de la rétine de la souris. Cette séparation est réalisée grâce au tri des cellules qui émettent la fluorescence d'un anticorps spécifique, couplé à un fluorochrome. Pour séparer les bâtonnets et les cônes de rétine de souris sauvage C57Bl/6J de 2 mois, nous avons utilisé un anticorps monoclonal de souris, dirigé contre la partie N terminale de la rhodopsine (clone 4D2 commercialisé par Millipore ref : MABN15) (**Table 3**) pour purifier les bâtonnets. Nous avons utilisé un anticorps monoclonal de souris, dirigé contre l'arrestine des cônes (mCar) pour purifier les cônes (Zhu et al., 2002). Nous avons obtenu ce dernier anticorps grâce à une collaboration avec Cheryl Craft de l'*University of Southern California* (USC). De nombreuses mises au point ont été nécessaires pour trouver les conditions opérationnelles pour les anticorps

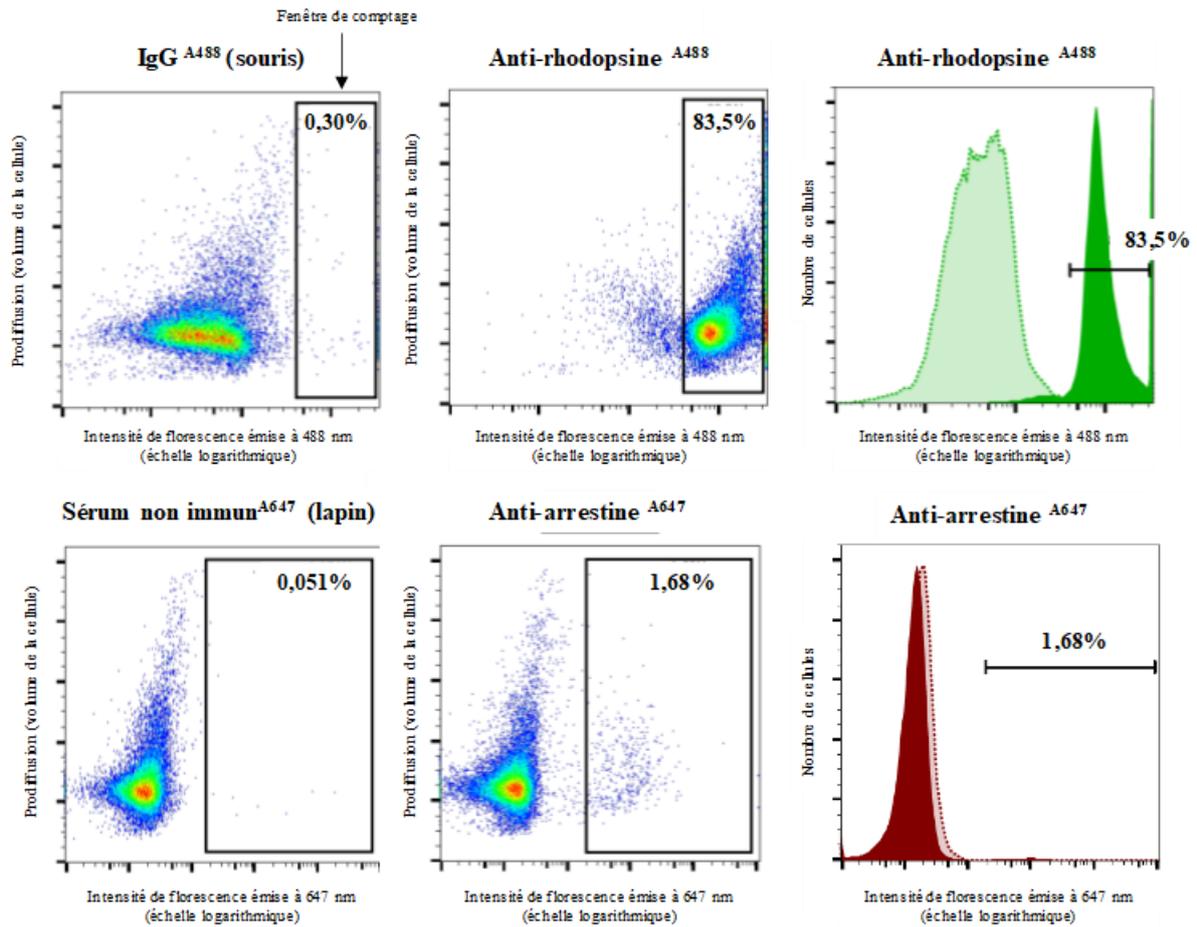


Figure 67 : Mise au point au FACS afin de différencier individuellement les populations de bâtonnets et de cônes. L'anticorps dirigé contre la rhodopsine est utilisé pour visualiser la population de bâtonnets qui représente 83,5% des cellules rétinienne. L'anticorps dirigé contre l'arrestine des cônes (ARR3) est utilisé afin de visualiser la population cônes qui représente 1,68% des cellules rétinienne.

En cytométrie de flux. Dans la rétine de souris, les bâtonnets représentent 97% des photorécepteurs et les cônes, seulement 3%. Les bâtonnets représentent plus de 40% du transcriptome de la rétine de la souris (Pauly et al., 2019). Nous avons réussi à différencier les deux populations de photorécepteurs dans un mélange cellulaire comptabilisant 83,5% de bâtonnets et de 1,68% de cônes (**Figure 67**). L'étape suivante consistait à purifier les deux populations. Nous avons choisi de le faire en deux temps car le rapport des populations bâtonnets/cônes étant tellement important que séparer les deux populations à partir de la même suspension cellulaire, aurait permis de récupérer beaucoup de bâtonnets mais trop peu de cônes. A partir d'une suspension cellulaire contenant 2 millions de cellules rétinienne triées avec l'anticorps anti-rhodopsine, nous avons ainsi obtenu 208 712 bâtonnets en 30 minutes. Indépendamment, à partir d'une suspension cellulaire contenant 6,5 millions de cellules rétinienne et après 3 heures de triage, nous avons récupéré 46 622 cônes. Le temps de triage des cônes est beaucoup plus long que le temps de triage des bâtonnets car il y a seulement 1,68% de cônes dans la préparation cellulaire rétinienne, ceci explique que ce tri prenne plus de temps. Ces deux populations cellulaires ont été congelées immédiatement après triage. L'extraction d'ARN des deux suspensions a donné un rendement assez faible et nous n'avons pas pu récupérer d'ARN issu des cônes et une faible quantité d'ARN (26 ng) à partir des bâtonnets. Théoriquement, nous aurions dû récupérer une plus grande quantité d'ARN de bâtonnets car nous disposions d'une quantité de cellules suffisante. Nous nous sommes donc interrogé sur la possible dégradation des ARN lors de l'étape de préparation des cellules pour le tri cellulaire, même en présence d'un inhibiteur de ribonucléase, le RNase inhibitor de Promega (RNasin réf. : N2611), capable d'inhiber les ribonucléases de mammifères à chaque étape de la procédure. Le traitement des cellules (isolation de la rétine, dissociation cellulaire, fixation, et marquage des cellules) pour le tri cellulaire prend environ 8 heures et les cellules sont ensuite laissés la nuit à 4°C avant de procéder au tri, qui prend également plusieurs heures. Pour répondre à notre interrogation, nous avons simulé une préparation cellulaire de toute la rétine en vue d'un tri cellulaire et nous avons procédé à l'extraction des ARN de ces cellules à deux étapes du processus. Une première extraction a été réalisée à la suite de la préparation cellulaire, soit 8 heures après dissection des rétines et une deuxième extraction, 25 heures après dissection, ce qui inclus le temps imparti au tri cellulaire. Nous avons aussi utilisé deux kits d'extraction différents, l'un est utilisé habituellement au laboratoire, le kit Quiagen Micro-Prep et l'autre a été élaboré pour extraire l'ARN de cellules fixées et marquées, le kit *recover all total nucleic acid isolation* d'Invitrogen. Les résultats obtenus sont sans ambiguïté. Le meilleur rendement d'extraction correspond à la condition : 8 heures post dissection. Ce rendement est

Dissection des rétines de souris C57Bl/6J

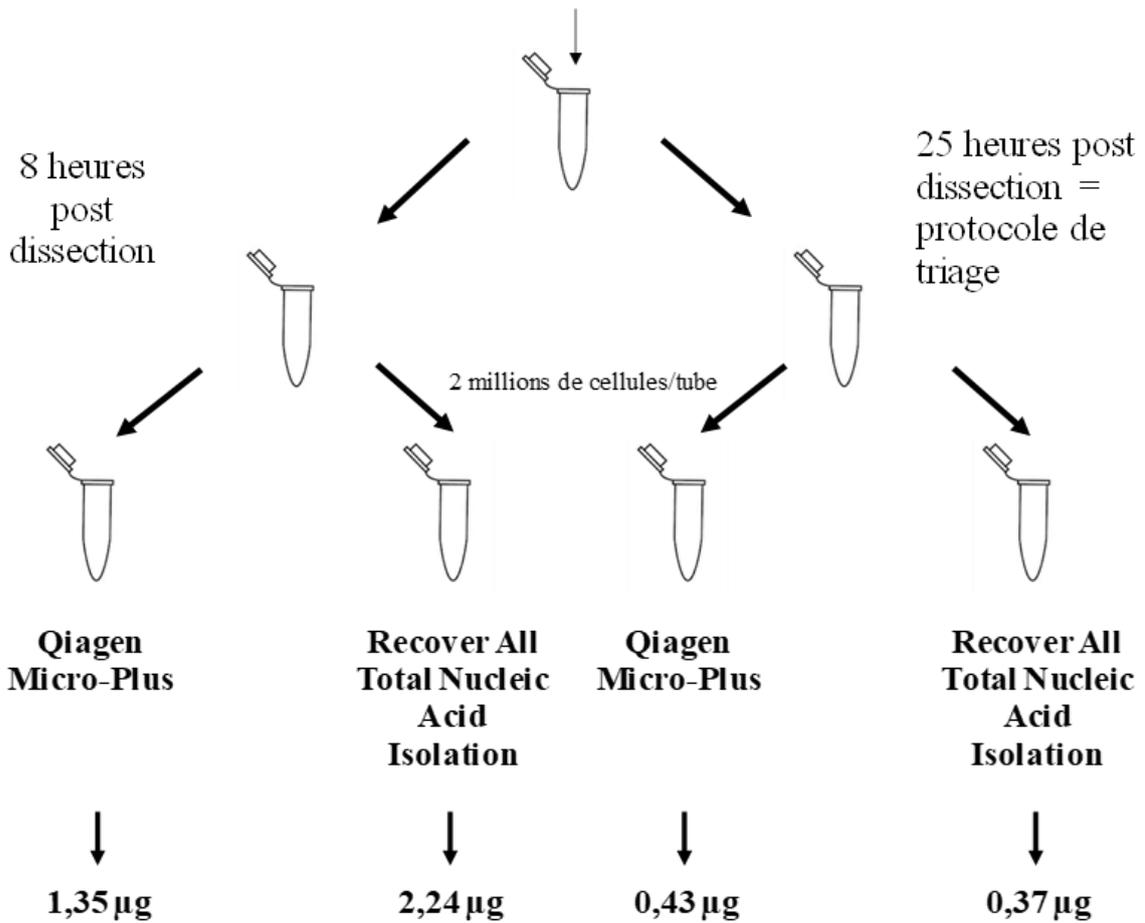


Figure 68 : Comparaison à deux temps post dissection de deux kits d'extraction d'ARN Qiagen Micro-Plus et Recover All Total Nucleic Acid Isolation.

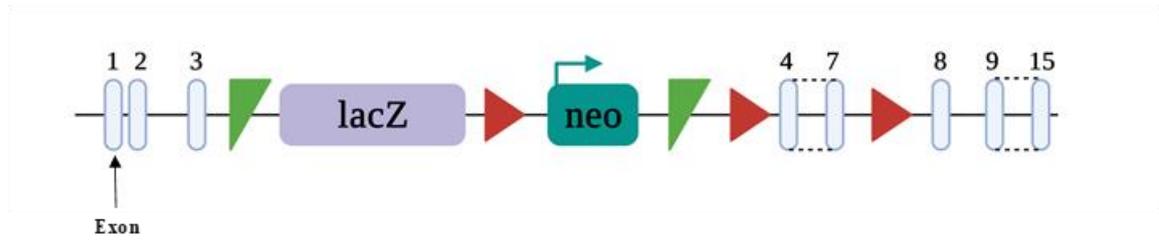
plus élevé par l'utilisation du kit développé pour les cellules marquées (**Figure 68**). Même en présence d'inhibiteurs de ribonucléases et du maintien des extraits à 4°C avant le tri cellulaire, les ARN sont progressivement dégradés au cours du processus. Ceci impliquait donc que pour avoir un rendement optimal, le tri cellulaire soit effectué immédiatement après le marquage des cellules. Or, le temps de marquage des cellules prend environ 8 heures, donc une journée de travail, il faudrait commencer le tri en fin de journée et procéder au triage la nuit. La plateforme de tri cellulaire avec laquelle nous travaillons est bien entendu fermé la nuit. De plus, pour faire une analyse RNAseq il faut au minimum 200 ng d'ARN, or lors de nos tests avec les différents temps d'extraction post dissection, nous étions partis de 2 millions de cellules rétinienne, ce qui équivaut à 4 rétines (2 souris) et nous avons obtenu au maximum 2.2 µg d'ARN, à partir de toutes les cellules rétinienne. Il faudrait donc, selon nos calculs, obtenir au minimum 200 000 cellules triées, pour avoir 200 ng d'ARN total, ce qui est requis pour le séquençage. Ceci est réalisable pour les bâtonnets si nous procédons au tri immédiatement après les étapes de marquage, puisque lors du précédent tri nous avons obtenu 208 712 bâtonnets. Par contre, pour qui concerne les cônes, nous avons obtenu 46 662 en partant de 6.5 millions de cellules rétinienne. Selon nos calculs, il faudrait 4.3 fois plus de cellules rétinienne, soit 28 millions de cellules au départ qui correspond à 55 rétines, soit 28 souris à sacrifier et à disséquer pour obtenir 200 000 cônes. Ce nombre important de souris rallonge considérablement le temps de préparation des cellules et diminue, selon notre expérience, le rendement d'extraction de l'ARN. En plus, lors du précédent tri nous avons mis 3 heures pour récupérer 46 622 cônes, donc toujours selon nos calculs, il faudrait 13 heures de tri pour récupérer les 200 000 cônes nécessaires pour obtenir les 200 ng d'ARN. Le rallongement du temps de préparation et de marquage des cellules ainsi que le temps de triage, fait que cette expérience ne nous paraît en somme pas techniquement réalisable pour les cônes. Le rendement d'extraction des ARN après toutes ces heures de travail serait quasiment nul. Etude de l'expression tissulaire de *Pfkfb2* chez la souris *Pfkfb2^{cd/cd}*

11. Etude de l'expression tissulaire de *Pfkfb2* chez la souris

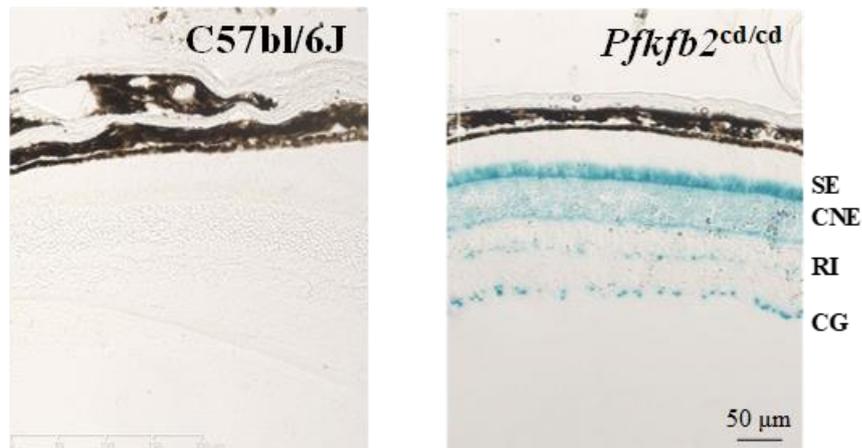
Pfkfb2^{cd/cd}

Nous avons donc employé une autre stratégie afin de caractériser le profil d'expression du gène *Pfkfb2* dans la rétine. La souris *Pfkfb2^{cd/cd}* qui a servie à établir la lignée [*Cone-Cre^{+/+}* :

A.



B.



C.

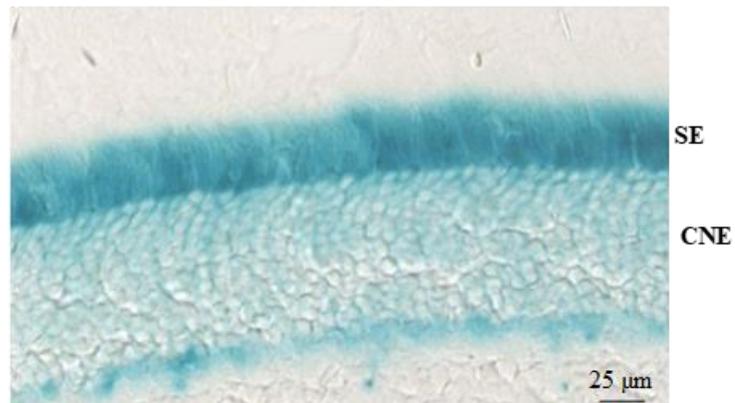


Figure 69 : Expression du gène rapporteur de la β -galactosidase chez la souris *Pfkfb2^{cd/cd}*.
A. Carte du gène *Pfkfb2* chez la souris *Pfkfb2^{cd/cd}*. **B.** coloration β -galactosidase SE : segments externe, SI : segments interne, CNE : couche nucléaire externe, RI : rétine interne, CG : couche des cellules ganglionnaires. **C.** La coloration β -galactosidase à plus fort grossissement.

Pfkfb2^{LoxP/LoxP}] possède une cassette d'un gène rapporteur LacZ (le gène de la β -galactosidase de l'opéron lactose) entre l'exon 3 et 4 de *Pfkfb2* (**Figure 69A**). Ce gène rapporteur permet de mettre en évidence l'activité du promoteur de *Pfkfb2* dans la rétine. Nous avons procédé à un test enzymatique pour révéler l'activité de la β -galactosidase et donc l'activité du promoteur de *Pfkfb2*, sur des coupes de rétine des souris *Pfkfb2*^{cd/cd}. Le test enzymatique révèle un marquage spécifique au niveau des segments externes des photorécepteurs, ainsi que dans les cellules ganglionnaires (**Figure 69B**). L'ARNm de la β -galactosidase est traduit en protéine au sein du segment interne des bâtonnets, mais comme le segment externe sert de destination par défaut pour le trafic des protéines dans les photorécepteurs (Baker et al., 2008), la coloration bleue de la β -galactosidase se retrouve principalement au niveau des segments externes des bâtonnets. A plus fort grossissement, la coloration β -galactosidase qui entoure les noyaux de la couche nucléaire externe indique que le promoteur de *Pfkfb2* est actif dans les bâtonnets qui constituent 97% des cellules de cette couche de la rétine chez la souris (**Figure 69C**).

12. Etude de l'expression de la protéine PFKFB2 chez la souris *rd1*

Grâce aux expériences précédentes, nous savons que l'analyse *in silico* du profil d'expression de *Pfkfb2*, qui montre un profil *Rod-like*, est confirmée par l'étude de l'activité du promoteur de *Pfkfb2* chez la souris *Pfkfb2*^{cd/cd}. En revanche, ces résultats sont en contradictions avec l'étude fonctionnelle de PFKFB2 chez les cônes ainsi que son expression par les photorécepteurs, car la protéine est exprimée par les cônes, mais pas par les bâtonnets (**Figure 64**). Pour confirmer que la protéine PFKFB2 n'a pas un profil d'expression d'une protéine spécifique des bâtonnets comme le suggère l'expression de son messenger, nous avons comparé l'expression des ARNm et des protéines des gènes *Pfkfb2* et de *Rho* dans la rétine de la souris *rd1* à 15 jours, *post-natal day* 15 (PN15) et à 22 jours. Nous avons analysé l'expression des 2 protéines, PFKFB2 et la rhodopsine, par *western blotting* chez des souris sauvages et *rd1* à deux âges critiques de la dégénérescence des bâtonnets chez la souris *rd1*. Nous observons qu'à PN15, au stade où les bâtonnets ont commencé à dégénérer chez la souris *rd1*, l'expression de la rhodopsine chute de 96.6%, alors que l'expression de PFKFB2 ne diminue que de 25% (**Figure 70**). A PN22, chez la souris *rd1*, les bâtonnets ont complètement dégénéré, nous

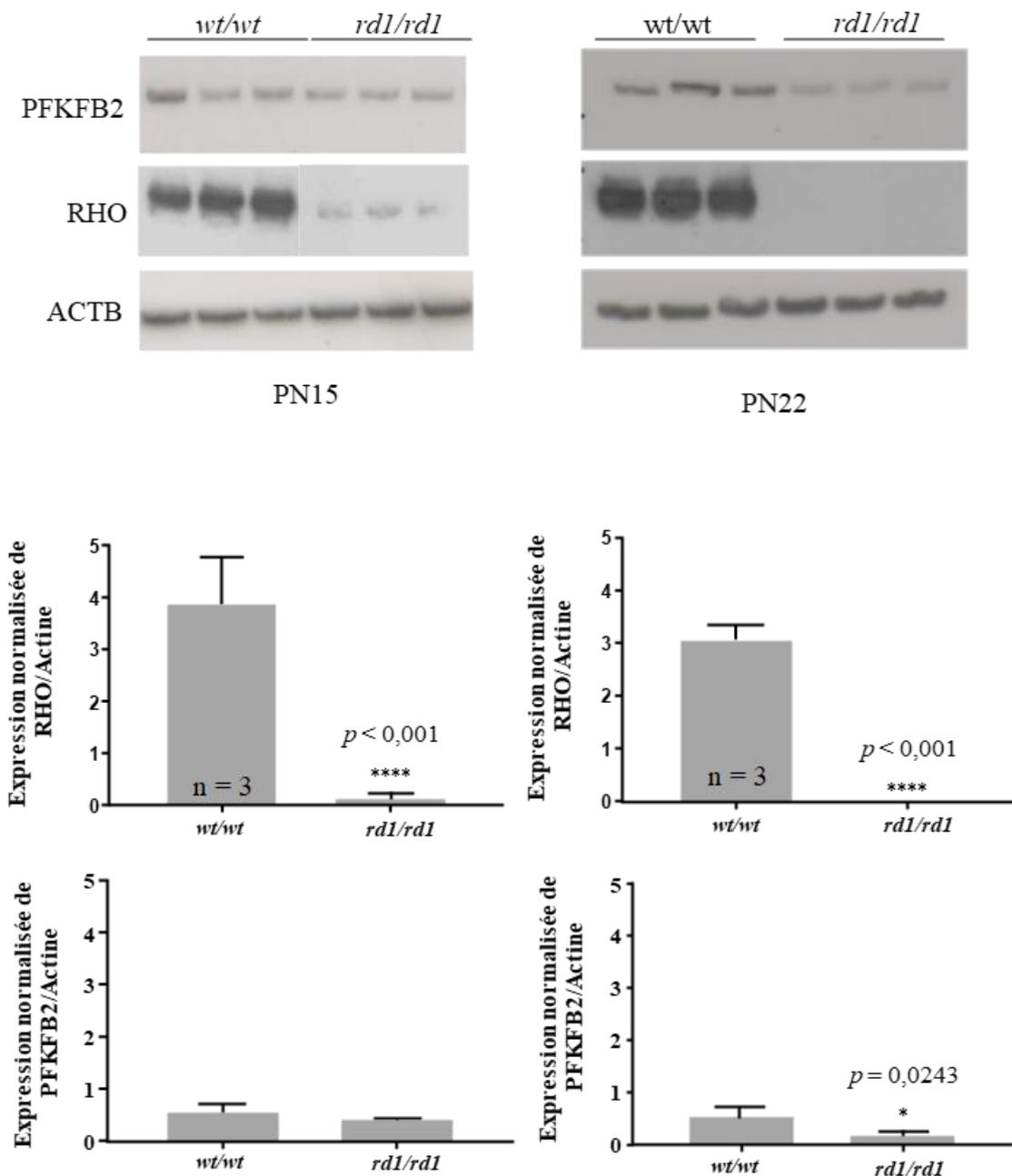


Figure 70 : Expression de la protéine PFKFB2 chez la souris *rd1* en comparaison à celle de la rhodopsine. Etude par *western blotting* de l'expression des protéines RHO et PFKFB2 chez la souris *rd1* au cours de la dégénérescence des bâtonnets. L'analyse statistique à été faite avec un test de Student. **** $p < 0,001$ (SEM). * $p = 0,0243$.

observons donc une perte totale de l'expression de la rhodopsine, alors que PFKFB2 diminue uniquement de 61%. D'après ces résultats nous constatons que la protéine PFKFB2 n'a pas un profil d'expression similaire à celui de la rhodopsine, une protéine spécifiquement exprimée par les bâtonnets. Le fait que PFKFB2 ait une expression diminuée au cours du temps chez la souris *rd1*, montre que l'expression de cette protéine est dépendante des bâtonnets, ce qui est compatible avec la régulation de son expression par RdCVF. La protéine PFKFB2 est exprimée par les cônes mais de manière dépendante des bâtonnets.

13. Pourquoi le gène *Pfkfb2* est exprimé par les bâtonnets et les cônes, mais que la protéine ne soit exprimée que par les cônes ?

Comment expliquer le fait que le messenger du gène *Pfkfb2* soit exprimé par les bâtonnets et les cônes, mais que la protéine ne soit exprimée que par les cônes ? La première hypothèse que nous avons émise est que l'ARN messenger de *Pfkfb2* est exprimé par les bâtonnets et les cônes, mais que la protéine PFKFB2 n'est pas stable dans les bâtonnets. Ainsi l'isoenzyme PFKFB3 n'est pas exprimée par les neurones du cerveau mais à des niveaux élevés par les astrocytes. Mais le fait que ces neurones contiennent le même taux d'expression d'ARNm de *Pfkfb3* que les astrocytes suggère que la concentration de PFKFB3 dans ces neurones est régulée de manière post-transcriptionnelle (Herrero-Mendez et al., 2009). En effet, il a été montré que PFKFB3 était dégradé par le protéasome. Des études sur le mécanisme de cette dégradation protéasomale ont révélées que PFKFB3 contient un boîte KEN qui commence à la position 142 de la protéine (Bolanos et al., 2010). Ce motif cible des protéines pour l'ubiquitination par l'activation de l'anaphase complexe/cyclosome (APC/C) lorsqu'il est lié à son activateur CDH1. APC/C-CDH1 est une ubiquitine ligase E3 connue pour son rôle dans la régulation de la mitose et de la méiose, la suppression tumorale et la stabilité du génome. Cette ubiquitination adresse PFKFB3 au protéasome, pour y être dégradé. Nos recherches *in silico*, n'ont pas révélé de boîte KEN similaire dans la séquence de PFKFB2, ce qui invalide l'hypothèse que PFKFB2 est dégradé dans les bâtonnets, par adressage de PFKFB2 au protéasome. Une deuxième hypothèse est que la traduction du messenger de PFKFB2 dans les bâtonnets est bloquée. Nous avons cherché quel type de mécanisme pourrait bloquer la traduction et parmi les mécanismes qui peuvent réguler négativement l'expression de PFKFB2 par les bâtonnets il y en a un qui nous a semblé intéressant : l'action de microARNs. Les miARNs sont des régulateurs post-transcriptionnels capables d'éteindre l'expression de gènes. Leur appariement à un ARN

messager cible peut conduire à l'inhibition de sa traduction de par le degré de complémentarité entre la séquence du miARN et celle de son ARNm cible (Huntzinger and Izaurralde, 2011). Parce qu'ils affectent l'expression de nombreux gènes, les miARNs interviennent dans la plupart des processus biologiques. Pour étayer cette hypothèse, nous avons cherché s'il existait dans la littérature un miARN ciblant spécifiquement de *Pfkfb2*. Nous avons trouvé plusieurs microARN qui interagissaient avec l'ARN messager de *Pfkfb2*. MiR-163 inhibe la prolifération et l'invasion cellulaire en bloquant l'effet Warburg dans le cancer de l'estomac en se liant directement au 3' *untranslated regions* (UTR) de *Pfkfb2*, supprimant ainsi l'expression de la protéine PFKFB2. MiR-182 se lie directement à l'ARN messager de *Pfkfb2* dans les cellules du glioblastome et le couple miR-182/PFKFB2 module ainsi la glycolyse, la sécrétion de la chimiokine CXCL14 et l'invasion de cellules de gliales (He et al., 2018). Fait intéressant, la voie de signalisations de miR-182 et miR-183 est nécessaires au maintien des segments externes des cônes *in vivo* ainsi qu'à leur fonction (Busskamp et al., 2014).

13.1. Etude *in silico* des variants de transcription de *Pfkfb2*

Ces différentes études indiquent que, miR-182 est un candidat susceptible d'étayer notre seconde hypothèse car non seulement miR-182 interagit avec l'ARN messager de *Pfkfb2* mais aussi miR-182 est abondant dans la rétine (**Figure 71A**). Son expression augmente lors de la différenciation des cellules de la rétine (**Figure 71B**) (Jin et al., 2009; Wu et al., 2019). Il joue un rôle essentiel dans le maintien des segments externes des cônes (Busskamp et al., 2014). Son rôle serait-il de réduire l'expression de la protéine PFKFB2 par les bâtonnets pour ne pas exercer une compétition avec les cônes pour le métabolisme du glucose ? L'action de miR-182 pourrait impliquer que l'ARN messager de *Pfkfb2* soit exprimé par les bâtonnets et les cônes mais que la protéine PFKFB2 ne soit traduit que dans les cônes. Nous avons trouvé *in silico* différentes isoformes des ARN messagers de *Pfkfb2*. Cette étude révèle que *Pfkfb2*, chez la souris, possède 5 variants de l'ARN messager, dont 1 non codant et 4 codant pour des isoformes différentes de la protéine PFKFB2. Nous connaissions les séquences ciblées par miR-182 chez l'homme (He et al., 2018), ainsi que la séquence de fixation de miR-182. Cette séquence est en fait conservée entre plusieurs espèces (**Figure 71C**). Cet élément cible se retrouve uniquement dans le 3' UTR du variant 1 (**Figure 72**). Le variant 3 n'est pas détecté dans la rétine, le variant 4, non codant n'a pas d'importance ici, et le variant 2 et 5 n'ont pas d'éléments ciblés par miR-182 en 3'UTR de leurs messagers. Par conséquent, selon notre modèle, les bâtonnets



Figure 72 : Études *in silico* des différents variant de l'ARN messager de *Pfkfb2*. A. Différence entre la séquence cible humaine et la séquence cible de souris pour miR-182. **B.** Les différents variants de transcription du gène *Pfkfb2*. Le variant 1 possède 2 éléments ciblés par miR-182. Le variant 2 et 5 ne possèdent pas d'élément ciblé par miR-182. Le variant 3 est non détecté et le variant 4 est non codant.

expriment le variant 1 et la traduction de la protéine PFKFB2 est bloquée par miR-182, alors que les cônes expriment l'un des variants, 2 ou 5 du transcrit de *Pfkfb2* et expriment alors la protéine PFKFB2. En analysant les données d'une étude transcriptomique chez la souris *rd10*, un modèle autosomique récessif de RP (Uren et al., 2014), nous avons observé que le variant 1 est le variant majoritaire dans la rétine de la souris sauvage, ce qui supporte notre hypothèse, mais également que le pourcentage de variant 1 diminue chez la souris *rd10*. Par contre, le niveau d'expression du variant 5 est augmenté chez cette souris *rd10*, un modèle hypomorphe de la souris *rd1* (**Figure 73**). Nous avons vérifié que les différents variants protéiques possèdent toutes un domaine phosphatase C-terminal fonctionnel pour nous assurer que les protéines codées par ces deux ARN messagers variants sont bien des enzymes bifonctionnelles. La séquence du domaine phosphatase des deux isoformes (v1, et v5) est identique (**Figure 74**). Néanmoins, l'isoforme v5 possède une extension en C-terminale. Le domaine phosphatase est donc fonctionnel pour les deux variants.

13.2 Etude expérimentale de l'expression des différents variants de transcription de *Pfkfb2*

Pour valider expérimentalement cette hypothèse de travail, nous avons tout d'abord dessiné des amorces spécifiques pour chaque variant de transcription et recherché leur présence dans la rétine par RT-PCR (**Table 4**). Dans la rétine de souris sauvage, nous détectons deux variants de transcription du gène *Pfkfb2* ; le variant v1 qui possède un élément ciblé par miR-182 et le variant v5 qui ne possède cet élément (**Figure 75**). Ces résultats s'accordent avec notre modèle dans lequel les bâtonnets expriment le variant 1 et la traduction de la protéine PFKFB2 est bloquée par miR-182, alors que les cônes expriment le variant 5 du transcrit de *Pfkfb2* et expriment donc la protéine PFKFB2. Pour confirmer ceci, nous avons étudié par RT-PCR quantitative la cinétique d'expression, des variants 1 et 5 chez la souris *rd1* au cours de la dégénérescence des bâtonnets (**Figure 76A**). Nous avons calibré les données avec le profil d'expression de gènes exprimés spécifiquement par les bâtonnets ou par les cônes (**Figure 76B**). Ces résultats montrent que la cinétique d'expression de *Pfkfb2*^{v1} est similaire à celle du gène de la rhodopsine, c'est-à-dire qu'à partir de 11 jours postnatal nous observons une chute de l'expression du gène de *Rho* et du variant *Pfkfb2*^{v1}, ce qui correspond à la perte des bâtonnets. En revanche, bien que l'expression de *Rho* soit quasi nulle à 21 jours postnatal, l'expression de *Pfkfb2*^{v1}, bien qu'elle ait chuté considérablement, se maintient à un niveau qui correspond

certainement à l'expression de ce gène dans les cellules ganglionnaires (**Figure 76C** et **69B**).
L'expression du variant 5 de transcription de *Pfkfb2* baisse entre 11 et 15 jours postnatal dans

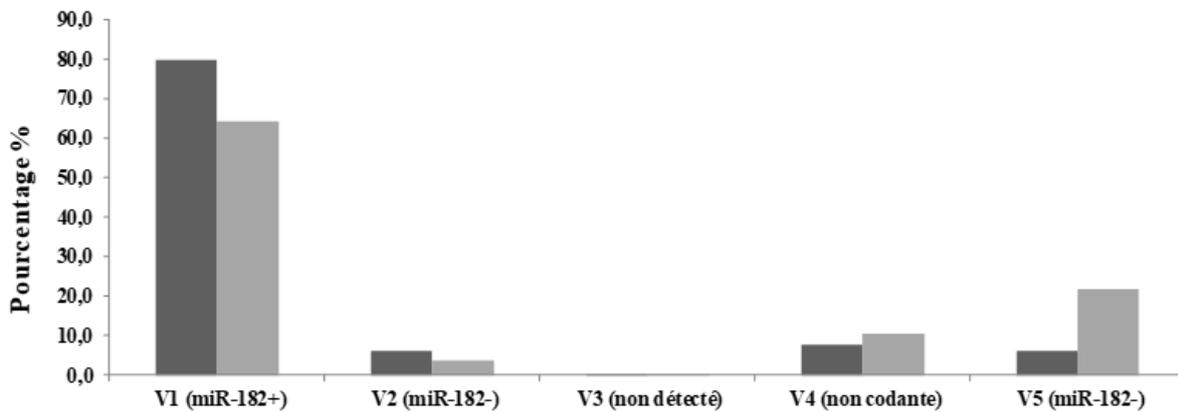


Figure 73 : Etudes *in silico* du pourcentage des différents variant de l'ARN messager de *Pfkfb2* dans la rétine.

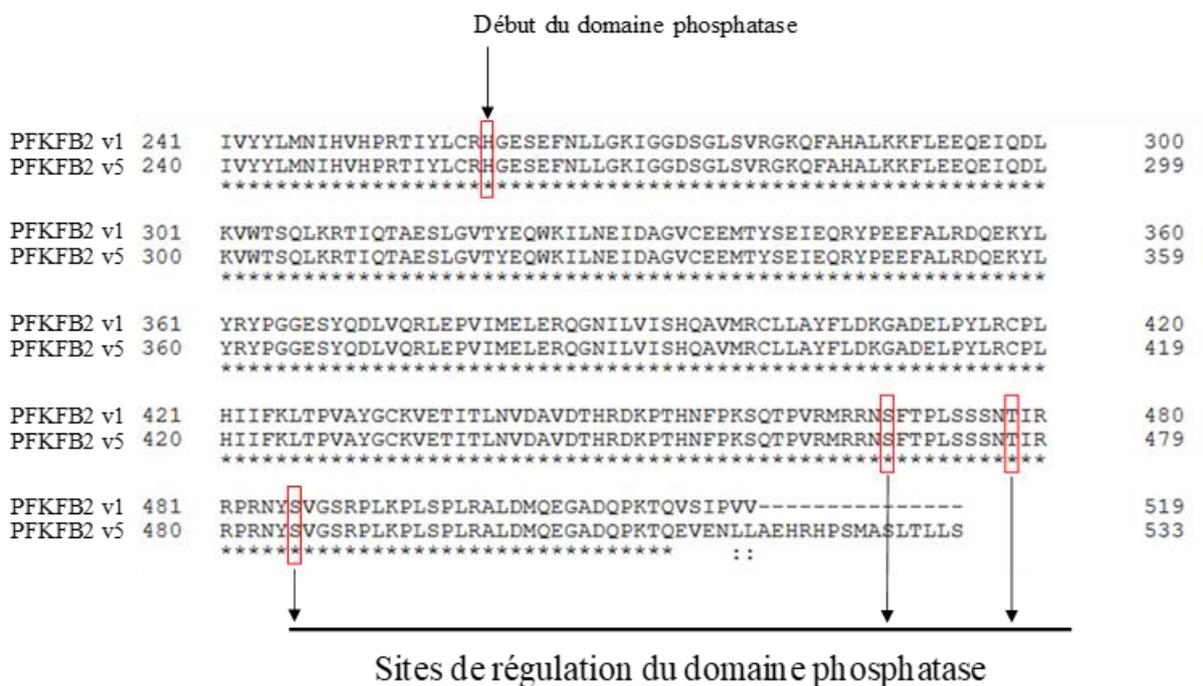


Figure 74 : Etudes *in silico* du domaine phosphatase de la protéine PFKFB2 issue des différents variant transcription de *Pfkfb2* chez la souris. Les séquences protéiques sont identiques jusqu'à l'acide aminé 513. PFKFB2 v1 se termine à l'acide aminé 519. PFKFB2 v5 se termine en position 533. Les 2 isoformes protéiques ont les mêmes sites de régulation du domaine phosphatase.

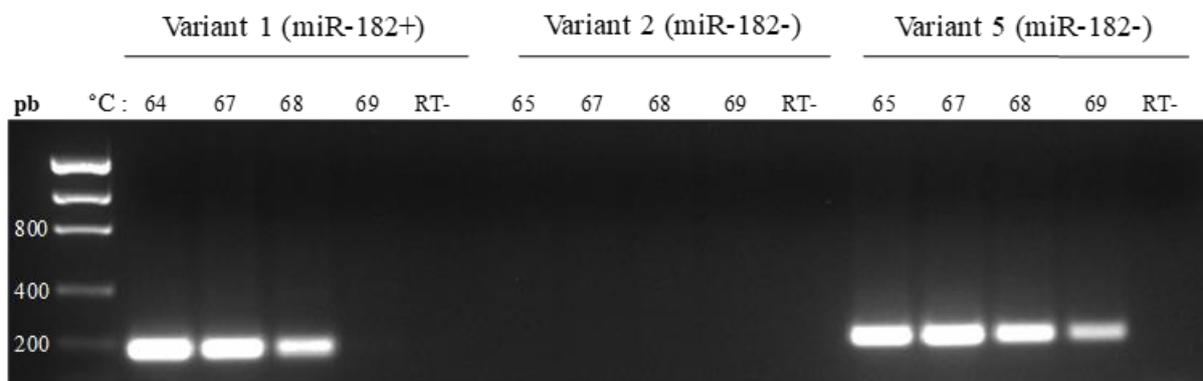


Figure 75 : Etudes des différents variants transcription de *Pfkfb2* dans la rétine par RT-PCR. Les variants de transcription v1 (miR-182+) et v5 (miR-182-) sont détectés dans la rétine de souris sauvage. RT-: témoin négatif de rétrotranscription à 67°C, pb : paire de bases.

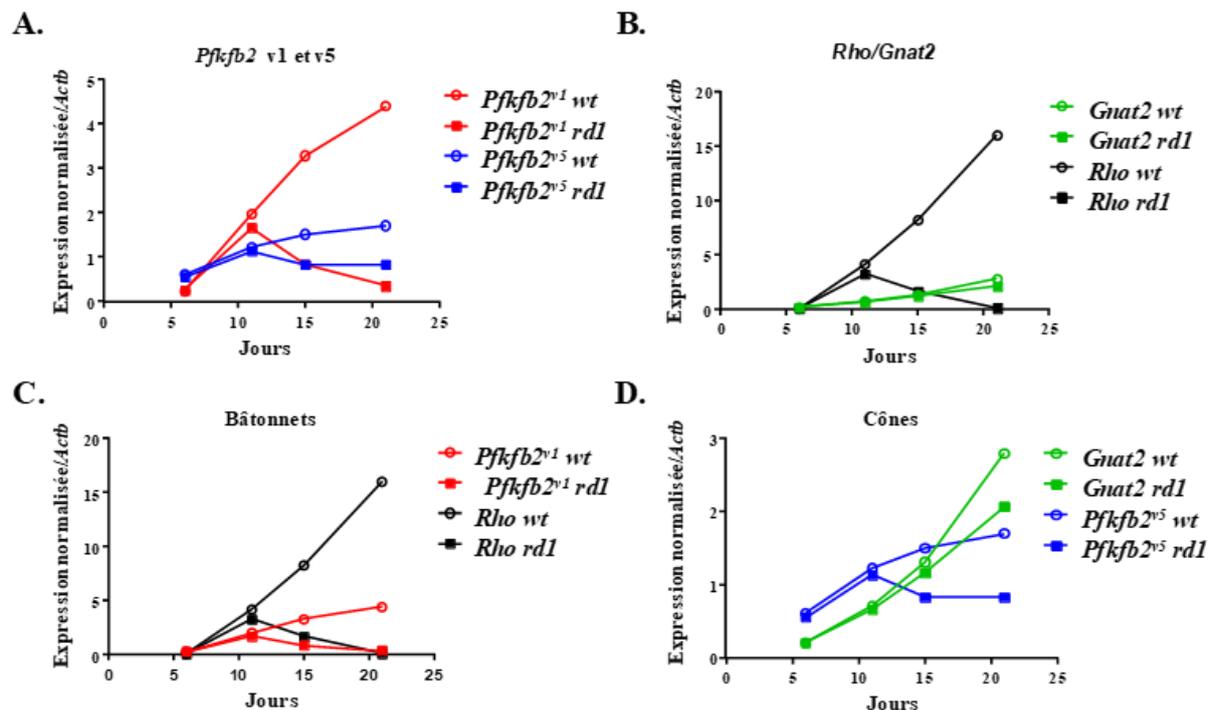


Figure 76 : Etudes cinétique des différents variants de transcription de *Pfkfb2* dans la rétine de souris *rd1* au cours de la dégénérescence des bâtonnets. A. Cinétique d'expression des gènes *Rho* et *Gnat2* dans la rétine de souris *rd1*. **B.** Cinétique d'expression des variants de transcription de *Pfkfb2* v1 et v5 dans la rétine de souris *rd1*. **C.** Cinétique d'expression des gènes avec un profil d'expression *Rod-like*, *Rho* et *Pfkfb2*^{v1} dans la rétine de souris *rd1*. **D.** Cinétique d'expression des gènes avec un profil d'expression *Cone-like*, *Gnat2* et *Pfkfb2*^{v5} dans la rétine de souris *rd1*.

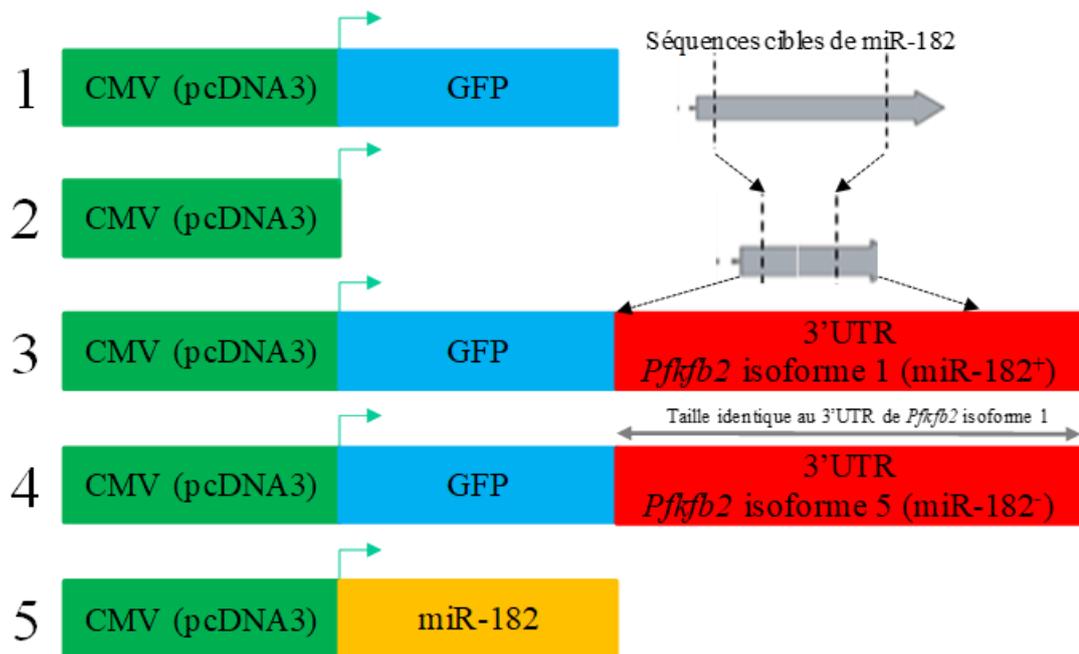
la rétine de la souris *rd1*, alors qu'il augmente chez la souris sauvage, et se stabilise durant la dégénérescence des bâtonnets (**Figure 76D**). Les deux souris analysées sont de fond génétique identique (C3H) et la différence observée ne peut provenir que de la dégénérescence des bâtonnets (Reichman et al., 2010). Le variant 5 ne partage pas le profil d'expression que *Rho*, mais son expression semble être dépendante de la survie des bâtonnets. Ces résultats apportent un argument décisif en support à notre modèle.

Afin de démontrer expérimentalement les données *in silico* sur la présence ou pas des séquences ciblées par miR-182 dans le 3'UTR des deux isoformes des transcrits de *Pfkfb2* v1 et v5, nous allons utiliser un miR-182-sensor (Bellon et al., 2017) pour tester *in vitro* l'expression d'une protéine GFP dans des constructions possédant les parties 3'UTR des variants 1 et 5 des messagers de *Pfkfb2* (**Figure 77A**). Par transfection transitoire dans des cellules COS1, nous allons co-exprimer les différentes constructions et mesurer par *western blotting* l'expression de la GFP. Nous envisageons que le *sensor* miR-182, bloquera l'expression de la GFP qui est sous le contrôle de la partie 3'UTR du variant v1 de *Pfkfb2* qui contient un site de fixation du miR-182 et qu'au contraire le *sensor* ne sera pas capable de bloquer l'expression de la GFP qui est sous le contrôle du 3'UTR du variant v5 de *Pfkfb2* qui ne possède pas le site de fixation du miR-182 (**Figure 77B**). Ces différents plasmides sont en cours de construction et nous obtiendrons nos résultats dans un futur proche.

14. Etudes des PFKFB2 issus des différents variants de transcription de *Pfkfb2* dans la rétine

Ces deux variants de transcription sont traduits en deux protéines différentes avec un poids moléculaire légèrement différent puisque PFKFB2 issu du variant 1 a un poids moléculaire égal à 59,83 kilodalton (kDa) et PFKFB2 issu du variant 5 a un poids moléculaire de 61,56 kDa. Ces deux protéines ont un poids trop proche pour être différenciées par les méthodes traditionnelles d'étude de protéines comme le *western blotting* (**Figure 61A**). En revanche, ces deux protéines ont un point isoélectrique (pI) différents. Le pI est le pH pour lequel la charge électrique nette de la protéine est nulle et sa migration est donc stoppée lors de l'étape d'isofocalisation dans les analyses électrophorétiques à deux dimension. Il est ainsi possible de différencier deux protéines avec des poids moléculaires proches, si leurs points isoélectriques sont différents. PFKFB2^{v1} a un pI de 8,22 et PFKFB2^{v5} de 7,91 (**Figure 78A**). Nous avons donc entrepris une étude par électrophorèse en deux dimensions (2D). Dans un

A.



B.

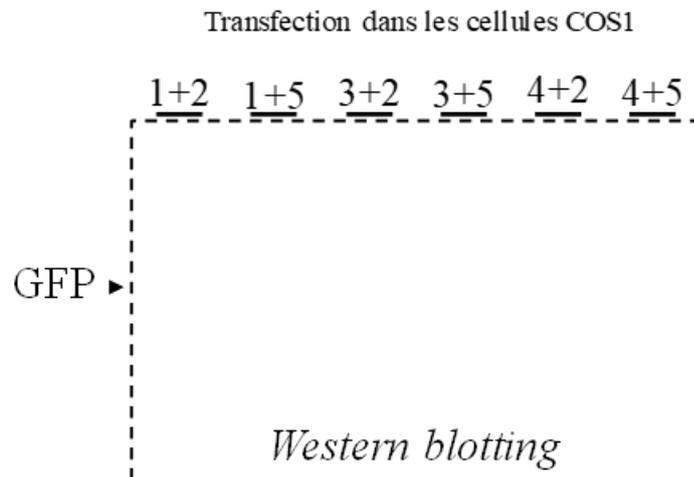


Figure 77 : Etude pour la mise en évidence des séquences cible de miR-182 dans les séquences 3'UTR des variants v1 et v5 de *Pfkfb2*. A. Différentes constructions de plasmides pcDNA3 pour la mise en évidence des séquences 3'UTR régulatrices des variants *Pfkfb2*^{v1} et *Pfkfb2*^{v5}. B. Les différents plasmides seront transfectés dans des cellules COS-1 et l'expression de la GFP sera mise en évidence par *western blotting*.

premier, temps les protéines issues d'un lysat protéique sont séparées selon leur point isoélectrique (isofocalisation), puis dans un deuxième temps ces protéines sont séparées selon leur poids moléculaire ; leur migration dans un gel en présence de laurylsulfate de sodium plus connu comme le *sodium dodecyl sulfate* (SDS). Afin de visualiser les protéines PFKFB2, un *western blotting* a été réalisé à la suite de l'électrophorèse 2D avec l'anticorps PFKFB2 d'Assaybiotech (**Table 3**) qui révèle une bande majoritaire en *western blotting* à 58 kDa (**Figure 63**). Selon notre modèle, nous devrions visualiser uniquement protéine PFKFB2^{v5} des photorécepteurs et éventuellement PFKFB2^{v1} des couches internes de rétine. D'un extrait protéique de la rétine nous devrions être capable de distinguer par *western blotting* 2D, 2 spots de pIs distincts, mais avec des migrations identiques en seconde dimension. Dans le premier test effectué sans traitement préalable des extraits, nous observons 7 spots entre 50 et 75 kDa, qui correspondent à PFKFB2 avec des pIs différents (**Figure 78B**) Les pI des modifications post-traductionnelles de PFKFB2 chez la souris (UniProtKB - P70265) sont disponibles⁴. Cinq des spots ont un pI qui se situe entre 6,0-7,0. Trois de ces spots majoritaires ont des pIs respectifs de 6,59, 6,79 et 7,04. Deux spots ont un point isoélectrique très acide (4,5– 4,6). Comme le pI de PFKFB2^{v5} est plus acide que celui PFKFB2^{v1} (**Figure 78A**), il est concevable que les isoformes avec des pIs acides, représentent les formes hyperphosphorylées de PFKFB2^{v5}, et ainsi que par le même raisonnement toutes les autres formes aux pIs plus basiques. Cette interprétation ne prend pas en compte les autres modifications post-traductionnelles qui pourraient modifier le pI, sans modifier la migration de la deuxième dimension⁵. Néanmoins, le décalage du pI par acétylation est généralement faible (< 0,2 pH) (Zhu et al., 2005) et l'ubiquitination apporte une masse additionnelle de 8 kDa. Notre présente interprétation est que ces nombreux spots sont des formes de PFKFB2 différenciellement phosphorylées, ceci car nous n'avons pas traité les extraits afin de déphosphoryler PFKFB2 avant l'analyse. Afin de surmonter cette difficulté, nous allons traiter les extraits avec la phosphatase λ (Biolab New England P0753S) (Mayer et al., 2015) afin d'effacer les phosphorylation qui peuvent modifier le pI de PFKFB2 et interférer avec l'analyse (Halligan, 2009). Pour distinguer l'isoforme PFKFB2^{v5} de l'isoforme PFKFB2^{v1} par leur pI dans les gels 2D, nous allons aussi inclure une analyse du cœur, qui est la référence (Heine-Suner et al., 1998). Puisque l'expression de miR-182 dans le cœur est bien moins élevée que dans la rétine (**Figure. 71A**) et que la protéine dans

⁴ [Isoelectric Point Calculator \(phosphosite.org\)](http://phosphosite.org)

⁵ [PFKFB2 \(mouse\) \(phosphosite.org\)](http://phosphosite.org)

A.

Variant	Point isoélectrique	Poids moléculaire (kDa)	UniProt
1	8,22	59,83	P70265_MOUSE
5	7,91	61,56	A0A087WRG0_MOUSE

B.

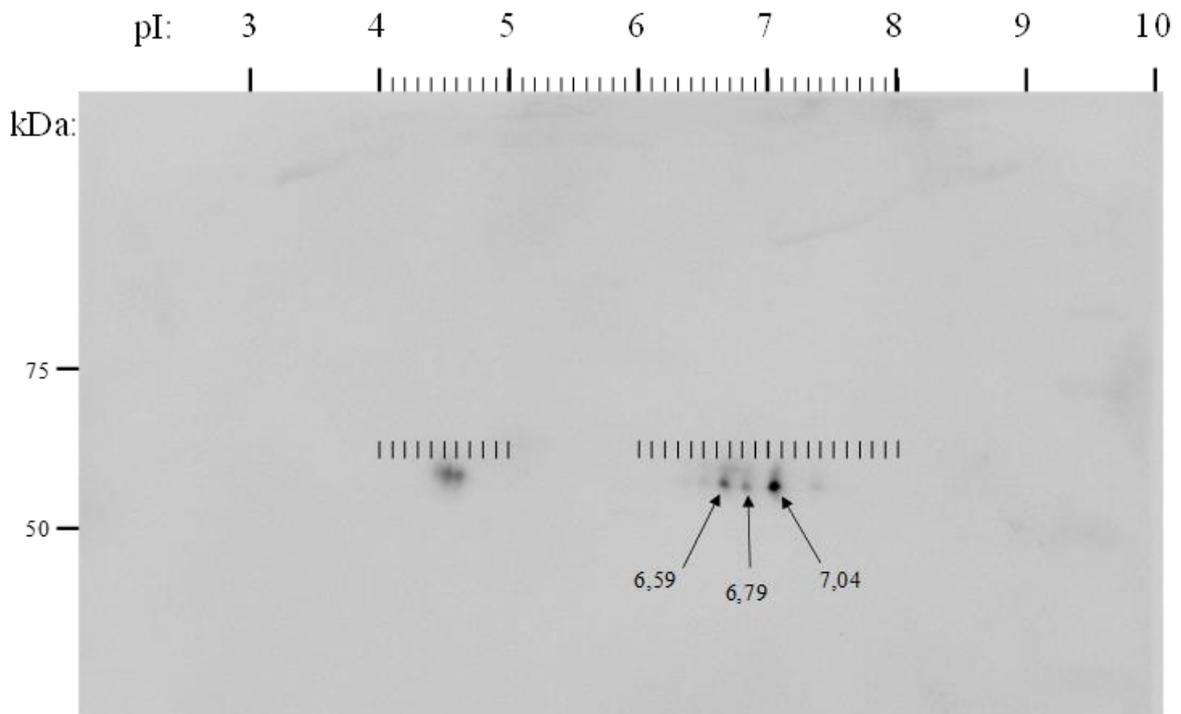


Figure 78 : Etudes par *western blotting* 2 dimensions des PFKFB2 issus des différents variants de transcription de *Pfkfb2* dans la rétine. A. Tableau représentant les points isoélectriques ainsi que le poids moléculaire de chaque isoforme protéique de PFKFB2. **B.** Gel 2 dimensions fait à partir d'un extrait de rétine de souris afin d'étudier les différentes isoformes de PFKFB2. Les points isoélectriques sont calculés à l'aide de l'algorithme du programme Compute pI/Mw d'ExPASy. kDa : kilodalton, pI : point isoélectrique.

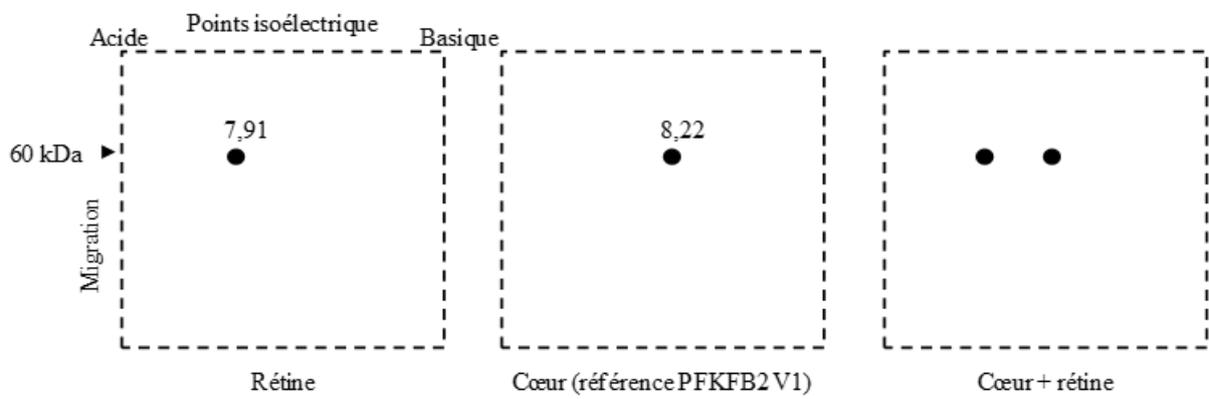


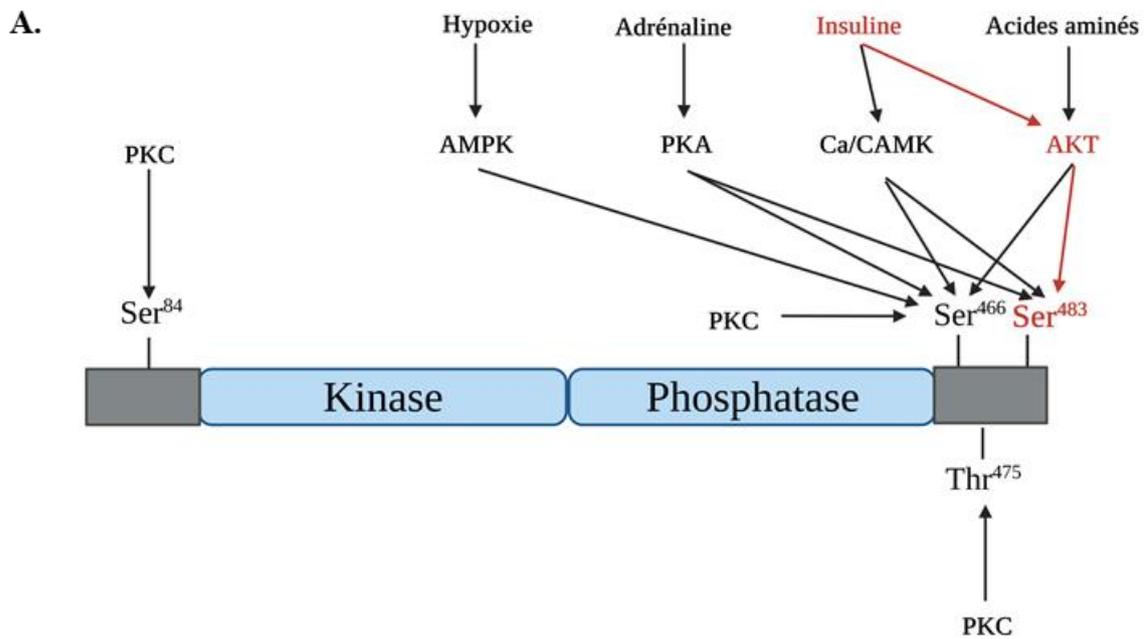
Figure 79 : Résultats attendus en *western blotting* 2 dimensions dans un mélange de cœur et de rétine.

le cœur qui est la référence dans UniProt (P70265), la protéine exprimée dans le cœur est donc très certainement celle codée par le mRNA *Pfkfb2*^{v1}, PFKFB2^{v1}. Nous proposons donc d'étalonner les deux isoformes en mélangeant les extraits de rétine et de cœur (**Figure 79**). Dans un deuxième temps, pour distinguer l'expression de PFKFB2 par les cônes et les cellules ganglionnaires (**Figure 69**), nous séparerons la couche des photorécepteurs de la rétine interne par une technique de coupe au vibratome (Clerin et al., 2014), et nous testerons en *western blotting* 2D les deux couches séparément, puisque l'isoforme v5 devrait être présente majoritairement dans la couche des photorécepteurs qui comprend les cônes.

15. Etude de la phosphorylation de PFKFB2 dans la rétine de souris

Nous avons précédemment démontré que l'action de RdCVF, et donc par conséquent l'augmentation de l'entrée du glucose dans les cônes (Ait-Ali et al., 2015) provoque l'augmentation de l'expression de *Pfkfb2* dans la rétine (**Figure 49**). Ceci explique que l'expression du transcrite *Pfkfb2*^{v5} est dépendante de la présence des bâtonnets (**Figure 70A**). En effet, comme RdCVF est sécrété par les bâtonnets et qu'il augmente l'expression du messenger de *Pfkfb2*, il est donc attendu que lorsque les bâtonnets dégènèrent, suite à quoi RdCVF n'est plus exprimé (Mei et al., 2016), nous observons une baisse de l'expression de *mPfkfb2*^{v5}. C'est par l'augmentation du transport du glucose dans les cônes via GLUT1 qu'augmenterait l'expression du messenger de l'isoforme v5 de *Pfkfb2* (**Figure 53**).

Nous avons étudié le mécanisme d'action de PFKFB2 dans les cônes. PFKFB2 est une enzyme bifonctionnelle comprenant en N-terminal un domaine kinase qui métabolise le fructose-6-phosphate (F6P) en fructose-2,6-biphosphate (F26BP) et en C-terminal un phosphatase qui déphosphoryle le F26BP en F6P (Okar et al., 2001) (**Figure 50A**). Le F26BP est le plus puissant modulateur allostérique de la phosphofructokinase (PFK), l'enzyme glycolytique qui catalyse la réaction de la réaction $F6P \rightarrow$ fructose-1,6-biphosphate (F16BP), l'étape de limitante de la glycolyse (**Figure 50B**). Le F26BP a une double fonction, il augmente l'affinité de PFK pour le fructose-6-phosphate (F6P) et libère l'enzyme de l'inhibition médiée par l'ATP (**Figure 19**). Il augmente également de manière synergique l'affinité de PFK pour l'AMP, un effecteur allostérique positif de l'enzyme. De plus, F26BP stabilise PFK et favorise son association en tétramères et oligomères d'ordres supérieurs qui possèdent une activité enzymatique accrue (Sola-Penna et al., 2010). Par des mécanismes, les changements de



B.

```

SP|060825|F262_HUMAN ---MSGASSSEQNNSYETKTPNLRMSEKKCSWASYMTNSPTLIVMIGLPARGKTYVSKK 57
SP|P70265|F262_MOUSE MSENSTFSTEDSCNSSYKPHASNLRAGKTCWASYMTNSPTLIVMIGLPARGKTYVSKK 60

SP|060825|F262_HUMAN LTRYLNWIGVPTKVFNLGVYRREAVKSYKSYDFFRHDNEEAMKIRKQCALVALEDVKAYL 117
SP|P70265|F262_MOUSE LTRYLNWIGVPTKVFNLGVYRREAVKSYQSYDFFRHDNEEAMKIRKQCALVALEDVKAYF 120

SP|060825|F262_HUMAN TEENGQIAVFDAINTTTRRRDMILNFAEQNSFKVFFVESVCDPVDVIAANILEVKVSSPD 177
SP|P70265|F262_MOUSE TEESGQIAVFDAINTTTRRRDMILNFAKQNAFKVFFVESVCDPVDVIAANILEVKVSSPD 180

SP|060825|F262_HUMAN YPERNRENVMEFLKRIECYKVTYRPLDPDNYDKDLSFIKVINVGQRFLVNRVQDYIQSK 237
SP|P70265|F262_MOUSE YPERNRENVMEFLKRIECYKVTYQPLDPDNYDKDLSFIKVMNVGQRFLVNRVQDYIQSK 240

SP|060825|F262_HUMAN IVYYLMNIHVQPRTIYLCRHGESEFNLLGKIGGDSGLSVRGKQFAHALKFKFLEEQEITDL 297
SP|P70265|F262_MOUSE IVYYLMNIHVHPRTIYLCRHGESEFNLLGKIGGDSGLSVRGKQFAHALKFKFLEEQEIQDL 300

SP|060825|F262_HUMAN KVWTSQLKRTIQTAESLGVPEQWKILNEIDAGVCEEMTYAEIEKRYPEEFALRDQEKYL 357
SP|P70265|F262_MOUSE KVWTSQLKRTIQTAESLGVTYEQWKILNEIDAGVCEEMTYSEIEQRYPEEFALRDQEKYL 360

SP|060825|F262_HUMAN YRYPGGESYQDLVQRLEPVIMELERQGNVLVISHQAVMRCLLAYFLDKGADLPYLRCPL 417
SP|P70265|F262_MOUSE YRYPGGESYQDLVQRLEPVIMELERQGNILVISHQAVMRCLLAYFLDKGADLPYLRCPL 420

SP|060825|F262_HUMAN HTIFKLTIPVAYGCKVETIKLNVEAVNTHRDKPTNFPKNQTPVRRRNSFTPLSSSNTIR 477
SP|P70265|F262_MOUSE HIIFKLTIPVAYGCKVETITLNVDAVDTHRDKPTHNFPKSTPVRMRNSFTPLSSSNTIR 480

SP|060825|F262_HUMAN RPRNYSVGSRPLKPLSPLRAQDMQEGAD----- 505
SP|P70265|F262_MOUSE RPRNYSVGSRPLKPLSPLRALDMQEGADQPKTQVSIPIV 519

```

Figure 80 : Organisations des domaines protéiques et des sites de phosphorylation de PFKFB2. **A.** Les domaines protéiques et des sites de phosphorylation de PFKFB2 chez l'homme. Les domaines régulateurs sont représentés en gris. Sites de phosphorylation et kinases afférentes sont indiquées. AMPK : *Activated-mitogen protein kinase-activated protein kinase-1*. PKA : *protein kinase A*, PKC : *protein kinase C*, Ca/CAMK : *calcium/calmodulin-dependent protein kinase*. Les coordonnées indiquées ici sont celles de PFKFB2 chez l'homme (Ros and Schulze, 2013). **B.** Alignement de la séquence protéique de PFKFB2 chez l'homme et chez la souris. Les résidus sérines phosphorylables ne se situent pas aux mêmes positionnements : Ser⁴⁶⁶ chez l'homme se situe en position 469 chez la souris et Ser⁴⁸³ se situe en position 486.

concentration de ce métabolite régulent les activités de PFK, conférant ainsi un rôle clé au F26BP ainsi qu'à PFKFB2 dans la régulation la réaction $F6P \rightarrow F16BP$ et par extension du flux de la glycolyse (Bartrons et al., 2018). Il existe des modifications post-traductionnelles dans les séquences régulatrices en C-terminal et N-terminal d'acides aminés impliqués dans la régulation des activités enzymatiques de PFKFB2. Chez l'homme, l'adrénaline favorise la phosphorylation de Ser⁴⁶⁶ et Ser⁴⁸³, du domaine régulateur C-terminal, par la protéine kinase A (PKA) et stimule la glycolyse (Rider et al., 1992) (**Figure 80A**). L'implication physiologique de la phosphorylation de Ser⁸⁴, Ser⁴⁶⁶ et Thr⁴⁷⁵ de PFKFB2 par la protéine kinase C (PKC) n'est pas totalement élucidée. Il semble que la phosphorylation de Ser⁴⁶⁶ ou de Thr⁴⁷⁵ ne modifie pas l'activité enzymatique de PFKFB2. Cela pourrait être dû au fait que la phosphorylation au niveau de Ser⁸⁴ contrecarre les effets de la phosphorylation au niveau des sites C-terminaux d'activation (Kitamura et al., 1988). L'activation de l'*AMP-activated protein kinase* (AMPK), lorsque la phosphorylation oxydative est bloquée *in vitro*, conduit à la phosphorylation de Ser⁴⁶⁶ (Marsin et al., 2000), ce qui augmente les niveaux de F26BP et le flux glycolytique. Les acides aminés stimulent la synthèse de F26BP par phosphorylation de PFKFB2 via la voie de signalisation AKT, ce qui montre comment la signalisation des kinases intracellulaires et le métabolisme sont inextricablement liés (Novellademunt et al., 2013). L'insuline stimule la glycolyse dans le cœur en augmentant le transport du glucose (**Figure 36**) et en activant le PFKFB2 (Ros and Schulze, 2013). Les résidus Ser⁴⁶⁶ et Ser⁴⁸³ sont phosphorylés par la protéine AKT en réponse à l'insuline (Deprez et al., 1997; Rider and Hue, 1984). La phosphorylation de PFKFB2 aux serines 466 et 483 provoque une augmentation de l'activité kinase de l'enzyme en inhibant le domaine phosphatase en C-terminal (**Figure 80A**). De plus, la phosphorylation de PFKF2 aux résidus S⁴⁶⁶ et S⁴⁸³ entraîne conjointement avec HK2, la synthèse des lipides (Moon et al., 2011). Il est important de relever que chez la souris, les sites de phosphorylation des sérines dans le domaine régulateur de la phosphatase sont positionnés légèrement différemment ; Ser⁴⁶⁹ (Ser⁴⁶⁶ chez l'homme) et Ser⁴⁸⁶ (Ser⁴⁸³ chez l'homme) (Lee et al., 2020) (**Figure 80B**). Le citrate issu de la phosphorylation oxydative (**Figure 27**) est inhibiteur du domaine kinase de PFKFB2. Ce mécanisme est une façon possible pour la cellule d'épargner le glucose. Ainsi, l'expression de PFKFB2 dans le cœur (**Figure 61**) est contournée, grâce à l'inhibition de l'activité du domaine kinase de PFKFB2 par le citrate, produit par la mitochondrie (Crochet et al., 2017).

Nous avons voulu vérifier si PFKFB2 était phosphorylé à la sérine 486 dans la rétine de la souris. Pour cela, nous avons analysé l'expression des PFKFB2 ainsi que sa phosphorylation,

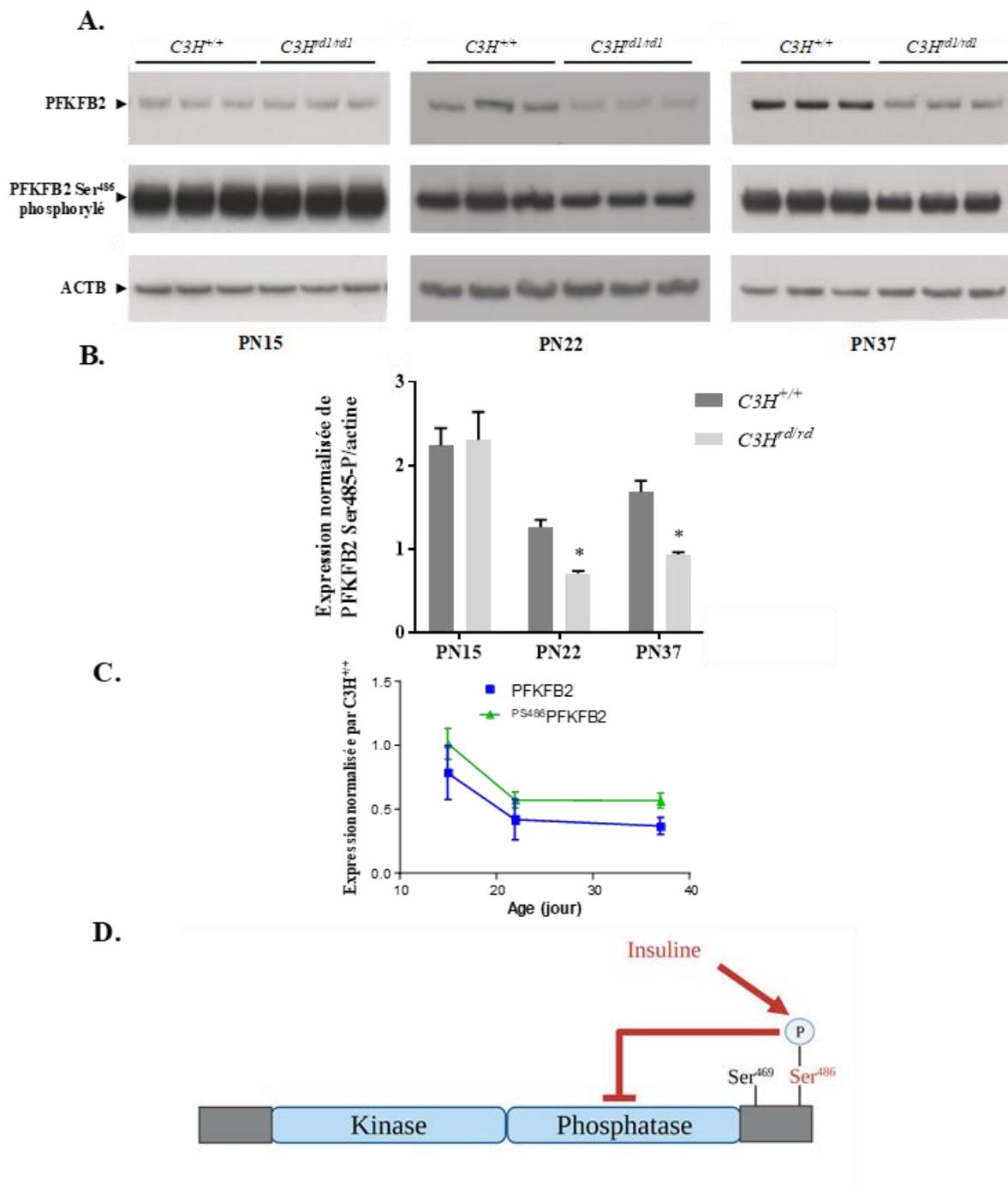


Figure 81 : Phosphorylation de Ser⁴⁸⁶ de PFKFB2 dans la rétine de souris *rd1*. **A.** Mise en évidence de la phosphorylation de PFKFB2 par *western blotting* sur des rétines de souris *rd1* à différents âges, révélé avec un anticorps spécifique contre Ser⁴⁸⁶ phosphorylée de PFKFB2 : D4R1W de chez Cell signaling ref 13064. **B.** Quantification de l'expression de PFKFB2 phosphorylé à la sérine 486 dans la rétine par rapport à l'expression de l'actine. Analyse statistique fait avec un test de Student, ** $p = 0,0037$ (SEM), * $p = 0,0387$ (SEM). **C.** Cinétique d'expression de PFKFB2 et PFKFB2 phosphorylé chez la souris *rd1* au cours du temps (SEM). **D.** Modèle d'action de l'insuline sur l'activation du domaine kinase de PFKFB2 par la phosphorylation de Ser⁴⁸⁶ chez la souris.

par *western blotting* avec un anticorps spécifique (**Table 3**), chez des souris sauvages et la souris *rd1* à trois âges critiques de la dégénérescence des bâtonnets de la souris *rd1*. Nous observons qu'à PN15, au stade où les bâtonnets ont commencé à dégénérer chez la souris *rd1*, l'expression de PFKFB2 phosphorylé n'est pas différente que celle de la souris contrôle. Les deux sont sur le même fond génétique, ce qui exclut que l'analyse soit perturbée par d'autres gènes que la mutation du gène *Pde6b* (l'allèle *rd1*) (**Figure 81A**). A PN22, les bâtonnets ont complètement disparu et les cônes commencent à dégénérer. Nous observons donc une diminution de PFKFB2 phosphorylé de 43% dans la rétine *rd1* avec un anticorps anti-PFKFB2^{PS486} (**Table 3**). A PN22, nous observons chez la souris *rd1* une diminution de 42% de PFKFB2 phosphorylé à la sérine 486 par rapport à la souris sauvage, et 42% à PN37 (**Figure 81B**). La perte de signal pour PFKFB2^{S486} au cours de la dégénérescence des bâtonnets et des cônes a un profil similaire à la perte de signal avec l'anticorps anti-PFKFB2 (**Figure 81C**). Ceci démontre que PFKFB2 est phosphorylé à la sérine 486 dans les cônes. Par conséquent, PFKFB2 agit comme une kinase dans les cônes et non comme une phosphatase. (**Figure 81D**). Ceci indique qu'*in vivo* PFKFB2 est sous contrôle de l'insuline qui est apporté par la circulation sanguine, via la choroïde (**Figure 50**).

16. Etude de l'implication de l'insuline dans la phosphorylation de PFKFB2

16.1. Etude de l'effet de l'insuline et du domaine kinase de PFKFB2 sur la survie des photorécepteurs à cônes

La littérature nous indique que l'insuline active le domaine kinase de PFKFB2 par voie de signalisation AKT (Deprez et al., 1997). Pour plusieurs modèles murins de RP, l'insuline agit via la voie de signalisation *mammalian target of rapamycin* (mTOR) (Magaway et al., 2019) (**Figure 82**) et retarde la dégénérescence secondaire des cônes (Corrochano et al., 2008; Punzo et al., 2009). Nous avons par ailleurs démontré que la mort des cônes est due à la perte du facteur trophique RdCVF sécrété par les bâtonnets (Ait-Ali et al., 2015). Ces recherches convergent vers un même point : le métabolisme du glucose par les cônes (Wong and Kwok, 2016). Nous avons donc étudié l'action de l'insuline sur la survie des photorécepteurs à cônes *in vitro*. Nous observons une diminution significative du nombre de cônes vivants en l'absence d'insuline (**Figure 83**), l'insuline a un effet positif sur la survie des cônes, *in vitro*. Dans un

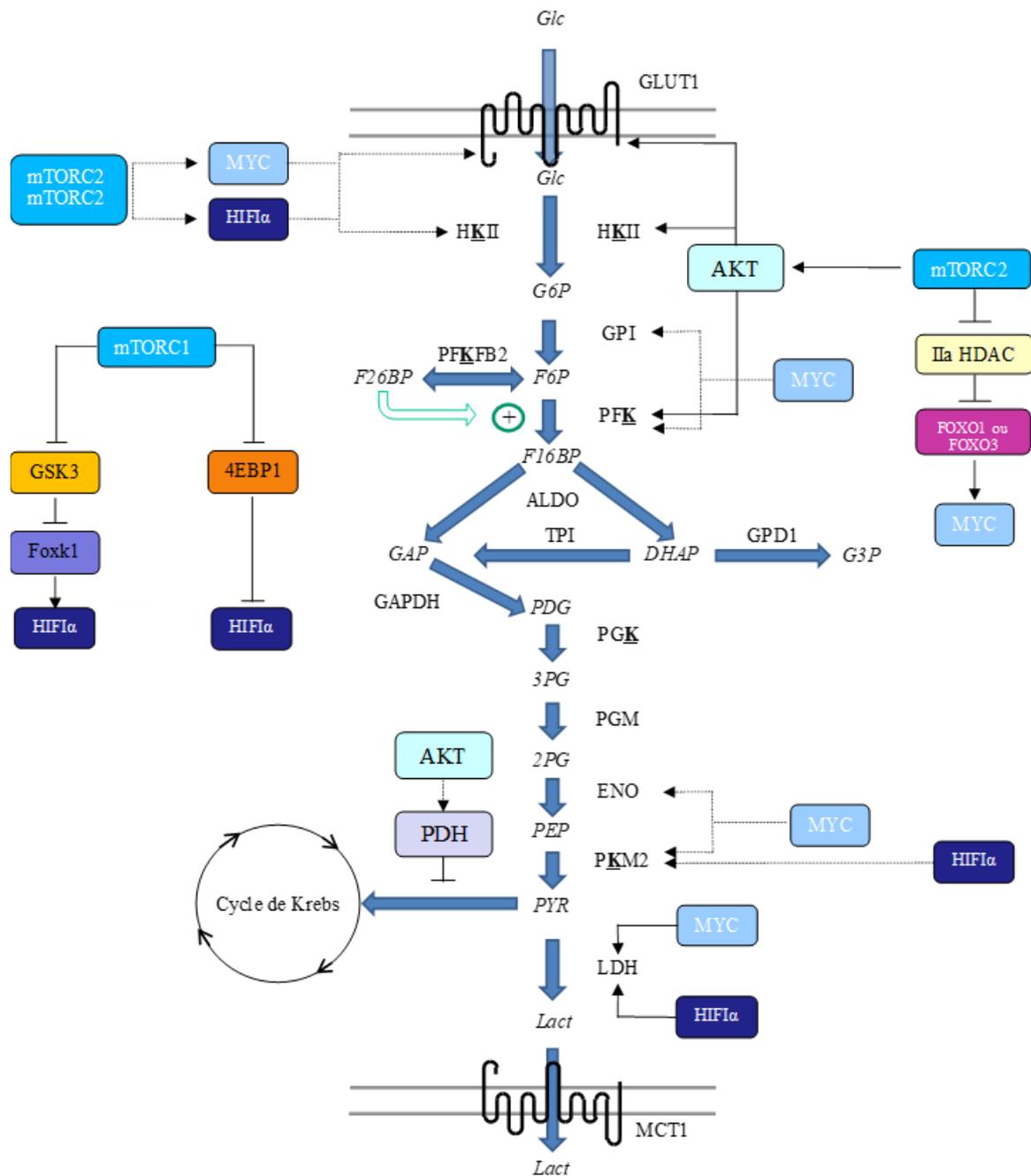


Figure 82 : Rôle de mTOR dans le métabolisme du glucose. mTORC1 contrôle la glycolyse via HIF1 α et MYC. Grâce à ces derniers facteurs de transcription, mTORC1 stimule l'expression de gènes dont les produits sont impliqués dans le métabolisme du glucose, notamment les transporteurs de glucose et les enzymes glycolytiques. mTORC2 a également un rôle positif dans la régulation du métabolisme du glucose. La cible mTORC2, AKT, module le transport du glucose et phosphoryle les enzymes glycolytiques. HK2 : hexokinase 2, PGI : glucose-6-phosphate isomérase, ENO : énoïase, PKM2 : pyruvate kinase isoforme M2, LDH : lactate déshydrogénase, HIF1 : *hypoxia inducible factor 1*, MYC : oncoprotéine MYC, IIA HDAC : class IIA histone déacétylase, FOXO : *forkhead box* : GSK3 : glycogène synthase kinase 3, Foxk1 : *Forkhead Box K1*, 4EBP1 : *eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1*, PDH : pyruvate déshydrogénase, TCA : *tricarboxylic acid*. Illustration tirée de (Magaway et al., 2019).

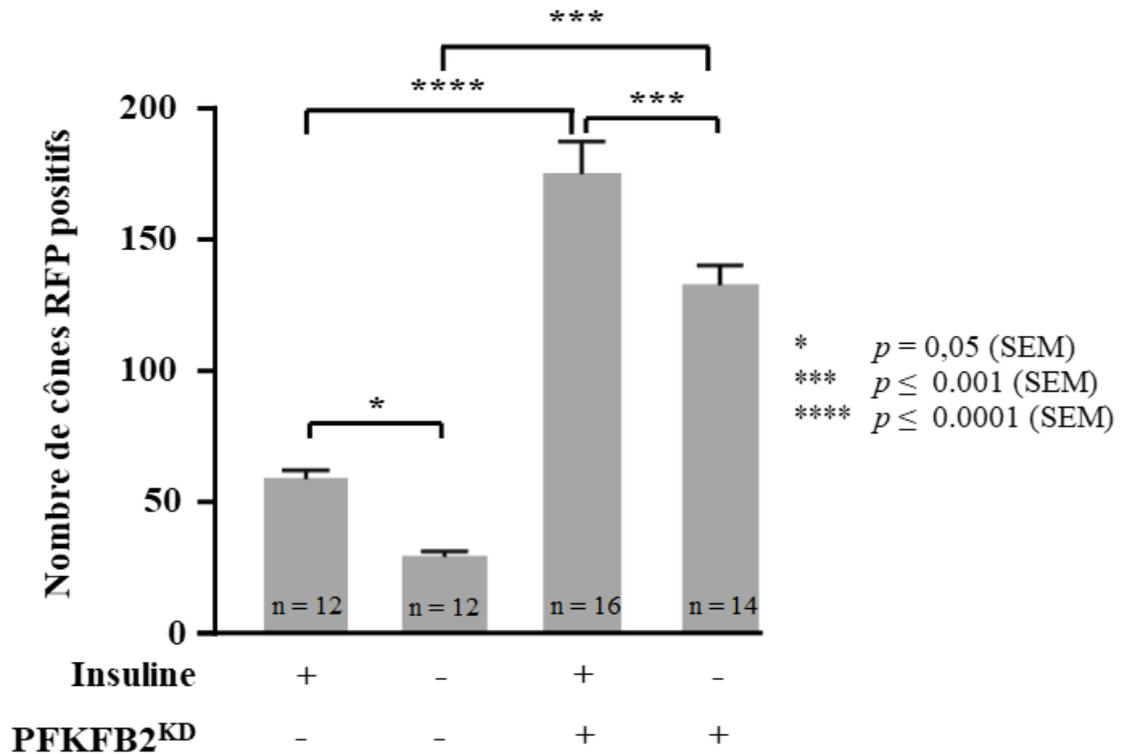


Figure 83 : Etude de l'effet de l'insuline et du domaine kinase de PFKFB2 sur la survie des photorécepteurs à cônes. Un plasmide contrôle codant pour la RFP a été co-électroporé dans les cônes d'embryons de poulet in vitro avec le plasmide PFKFB2^{KD} afin de normaliser le comptage. Etude statistique faite avec un one-way ANalysis Of VAriance (ANOVA), Test de Tukey

deuxième temps, pour appréhender le lien entre l'insuline et PFKFB2, nous avons testé l'effet de la surexpression du domaine kinase de PFKFB2 (PFKFB2^{KD}) par électroporation d'un plasmide exprimant le domaine kinase sous contrôle du promoteur du cytomégalo virus (CMV). Nous avons co-électroporé dans les cônes d'embryons de poulet *in vitro* ce plasmide avec un plasmide contrôle codant pour la RFP afin de visualiser les cellules transduites. Nous avons ensuite normalisé nos résultats par le nombre de cellules RFP positives. Nous observons une augmentation significative du nombre de cônes vivants, signifiant que le domaine kinase PFKFB2^{KD} protège les cônes. L'augmentation de la survie des cônes via PFKFB2^{KD} est indépendante de l'insuline car S⁴⁸⁶ est exclues de cette construction (**Figure 80**). Nous avons constaté une augmentation de l'effet positif de PFKFB2^{KD} en présence d'insuline suggérant que l'insuline agit sur les cônes par d'autres voies indépendantes de PFKFB2. L'insuline augmente l'expression de GLUT1 (Punzo et al., 2009). Ce dernier mécanisme est à même d'expliquer ce que nous observons ici.

16.2. Etude de l'implication de la voie PI3K/AKT sur l'expression et la phosphorylation de PFKFB2

Les voies de signalisation de l'insuline ont été largement décrites dans la littérature (De Meyts, 2000). L'une des principales voies de la signalisation insulinique est celle de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) (Capeau, 2005). L'effet de l'insuline sur le transport du glucose, qui représente sans doute l'un des effets les mieux étudiés de l'hormone, illustre la complexité du signal de l'insuline. Celle-ci est capable d'induire la translocation, d'un compartiment intracellulaire vers la membrane plasmique, de vésicules contenant le transporteur GLUT4, présentes dans les cellules musculaires et les adipocytes (**Figure 36**). Ce processus met en jeu, à côté de la voie PI3 kinase, plusieurs autres voies de signalisation. Il existe une autre voie importante de signalisation par l'insuline, la voie des *mitogen activated protein-kinases* (MAPK), qui est commune à de nombreux facteurs de croissance et permet, *in fine*, d'activer l'expression génique et la prolifération cellulaire (**Figure 84**). Les voies PI3K/AKT et MAP kinase sont interconnectées entre elles et participent à l'activation l'une de l'autre, un *crosstalk* en Anglais. Des études ont montré que les cônes ont une voie de signalisation PI3K active (Johnson et al., 2005; Rajala, 2010). L'inactivation spécifiquement

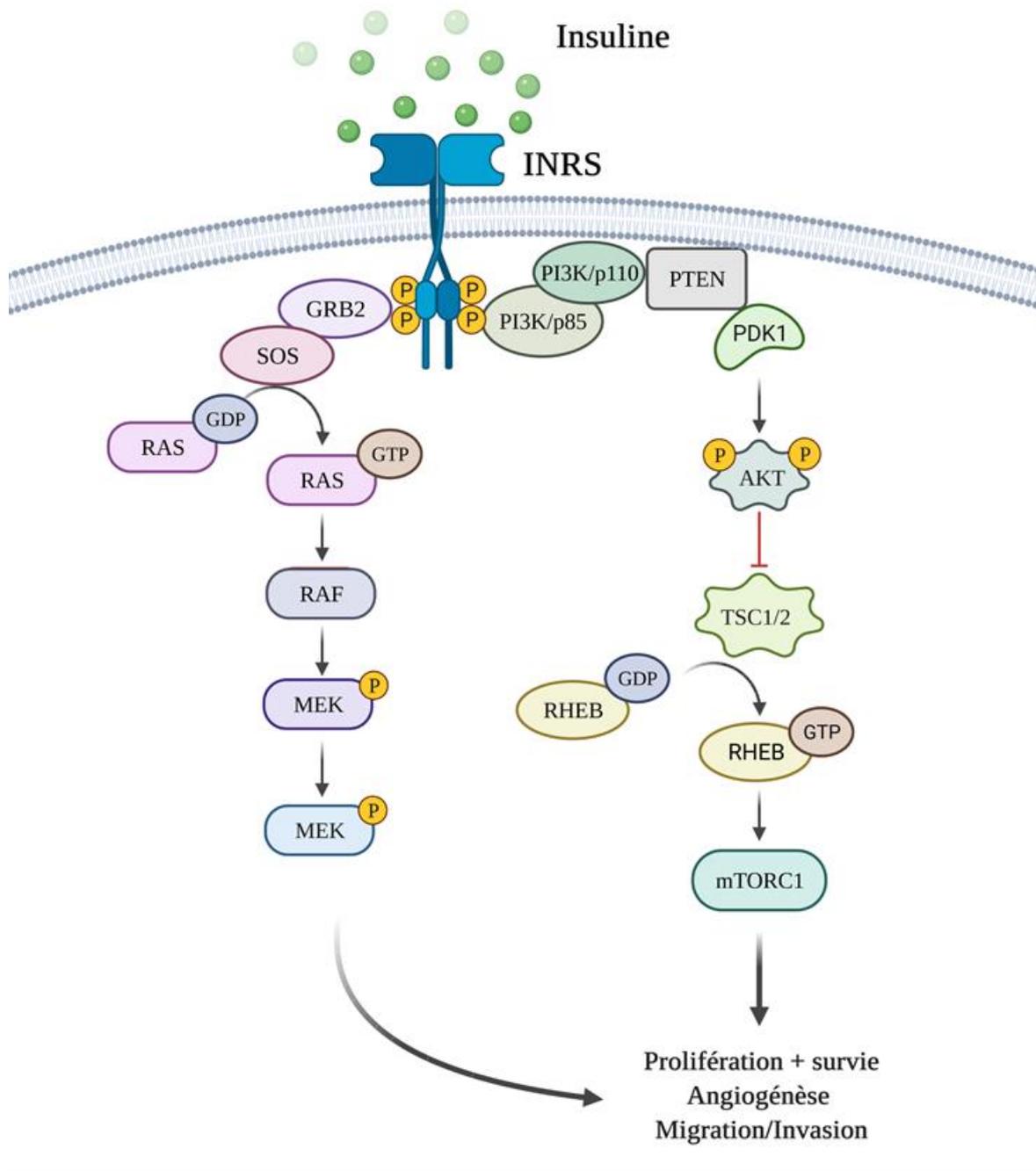


Figure 84 : Principales voies de signalisation de l'insuline : Voie de signalisation de phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) et voie des mitogen activated protein-kinases (MAPK). GRB2 : *Growth factor receptor-bound protein 2*, SOS : *Son of Sevenless*, RAS : *Rat sarcoma virus*, RAF : *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*, MEK : *Mitogen-activated protein kinase kinase*, GDP : *guanosine diphosphate*, GTP : *guanosine triphosphate*, PI3K : *phosphoinositide 3-kinase*, PTEN : *Phosphatase And Tensin Homolog*, PDK1 : *Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1*, AKT : *serine/threonine protein kinase*, TSC1/2 : *Tuberous sclerosis 1/2*, RHEB : *Ras homolog enriched in brain*, mTORC1 : *mammalian target of rapamycin complex 1* (Capeau, 2005).

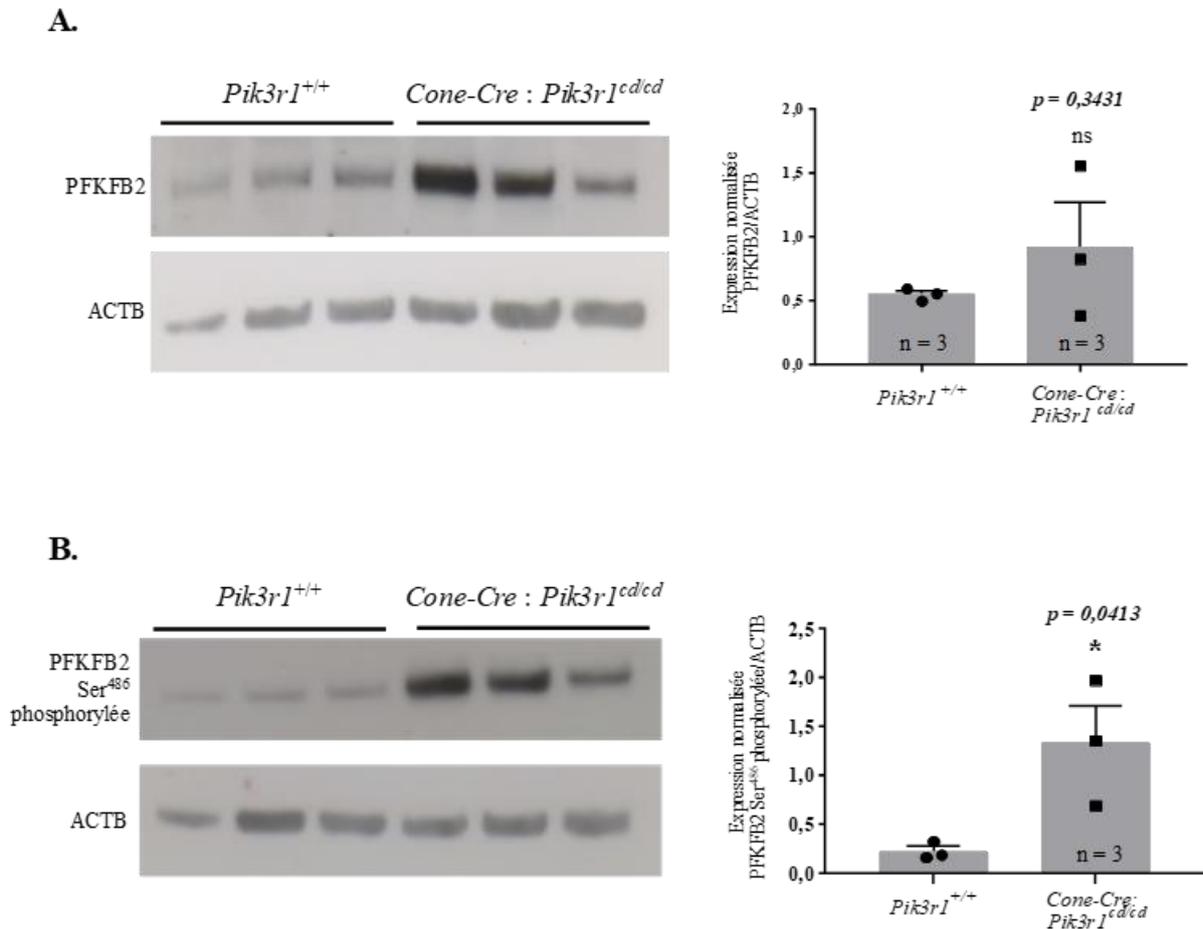


Figure 85 : Etude de l'expression et de la phosphorylation de PFKFB2 dans la rétine de souris [Cone-Cre : *Pik3ca*^{cd/cd}]. **A.** Etude par *western blotting* de l'expression de PFKFB2 dans la rétine grâce à l'anticorps Assaybiotech, la quantification de l'expression de PFKFB2 par rapport à l'actine été faite avec un test de student. La valeur p égale à 0,1464 (SEM) est non significative (ns). **B.** Etude par *western blotting* de la phosphorylation de PFKFB2 à la sérine 486 dans la rétine, la quantification de l'expression de PFKFB2 phosphorylé par rapport à l'actine été faite avec un test de student. La valeur p égale à 0,5245 (SEM) est non significative (ns).

dans les cônes de la sous-unité régulatrice p85 α de PI3K (PIK3R1) résulte chez la souris en une dégénérescence des cônes avec l'âge, suggérant que la signalisation PI3K est essentielle à la survie des cônes de la rétine (Ivanovic et al., 2011). Il en est de même pour la sous-unité catalytique p110 α de PI3K (PIK3CA) ; la délétion spécifique dans les cônes de *Pik3ca* entraîne la dégénérescence des cônes. Ces études montrent que la signalisation PI3K est essentielle pour la survie des cônes (Rajala et al., 2015).

Dans la littérature, la voie issue de la voie de signalisation insuline/PI3K, phosphoryle la sérine⁴⁸³ de PFKFB2 chez l'homme et S⁴⁸⁶ chez la souris (**Figure 80B**) (Bertrand et al., 1999). Nous avons donc examiné la phosphorylation de PFKFB2 dans la rétine de souris [Cone-Cre : *Pik3r1*^{cd/cd}] et [Cone-Cre : *Pik3ca*^{cd/cd}] que nous a transmis Raju Rajala de l'Université d'Oklahoma (Rajala et al., 2013). Les souris [Cone-Cre : *Pik3ca*^{cd/cd}] ont l'unité catalytique p110 α de PI3K spécifiquement inactivée dans les cônes. Mon étude par *western blotting* de l'expression de PFKFB2 ne révèle aucune différence significative entre les souris *Pi3ca*^{+/+} et les souris [Cone-Cre : *Pik3ca*^{cd/cd}] (**Figure 85A**). Il en est de même pour la phosphorylation de PFKFB2 à la sérine 486 dans la rétine ; aucune différence significative dans la phosphorylation de cette protéine n'est observée entre les deux génotypes (**Figure 85B**). Ces résultats suggèrent que la phosphorylation de PFKFB2 est indépendante de la sous-unité catalytique p110 α de PI3K. J'ai réalisé la même étude a été réalisée avec une lignée de souris dont l'unité régulatrice p85 α de PI3K a été inactivée spécifiquement dans les cônes [Cone-Cre : *Pik3r1*^{cd/cd}]. L'étude de l'expression de PFKFB2 dans la rétine de ces souris montre une tendance, même si elle n'est pas significative, d'augmentation de l'expression de PFKFB2 (**Figure 86A**). Le nombre de rétines fournies par notre collaborateur n'a pas permis de reproduire l'expérience et de confirmer cette tendance, statistiquement parlant. En revanche, l'étude de la phosphorylation de PFKFB2 à la sérine 486 dans la rétine chez ces mêmes souris montre une augmentation significative de la forme phosphorylée Ser⁴⁸⁶ (**Figure 86B**). Nous constatons que la délétion de l'unité régulatrice p85 α de PI3K conduit à une augmentation de l'expression de PFKFB2 qui se traduit par une augmentation de sa forme phosphorylée. Ces résultats sont complètement inattendus car au regard des différentes études menées sur la signalisation de l'insuline et de la phosphorylation de Ser⁴⁸⁶ par la voie de l'insuline/PI3K/AKT, nous nous attendions uniquement à une diminution de la phosphorylation de PFKFB2. L'expression et non la phosphorylation de PFKFB2 est augmentée suite à la délétion de *Pik3r1* dans les cônes. La phosphorylation de PFKFB2 au résidu sérine 486 par l'insuline ne requiert donc pas la présence

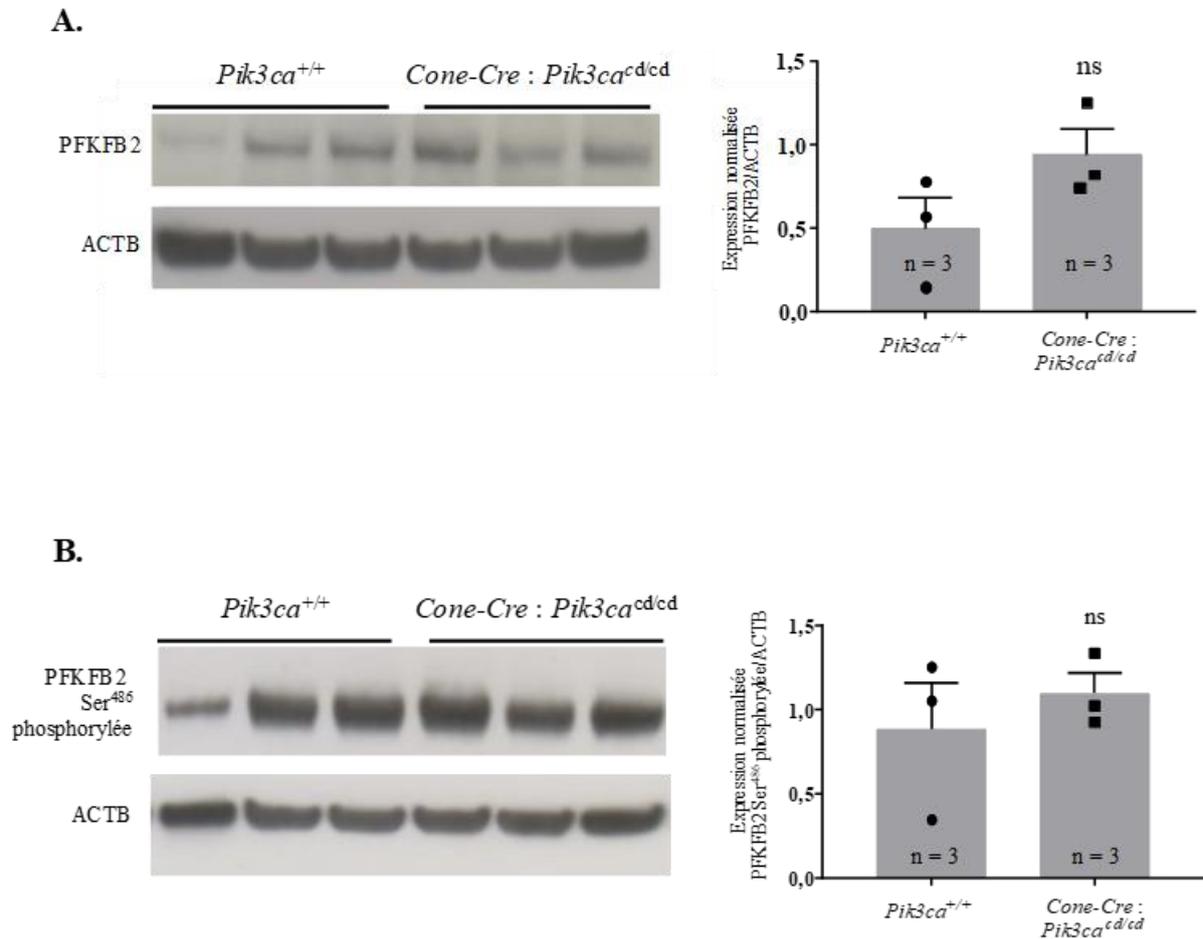


Figure 86 : Etude de l'expression et de la phosphorylation de PFKFB2 dans la rétine de souris [*Cone-Cre : Pik3r1*^{cd/cd}]. **A.** Etude par western blotting de l'expression de PFKFB2 dans la rétine grâce à l'anticorps Assaybiotech, la quantification de l'expression de PFKFB2 par rapport à l'actine été faite avec un test de student. La valeur p égale à 0,3431 (SEM) est non significative (ns). **B.** Etude par western blotting de la phosphorylation de PFKFB2 à la sérine 486 dans la rétine, la quantification de l'expression de PFKFB2 phosphorylé par rapport à l'actine été faite avec un test de student. La valeur p égale à 0,0413 (SEM) est significative

de PI3K. Il est donc concevable, bien que ceci n'ait pas été étudié, que l'insuline contrôle cette phosphorylation par la voie des MAPK (**Figure 84**). Une étude montre que l'activité mTOR, qui est impliquée dans la fonction des cônes n'est pas requise pour leur survie chez la souris (Ma et al., 2015b). Ceci suggère que le soutien trophique des cônes en aval de PI3K est indépendant de la signalisation mTOR. La signalisation insuline/mTOR pourrait être indépendante de PI3K (p85 α et p110 α) dans les cônes et expliquer ainsi l'absence d'effet sur la phosphorylation de Ser⁴⁸⁶ PFKFB2 chez les souris [Cone-Cre : *Pik3ca*^{cd/cd}]. De plus, les sous-unités régulatrices PIK3R1 et PIK3R2 forment des hétérodimères qui sont perturbés par le traitement à l'insuline (Park et al., 2010). Cette perturbation de l'hétérodimérisation permet aux monomères résultants (PIK3R1 ou PIK3R2) d'interagir avec *X-box binding protein-1* (XBP1) et d'augmenter la translocation nucléaire de la forme épissée de XBP1 (sXBP1). Une étude montre même qu'en l'absence d'une sous-unité régulatrice, l'autre sous-unité régulatrice (PIK3R1 ou PIK3R2) se lie à sXBP1, ce qui résulte en la translocation de sXBP1 dans le noyau qui active la transcription à travers la liaison à un élément sur l'ADN (Madhusudhan et al., 2017). Notre observation inattendue pourrait théoriquement résulter de l'association de PIK3R2 (PI3K p85 β), avec XBP1 suivie de sa translocation nucléaire (Park et al., 2010). Comme il existe un élément de liaison candidat pour XBP1 (GGTCCTGCA) dans le promoteur PFKFB2 (Madhusudhan et al., 2017) (**Figure 91A**), nous avons transmis notre reporteur luciférase à Raja Rajala afin qu'il teste son activité par transfection transitoire (**Figure 90**). L'activité de ce promoteur est inhibée par la co-transfection de PIK3R1 dans des cellules HEK293 (**Figure 87A**). Cette inhibition est particulièrement significative ($p < 0,0001$) ce qui semble confirmer que PIK3R2 (p85 β) se lie à l'élément que nous avons identifié dans le promoteur de PFKFB2, bien que l'effet sur l'activité du promoteur, dans ce contexte cellulaire, n'est pas en mesure d'expliquer notre observation *in vivo*.

16.3. Etude de l'expression du récepteur de l'insuline dans l'épithélium pigmentaire rétinien

Au cours de son travail dans l'équipe en tant que doctorant soutenu par une bourse Chateaubriand, John Han a montré que le récepteur de l'insuline (INSR) est exprimé par les cônes (**Figure 88**). Les mécanismes qui sous-tendent la transcytose médiée par le récepteur de l'insuline, ainsi que l'identité d'un récepteur/transporteur de l'insuline dans la barrière hémato-encéphalique sont controversés (Goncalves and De Felice, 2021). La rétine interne est

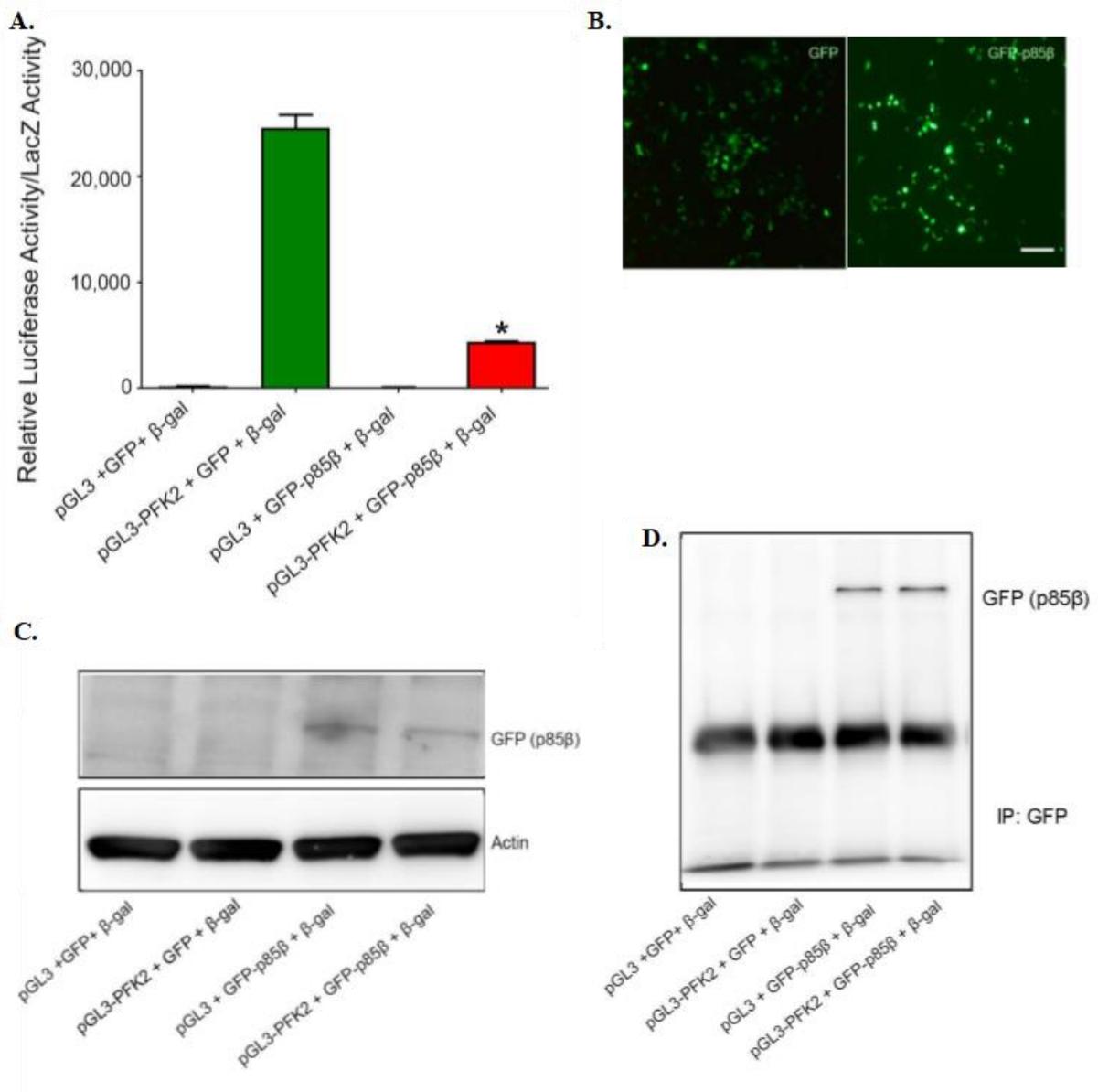


Figure 87 : Etude de l'activité du promoteur de PFKFB2 en présence de la sous unité p85β (PIK3R1) de la PI3K. A. Etude de l'activité de promoteur de PFKFB2 par transfection transitoire dans les cellules HEK-293T avec la sous unité p85β de PI3K. moyenne + SEM (n = 3). * $p < 0,0001$. **B.** Vérification de l'expression de la GFP et de la GFP-p85β dans les cellules HEK-293T transfectées. **C.** Vérification de l'expression par *western blotting* de la sous unité p85β dans les cellules HEK-293T transfectées. **D.** Vérification par immunoprécipitation de l'expression de la GFP.

physiquement séparée de la rétine externe par la membrane limitante externe (Omri et al., 2010) (**Figure 4**). L'EPR forme la barrière hémato-rétinienne externe (**Figure 14**) et transporte le glucose du sang issu de la choroïde vers les photorécepteurs (Swarup et al., 2019). L'insuline atteint-elle les cônes à partir de la barrière hémato-rétinienne interne en traversant la membrane limitante externe ou l'insuline atteint-elle les cônes à partir de la barrière hémato-rétinienne externe ? Chez l'homme, les niveaux d'insuline dans le cerveau diminuent avec le vieillissement, et il a été démontré que l'administration intranasale de cette hormone améliore la mémoire (Benedict et al., 2007). Il s'agit d'une conséquence probable de la réduction du transport de l'insuline via la circulation sanguine dans le cerveau avec l'âge (Yang et al., 2020). Un mécanisme similaire peut théoriquement affecter la rétine au cours du vieillissement (**Figure 13A**).

17. Etude métabolomique du métabolisme du glucose chez les cônes en présence de Geralexin

Nous avons mis en évidence précédemment que la Geralexin protégeait les cônes via la glycolyse aérobie (**Figure 47**), tout comme RdCVF (**Figure 51**). L'augmentation de la concentration du glucose (**Figure 53**) et la Geralexin augmente l'expression de *Pfkfb2* (**Figure 54**). Afin de mimer l'effet de RdCVF, nous avons étudié avec le concours d'une plateforme métabolomique (METATOUL à l'INSA de Toulouse), les différents métabolites issus du métabolisme du glucose des cônes en présence de Geralexin. La métabolomique consiste en la quantification de l'ensemble des métabolites présents dans un organisme, une cellule, un tissu, un organe. C'est une approche puissante qui mesure simultanément les composés de faibles poids moléculaires (< 1.5 kDa) dans un échantillon biologique, permettant de caractériser le statut métabolique d'un système biologique à un moment précis, un état stationnaire (*steady state* en Anglais). Les plateformes que nous avons contactées ne sont pas en mesure de doser le F26BP, pas plus la plateforme METATOUL que celle dirigée par notre collaboratrice Stefanie Hauck à Helmholtz Zentrum de Munich. Cela proviendrait du fait que le F26BP est extrêmement difficile à synthétiser (Philippe Bernard, GreenPharma, communication personnelle), et les plateformes ne peuvent développer la quantification de F26BP sans ce standard. Il peut être quantifié par une méthode enzymatique développée en 1982 par Henri-Gery Hers de

Anticorps anti-récepteur à l'insuline α
Au 1/50^{ème}

Condition contrôle
sans anticorps secondaire

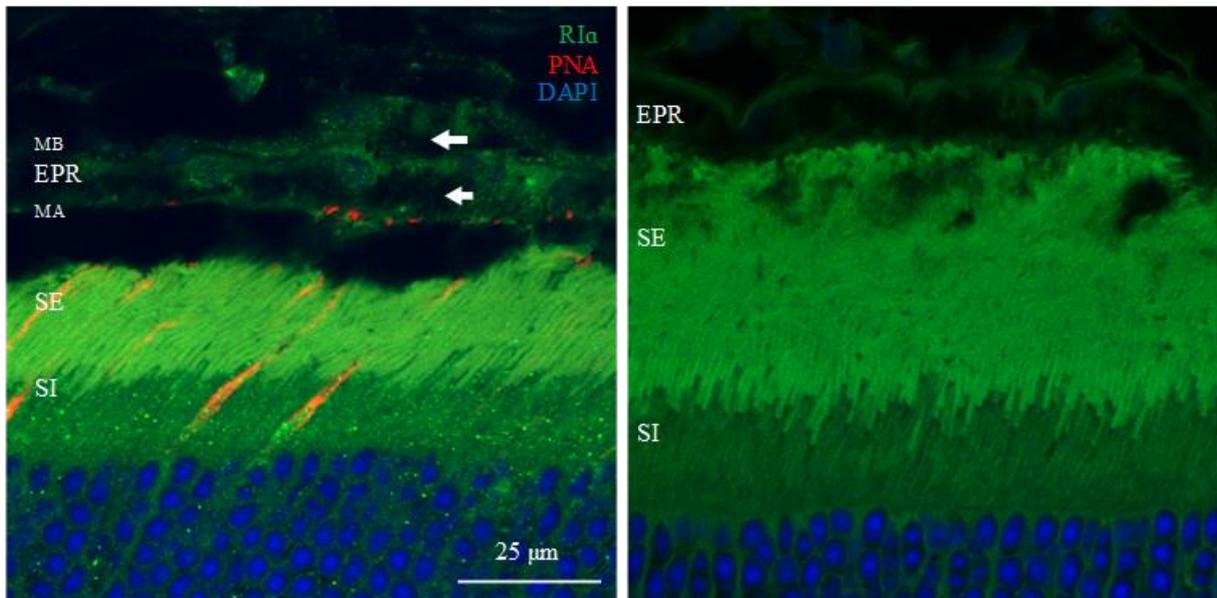


Figure 88 : Mise en évidence de l'expression du récepteur à l'insuline α dans la partie basale et apicale de l'épithélium pigmentaire rétinien. MB : membrane basale, MA : membrane apicale, EPR : épithélium pigmenté rétinien, SE : Segments externes, SI : segments externe, RI α : récepteur à l'insuline α .

l'Université de Louvain (Van Schaftingen et al., 1982) qui est malheureusement décédé en 2008. Nos résultats sont donc basés sur l'effet de Geralexin sur d'autres métabolites de la glycolyse. Nous avons observé dans les cônes traités avec la Geralexin, une diminution de significative du glucose-6-phosphate (G6P) et du fructose-6-phosphate (F6P). Les autres métabolites en aval du F6P ne présentent aucuns changements significatifs de leur concentration lorsque les cônes sont en présence de Geralexin (**Figure 89**). Ces résultats obtenus à l'état stationnaire montrent que Geralexin accélère le flux glycolytique en aval du F6P en activant la réaction $F6P \rightarrow F16BP$ qui est catalysée par la phosphofructokinase (PFK) (**Figure 19**). Geralexin accélère le flux de glycolyse aérobie dans le cônes en agissant sur l'expression de PFKFB2. Par extension, RdCVF agirait à la fois sur l'entrée du glucose dans les cônes et sur le flux glycolytique via PFKFB2 (**Figure 90**).

18. Etude du promoteur de *Pfkfb2*

18.1. Etude de l'activité du promoteur de *PFKFB2* en fonction de la concentration en glucose

Comment le glucose peut-il augmenter l'expression de *Pfkfb2* et donc accélérer la glycolyse aérobie ? Pour répondre à cette question nous nous sommes focalisés sur le promoteur de *Pfkfb2*. Comme l'expression de *Pfkfb2* est dépendante de la concentration de glucose, nous avons tout d'abord étudié l'activité du promoteur en réponse à différentes concentrations de glucose. Pour ce faire, nous avons construit un plasmide avec un gène rapporteur qui code pour la luciférase, placé sous le contrôle du promoteur du gène humain *PFKFB2* (**Figure 91A**). La luciférase catalyse la réaction de bioluminescence en oxydant la luciférine en oxyluciférine en présence d'oxygène, d'ATP et de Mg^{2+} . Ceci provoque alors l'émission d'un photon dont la lumière résultante est jaune-vert. Nous avons co-électroporé dans les cônes d'embryons de poulet *in vitro* ce plasmide avec un plasmide contrôle codant pour la RFP et nous avons mesuré l'activité du promoteur par luminescence. Nous avons ensuite normalisé ces résultats avec le nombre de cellules RFP positives. En augmentant la concentration en glucose dans le milieu extracellulaire, l'activité du promoteur augmente de façon significative (**Figure 91B**). Ces résultats suggèrent que l'activité du promoteur est activée par la concentration en glucose intracellulaire des cônes.

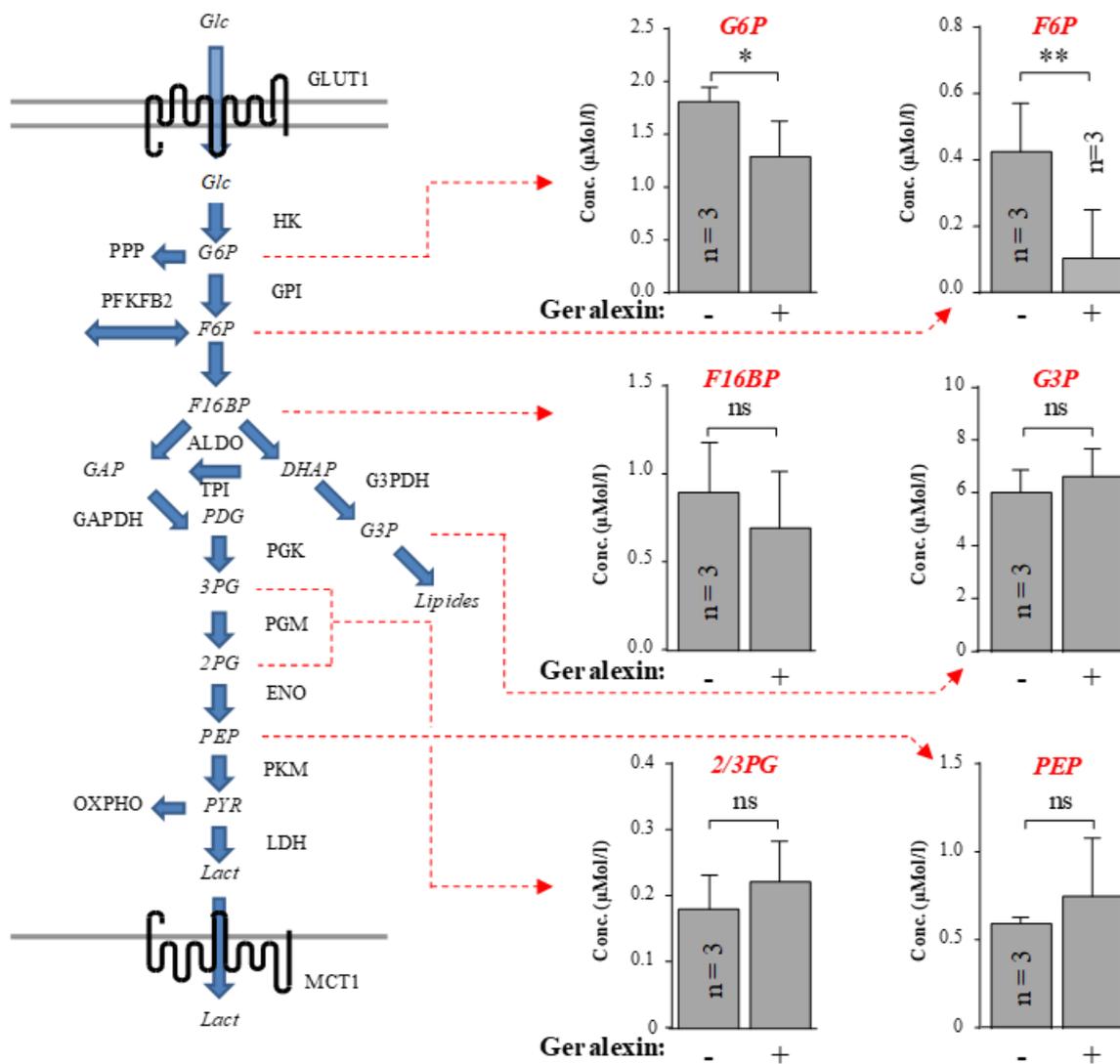


Figure 89 : Etude métabolomique du métabolisme du glucose chez les cônes en présence de Geralexin. Analyse statistique faite avec un test de student valeur $*p = 0,0104$ (SEM) et $**p = 0,0048$ (SEM).

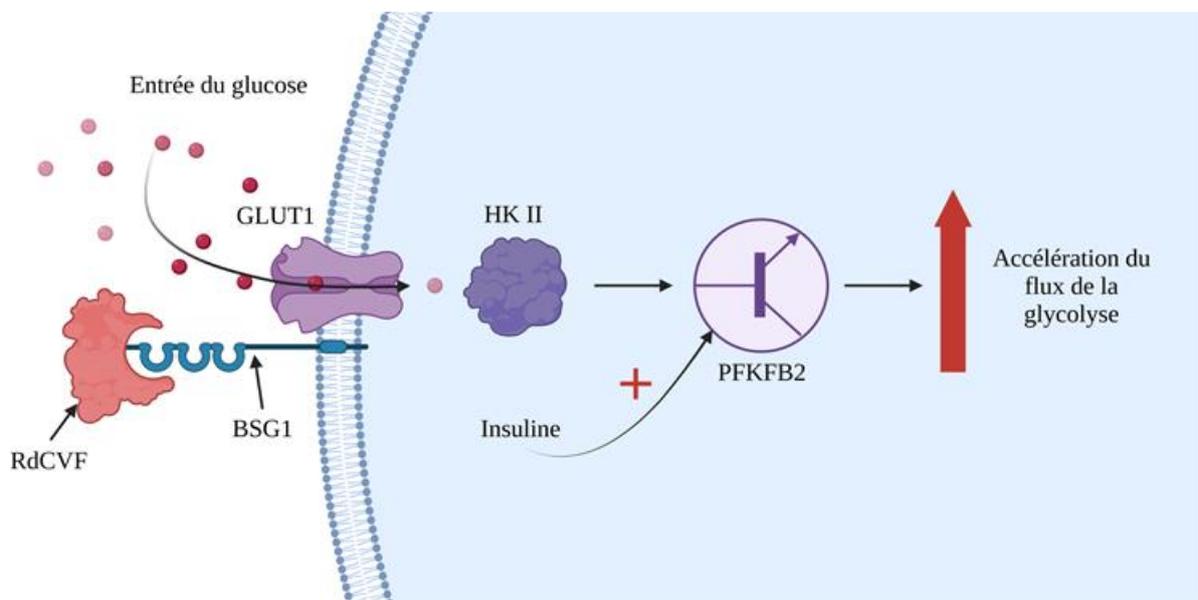


Figure 90 : Modèle d'action de RdCVF sur PFKFB2 ainsi que sur le flux de la glycolyse aérobie. RdCVF : *Rod derived viability factor*, BSG : basigin, HK II : hexokinase II.

A.



B.

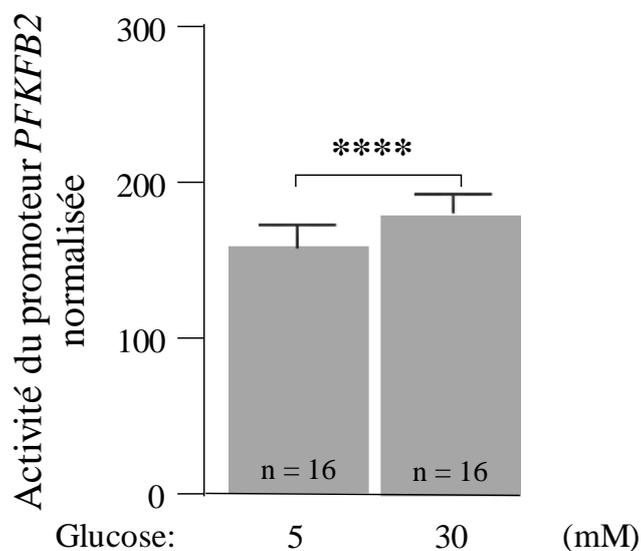


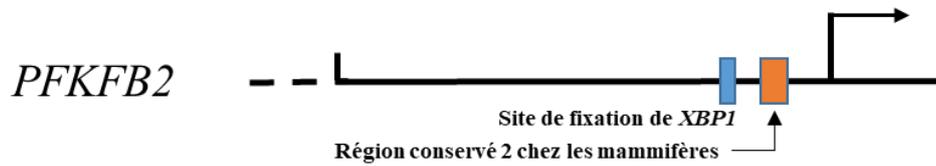
Figure 91 : Etude de l'activité du promoteur du gène *PFKFB2* en fonction de la concentration en glucose. A. Schématisation de la construction du plasmide de la luciférase sous contrôle du promoteur de *PFKFB2* pour l'étude de l'activité du promoteur. **B.** Activité du promoteur normalisée par les cellules RPF positives. Etude statistique faite avec un test de student, valeur $p < 0,0001$ (SEM).

18.2. Etude de l'activité du promoteur de *PFKFB2* muté dans la région *Mammalian conserved Region 2*, en fonction de la concentration en glucose

Dans un deuxième temps, nous avons voulu vérifier quel élément dans le promoteur de *Pfkfb2* pourrait être impliqué dans cette réponse au glucose. Pour cela nous avons muté dans la séquence du promoteur, une séquence hautement conservée chez 90 espèces de mammifères appelé *Mammalian Conserved Region 2* CTCCAGGTGAGG (**Figure 91A**), qui contient des séquences consensus d'éléments de fixation de facteurs de transcription que nous avons placés en 5' du gène de la luciférase. Nous avons testé l'activité du promoteur dans les mêmes conditions que précédemment. Les résultats obtenus sont déroutants. En effet, nous observons une augmentation significative de l'activité du promoteur de *Pfkfb2* (**Figure 92B**). Bien que cette séquence soit conservée, il semble qu'elle joue un rôle négatif sur la stimulation du promoteur *PFKFB2* par le glucose. Afin de comprendre ce résultat nous avons cherché les différents facteurs de transcription qui sont susceptibles de se fixer sur ces séquences consensus mutés et qui aurait pu expliquer l'augmentation de l'activité du promoteur de *PFKFB2*. Nous avons trouvé trois facteurs de transcription candidats : *Snail family transcriptional repressor 2* (SNAI2), un facteur de transcription répresseur qui module à la fois la transcription dépendant d'activateurs de transcription et la transcription basale (Nieto, 2002), *Zinc Finger protein 354C* (ZNC351C), un facteur de transcription qui pourrait jouer le rôle de répresseur (Oo et al., 2020) et *Transcription factor E3* (TFE3), un facteur de transcription de la famille *helix-loop-helix*, qui se lie au motif mu-E3 de l'amplificateur de chaîne lourde des immunoglobulines et qui est exprimé dans de nombreux types cellulaires. La mutation dans la séquence consensus du promoteur de *PFKFB2* ne permettrait pas à ces répresseurs de transcriptions de se fixer et donc de réduire l'activité de *PFKFB2* en présence de glucose. Cet élément pourrait en fait être responsable de l'expression restreinte du messager de *PFKFB2* (**Figure 60**). Comme cette mutagenèse n'a pas permis d'identifier la bonne cible, nous avons recherché les facteurs de transcription pouvant répondre au glucose possédant une séquence consensus de fixation dans le promoteur *PFKFB2*.

A.

chr1:207,053,275-207,077,817 TSS (283pb)



B.

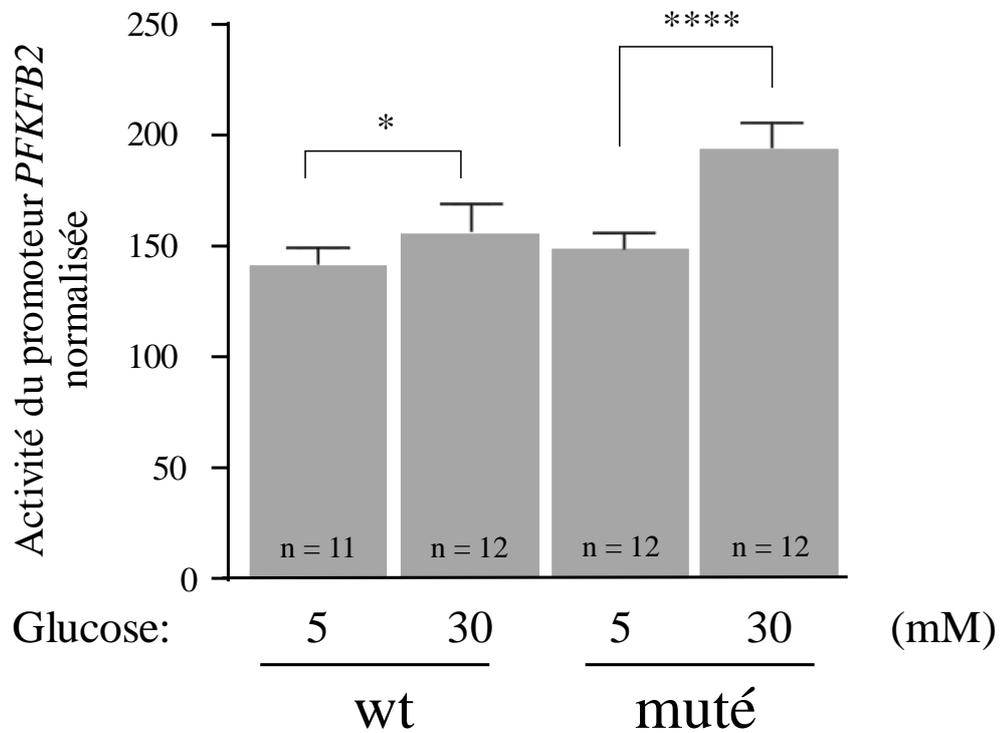


Figure 92 : Etude de l'activité du promoteur du gène *PFKFB2* muté dans la région 2 conservée chez les mammifères, en fonction de la concentration en glucose. A. Comparaison des séquences du promoteur muté dans la région 2 conservée chez les mammifères avec le promoteur non muté de *PFKFB2*, CTCFL : CCCTC-Binding Factor Like, BHLHE40 : *Basic Helix-Loop-Helix Family Member E40*. **B.** Activité du promoteur muté normalisée avec les cellules RPF positives. Etude statistique faite avec un one-way ANOVA, test de Tukey comparaison multiple. * $p = 0,0294$ (SEM) et **** $p < 0,0001$ (SEM).

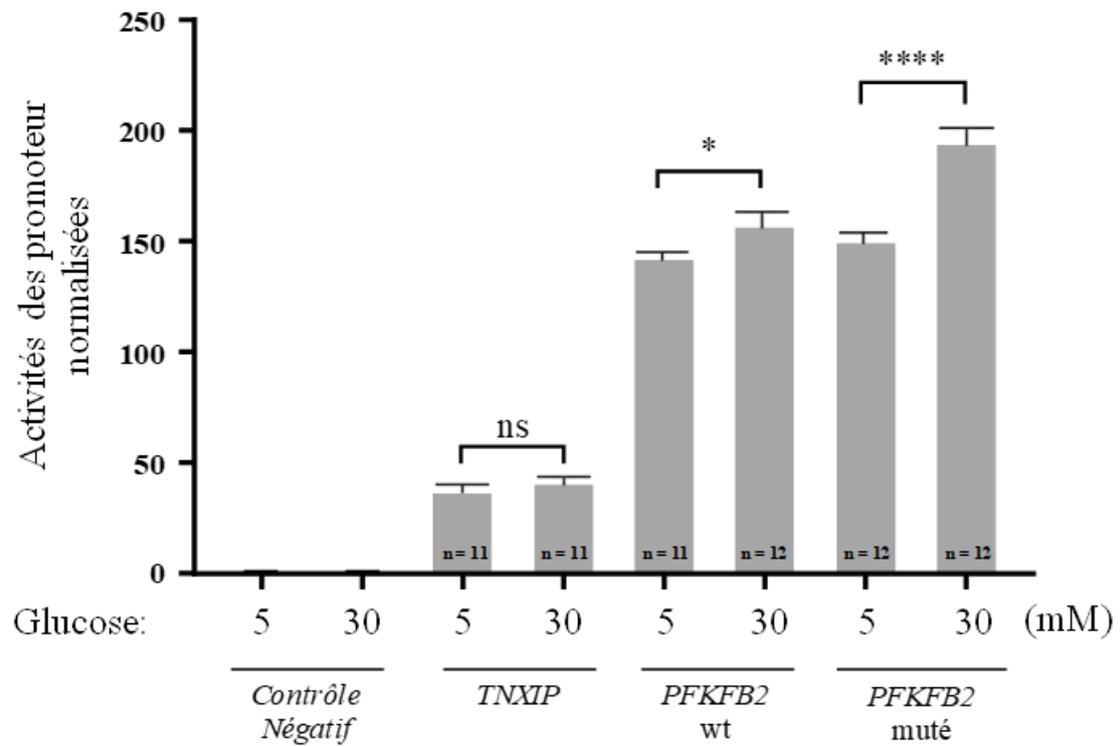
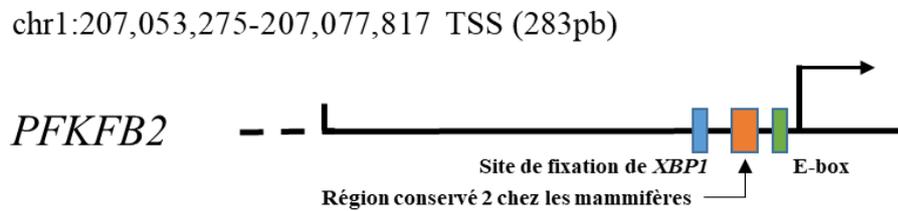


Figure 93 : Etude de l'activité du promoteur du gène *TNXIP*, en fonction de la concentration en glucose. A. Activité du promoteur muté normalisée avec les cellules RPF positives. Etude statistique faite avec un one-way ANalysis Of VAriance (ANOVA), Test de Tukey comparaison multiple. * $p = 0,0294$ (SEM) et **** $p < 0,0001$ (SEM).

18.3. Etude de l'activité du promoteur de *PFKFB2* muté dans la région *Enhancer Box*, en fonction de la concentration en glucose

TNXIP est un inhibiteur de l'entrée du glucose dans la cellule car il provoque l'internalisation de GLUT1 (**Figure 29**). Nous avons donc utilisé ce promoteur comme contrôle positif dans nos expériences car nous savons que ce promoteur est régulé par le glucose (Minn et al., 2006). De façon assez surprenante, nous avons constaté que son activité est relativement faible en comparaison avec l'activité du promoteur *PFKFB2* mais surtout qu'il ne répond pas à l'augmentation de la concentration en glucose dans les cultures enrichies en cônes (**Figure 93**). Nous nous sommes interrogés sur ce résultat contradictoire et nous avons recherché quel facteur de transcription pourrait agir comme répresseur du promoteur *TNXIP* dans les cônes. L'oncoprotéine MYC est un facteur de transcription qui agit comme régulateur de la glycolyse aérobie en réduisant l'expression de la protéine TXNIP, en se liant à une région contenant une *Enhancer Box* (E-box) du promoteur *TNXIP* et ceci en compétition avec le facteur de transcription apparenté, MONDOA (Qu et al., 2018). Chez l'homme, les précurseurs des cônes expriment de manière prédominante N-MYC (*MYCN*) (Xu et al., 2009). Comme le complexe MYC:MAX, MONDOA:MLX (Max-like protein X), est un complexe de transcription de la famille des *basic helix-loop-helix and leucine zipper* (bHLHZip) et se lie également à des éléments E-box dans les promoteurs ciblés. Le complexe MONDOA (MLXIP):MLX est un régulateur positif du promoteur du gène *TNXIP* (Stoltzman et al., 2008). Sachant que MYC est un répresseur de la transcription du gène *TNXIP* et que MONDOA est un activateur en réponse au glucose, nous avons recherché des séquences d'éléments E-box dans le promoteur de *PFKFB2*. Une analyse *in silico* a révélé que *PFKFB2* possède un élément E-box dans son promoteur (**Figure 94A**). Nous avons donc muté cette séquence E-box dans le promoteur *PFKFB2* et testé l'activité du promoteur dans les mêmes conditions que précédemment (**Figure 92B**). Les résultats montrent une diminution de l'activité du promoteur muté à la concentration basale de glucose et de façon très intéressante, nous observons une absence de réponse du promoteur à l'augmentation du glucose dans le milieu de culture (**Figure 94B**). Nous en concluons que la stimulation de l'activité du promoteur *PFKFB2* par le glucose repose sur un ou des facteurs de transcription qui se fixent à l'élément E-box.

A.



B.

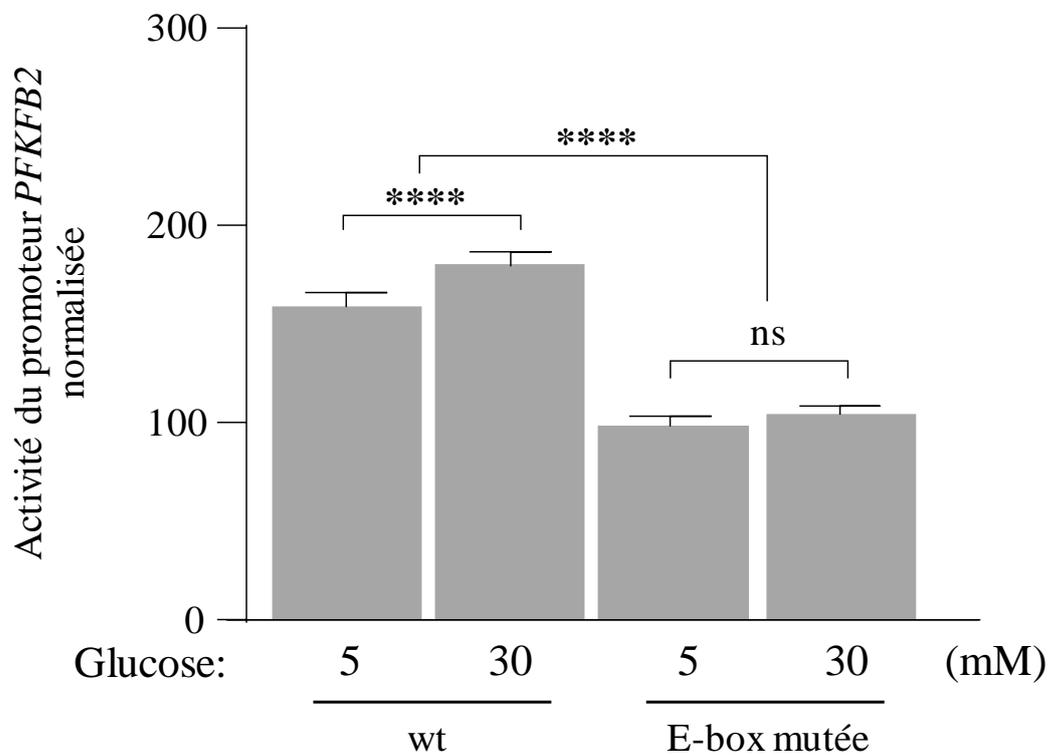


Figure 94 : Etude de l'activité du promoteur *PFKFB2* muté dans la région *enhancer box*, en fonction de la concentration en glucose. A. Séquences du promoteur muté dans la région dans la Ebox de *PFKFB2*, CTCFL : *CCCTC-Binding Factor Like*, *BHLHE40*, *Basic Helix-Loop-Helix Family Member E40*. **B.** Activité du promoteur muté normalisée avec les cellules RPF positives. Etude statistique faite ANOVA, test de Tukey comparaison multiple. **** $p < 0,0001$ (SEM).

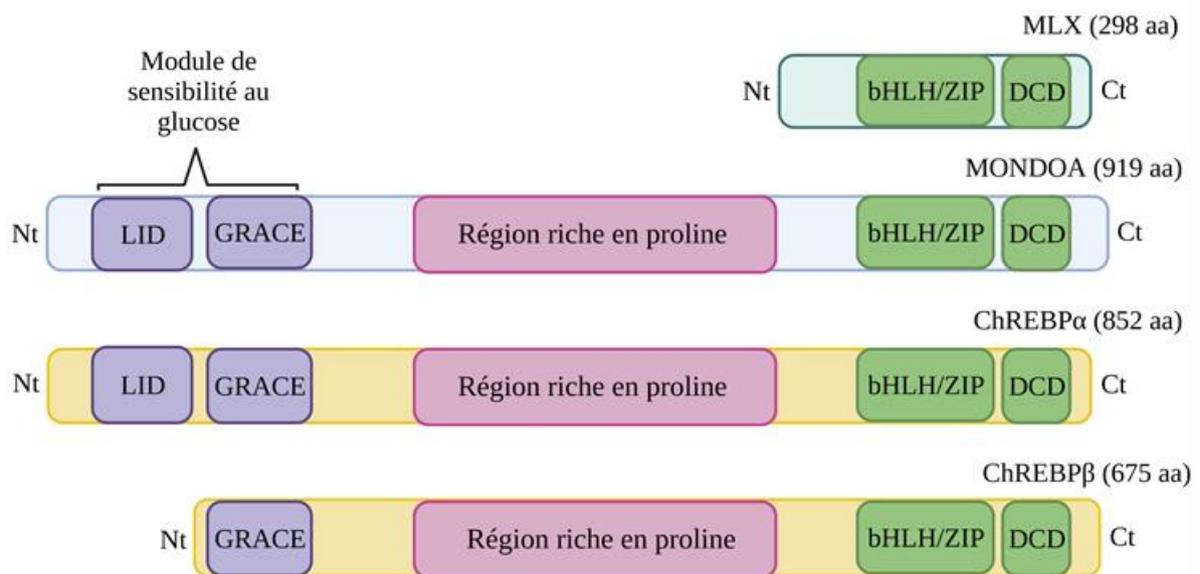


Figure 95 : Représentation schématique des domaines structuraux des protéines de la famille MLX et MONDO. GRACE: *glucose-response activation conserved element*, LID: *low-glucose inhibitory domain*, bHLH/ZIP: *basic helix-loop-helix and leucine zipper*, DCD : *cytoplasmic localization domain*. (Richards et al., 2017).

19. Le facteur de transcription MONDOA

Parmi les facteurs de transcription qui se lient sur cet élément E-box, un facteur qui nous a semblé particulièrement intéressant est le facteur de transcription MONDOA cité plus haut. En effet, MONDOA, un régulateur du promoteur *TNXIP* en réponse au glucose appartient à la sous-famille des bHLHZip qui comprend le *Carbohydrate-responsive element-binding protein* α (MLXPL/ChREBP α), un autre facteur de transcription répondant au glucose. MLXPL est exprimée dans le foie, les tissus adipeux blancs et bruns, les cellules des îlots pancréatiques, l'intestin grêle et les reins avec un niveau d'expression inférieur dans d'autres tissus, y compris le muscle squelettique. MONDOA (MLXIP) est un homologue de MLXPL qui est activé par le de glucose exprimé de manière ubiquitaire dans les tissus de mammifères (Katz et al., 2021). L'activation transcriptionnelle de l'expression des gènes par MONDOA requière la formation d'un hétérotétramère avec MLX, une autre protéine bHLH/LZ. Le complexes MONDOA:MLX jouent un rôle central dans la réponse transcriptionnelle au glucose intracellulaire . HKII (HXK2), PFKFB3 et LDHA sont des cibles transcriptionnelles directes du complexe MONDOA:MLX. Les photorécepteurs expriment HKII, pas HKI (Ait-Ali et al., 2015) (**Figure 19**). Dans des conditions basales, les hétérodimères MONDOA:MLX inactifs se localisent à la surface de membrane mitochondriale externe (Sans et al., 2006). Ce complexe se transloque ensuite dans le noyau après activation par le glucose. MONDOA est une protéine à plusieurs domaines. Sa région C-terminale, possède un domaine bHLH/LZ et un domaine de dimérisation et localisation cytoplasmique (DCD) qui contribue à la dimérisation de la protéine avec MLX et la liaison à l'ADN. La région N-terminale est principalement impliquée dans la localisation cellulaire et son activité transcriptionnelle en réponse au glucose (**Figure 95**). Il contient un module de détection du glucose ou *glucose sensing module* (GSM) dont a fonction est conservée. Le GSM est divisé en un domaine inhibiteur lorsque la concentration du glucose est faible ou *low-glucose inhibitory domain* (LID) et un élément conservé d'activation de la transcription fonctionnel lorsque la concentration du glucose est élevée (GRACE) (Li et al., 2006). Le domaine GRACE confère une capacité de transactivation à MONDOA, qui peut être fortement réprimée par le domaine LID dans des conditions d'hypoglycémie (Richards et al., 2017). L'activité de l'hexokinase est nécessaire pour l'activation du complexe MONDOA:MLX (Stoltzman et al., 2008). G6P produit par l'hexokinase se lie de manière allostérique à la région hautement conservée dans le domaine GRACE de MONDOA. Un domaine GRACE a par ailleurs été identifié dans deux enzymes, la glucose phosphate isomérase

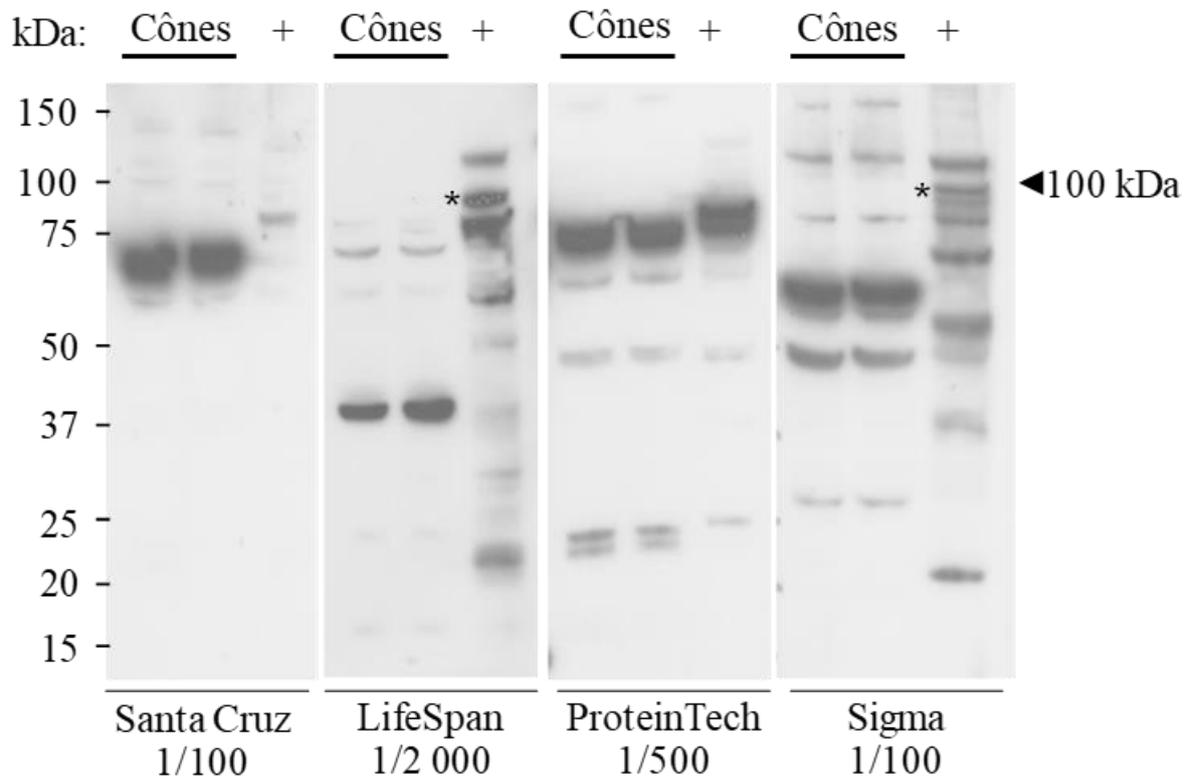


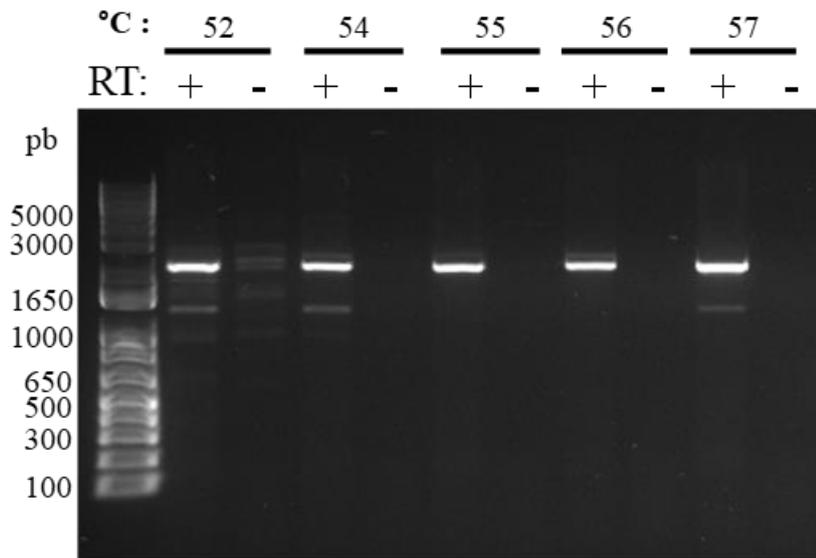
Figure 96 : Etude par western blotting de différents anticorps commerciaux afin d'identifier un anticorps capable de reconnaître la forme poulet de MondoA. kDa : kilodalton ; CP : cônes de poulet ; + : HEK293. * bande candidate dans le contrôle positif, pour les anticorps LifeSpan et Sigma, parmi de nombreuse autres bandes, mais ces bandes ne sont pas présentes dans les extraits des cultures enrichies en cônes.

(GPI) (**Figure 19**) et la glutamine-fructose-6-phosphate aminotransférase 1 (GFAT1) (**Figure 35**) (McFerrin and Atchley, 2012). L'activité transcriptionnelle de MONDOA et de MLXPL (ChREBP α) est induite par plusieurs métabolites, G6P, mais aussi F26BP, qui est synthétisé par PFKFB2 (Petrie et al., 2013) (**Figure 50A**). F26BP pourrait dans notre modèle être une autorégulation par rétroaction (*feedback*) de l'induction du promoteur *PFKFB2* par G6P. L'insuline régule l'expression ou l'activité de MONDOA et MLXPL (ChREBP α) (Song et al., 2019). Plusieurs études ont rapporté une action inhibitrice de l'insuline sur l'activité de MONDOA suite à l'interaction de mTOR, l'un des effecteurs en aval de la signalisation de l'insuline (**Figure 84**) avec MONDOA cytosolique, ce qui empêche son association avec MLX (Kaadige et al., 2015). De plus, la formation du complexe mTOR:MONDOA est renforcée par les ROS, un autre exemple de signalisation métabolique et redox (**Figure 42**) (Leveillard and Sahel, 2017).

19.1. Etude de différents anticorps commerciaux pour identifier la forme poulet de MONDOA

Pour démontrer que MONDOA est le facteur de transcription qui active l'expression de *PFKFB2*, nous avons projeté d'étudier dans nos cultures de cônes d'embryons de poulet, la translocation nucléaire de MONDOA après stimulation avec RdCVF. Pour cela il nous a fallu trouver un anticorps anti-MONDOA capable de reconnaître de façon spécifique MONDOA chez le poulet. Malheureusement, il n'existe pas beaucoup d'outils techniques tel que des anticorps spécifiques pour cette espèce et donc d'anticorps commerciaux. Nous avons donc cherché parmi tous les anticorps commerciaux, ceux qui pourraient être utilisés. Nous avons testé quatre anticorps commerciaux ; anticorps anti-MONDOA : LifeSpan ref : LS-C289892, Sigma ref : HPA023084, ProteinTech ref : 13614-1-AP et Santa Cruz ref : SC-13397 (**Table 3**) par *western blotting* à partir d'un lysat cellulaire de cônes d'embryons de poulet. Les résultats obtenus ne sont pas concluants car pour aucun des anticorps, n'est en mesure de détecter la protéine MONDOA (UniProt E1BVU2, masse 96,75 kDa) dans le lysat cellulaire de cônes de poulet (**Figure 96**). Avec le contrôle positif, la lignée cellulaire HEK293, nous détectons des bandes candidates pour les anticorps LifeSpan et Sigma, parmi de nombreuses autres bandes, mais ces bandes ne sont pas présentes dans les extraits des cultures enrichies en cônes.

A.



B.

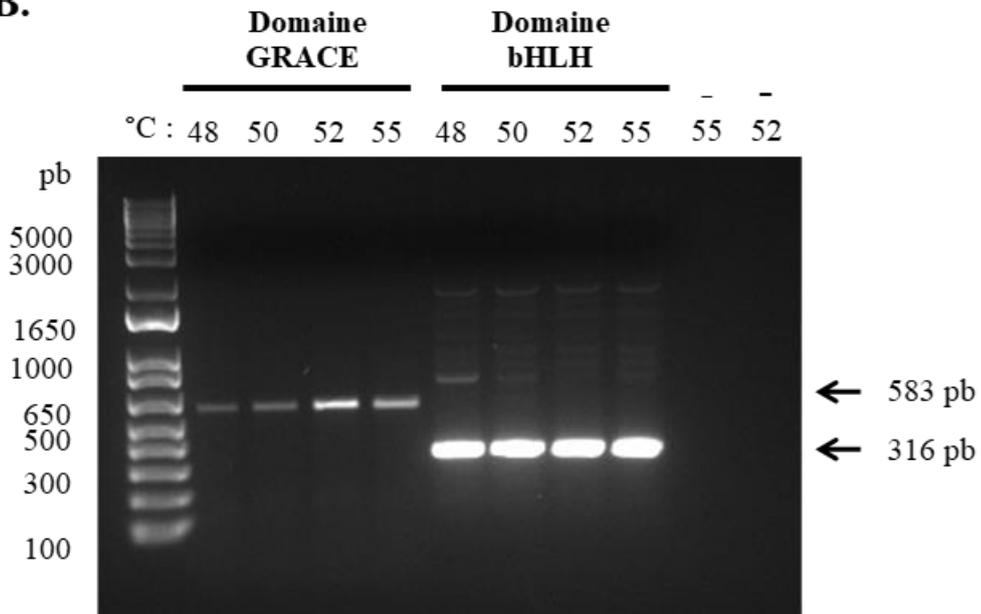


Figure 97 : Mise en évidence par RT-PCR de *MONDOA* chez le poulet. A. Mise en évidence de la séquence entière de *MONDOA* de 2 768 pb. **B.** Mise en évidence des domaines *glucose-response activation conserved element* (GRACE) et bHLH : (*basic helix-loop-helix and leucine zipper*) dans la séquence de *MONDOA* chez le poulet. pb : paire de base ; + : Produit de RT PCR; - : Contrôle sans rétrotranscription.

19.2. Etude de différents anticorps commerciaux par surexpression de la protéine MONDOA poulet par transfection transitoire d'un plasmide pcDNA3-chicken MONDOA

A partir d'ARN de cônes d'embryons de poulet nous avons amplifié l'ARN messager de MONDOA chez le poulet par RT-PCR et séquencé (**Figure 97A**). Nous avons ensuite vérifié que cette séquence d'ADN de MONDOA poulet, possédait la séquence qui code pour le module de sensibilité au glucose GRACE, mais également la séquence qui code pour le domaine bHLH/LZ qui contribue à la liaison à l'ADN. Avec des amorces appropriés (**Table 4**), nous avons mis en évidence la présence des deux domaines (**Figure 97B**). La séquence de MONDOA poulet (n° d'accèsion : XM_040684550) a été ensuite clonée dans un plasmide pcDNA3 (**Figures 98**). L'alignement avec la protéine de référence E1BVU2 indique l'existence de trois insertions qui correspondent à des variants d'épissage (**Figure 99**). Nous avons ensuite surexprimé la protéine MONDOA par transfection transitoire dans des cellules COS-1 et recherché l'expression de cette protéine par *western blotting* (**Figure 100A**). Les résultats ne montrent pas d'augmentation du signal pour les deux bandes candidates des anticorps anti-MONDOA (LifeSpan et Sigma), ni pour aucune des bandes migrant à la taille escomptée (**Figure 100B**). Ces résultats démontrent que ces anticorps commerciaux ne reconnaissent pas MONDOA du poulet.

19.3. Etude de différents sérums immuns de lapin immunisés avec les peptides immunogènes de MONDOA de poulet

Suites à ces différents tests avec les anticorps commerciaux, nous avons opté pour la production d'un anticorps anti-MONDOA du poulet. Nous avons sélectionné deux peptides immunogènes dans la partie N-terminale de la protéine MONDOA (HSGHFMVSSPHSEHPPKKG : 6515-2 et IVIREYHKWRTYFKKRLQK : 6515-4) pour leur antigénicité et leur hydrophilicité. Les anticorps ont été produits par la société Biotem par immunisation de quatre lapins (**Table 3**). Les premiers résultats avec les sera immun ne sont pas vraiment encourageants. Xiaoyuan Ren, un chercheur postdoctorant de l'équipe m'a donné un coup de main pour cette analyse. Les quatre sérums immuns de 28 jours post immunisation, ne détecte la protéine MONDOA de poulet (**Figure 101**). Nous allons reproduire cette


```

XM_040684550 1 MAADVFM RPAQLLGAAGPLSPRTEPDEDSSDIDDGGA SPGGGRRRCG PRRGQPPG PQI IHS
E1BVU2 1 MAADVFM RPAQLLGAAGPLSPRTEPDEDSSDIDDGGA SPGGGRRRCG PRRGQPPG PQI IHS
*****

XM_040684550 61 GHFMVSSPHSEHPKKG YD FDTVNE QTCQTY QFGAA RGGGGAGGRLS IDASLTKLFE CMS
E1BVU2 61 GHFMVSSPHSEHPKKG YD FDTVNE QTCQTY QFGAA ----- IDASLTKLFE CMS
*****

XM_040684550 121 LAYSGKLVSPKWK NFKGLK LQWRDK IRLNNA IWRAWYMQY LEKRNK PVCHFVTP LDG SVD
E1BVU2 110 LAYSGKLVSPKWK NFKGLK LQWRDK IRLNNA IWRAWYMQY LEKRNK PVCHFVTP LDG SVD
*****

XM_040684550 181 VDEHRRPEAIA TEGKYWK RRIE IVIREY HKWRTY FKKRLQKHKDE DLSSLVRDD DVVLWQ
E1BVU2 170 VDEHRRPEAIA TEGKYWK RRIE IVIREY HKWRTY FKKRLQKHKDED LSSLVRDD DVVLWQ
*****

XM_040684550 241 KRRYGRET PVPMEEG SLLDADMLM SEFT DTLFST LSSHQLVSW PNP REIAH LGNADMIQP
E1BVU2 230 KRRYGRET PVPMEEG SLLDADMLM SEFT DTLFST LSSHQLVSW PNP REIAH LGNADMIQP
*****

XM_040684550 301 GLIPLQPNFDFMDT FE PFQDLFTPSRSSAYF PSVSA VSSAITDSSSHSSQ SPVLPTGSLP
E1BVU2 290 GLIPLQPNFDFMDT FE PFQDLFTPSRSSAYF PSVSA ----- SPVLPTGSLP
*****

XM_040684550 361 NTLPSGNI SDGLIASSVPS PVI PDVGTDCQS SIRSGG SFI QPADFA PDSSSLSGP QTF LFPV
E1BVU2 336 NTLPSGNI SDGLIASSVPS PVI PDVGTDCQS SIRSGG SFI QPADFA PDSSSLSGP QTF LFPV
*****

XM_040684550 421 FQTPLPLLQPAQQHQ SPLPAVPINTSLSSP PSAFAA PETQKFLCESTVI THTASATLT
E1BVU2 396 FQTPLPLLQPAQQHQ SPLPAVPINTSLSSP PSAFAA PETQKFLCESTVI THTASATLT
*****

XM_040684550 481 HNA PATTFSQS QNLV LATAQQPGAGVPCNLAFQTT VLGQPRPQLQ SQLTALPKAVPLAS
E1BVU2 456 HNA PATTFSQS QNLV LATAQQPGAGVPCNLAFQTT ----- SQLTALPKAVPLAS
*****

XM_040684550 541 AGTRPKQSQKI ASAPK PETVSL LKNAF ITPAAFQGG SRAVIVTPT PLKRE GILTPAMPQ
E1BVU2 505 AGTRPKQSQKI ASAPK PETVSL LKNAF ITPAAFQGG SRAVIVTPT PLKRE GILTPAMPQ
*****

XM_040684550 601 SNVKIAPAGIARAPGVTEFRSN ILVGPAQQA PSSQSQSTVSHLFS TNVQDVLVKGEQV
E1BVU2 565 SNVKIAPAGIARAPGVTEFRSN ILVGPAQQA PSSQSQSTVSHLFS TNVQDVLVKGEQV
*****

XM_040684550 661 PSHNSSSQVPS PTPSRDCQNSGQAS PCTSEQSPS PQS PQNSCS GKLATDSQMAALKTQRM
E1BVU2 625 PSHNSSSQVPS PTPSRDCQNSGQAS PCTSEQSPS PQS PQNSCS GKLATDSQMAALKTQRM
*****

XM_040684550 721 KRTSSEQKRRFNIRIGCSI LNSLVS VNSKLI SHAITLQKTVEY IAKLQERTQMQEETR
E1BVU2 685 KRTSSEQKRRFNIRIGCSI LNSLVS VNSKLI SHAITLQKTVEY IAKLQERTQMQEETR
*****

XM_040684550 781 LREEIEELNAA IIS CQQLPATGVPVTWQRF DHI RSMFDE YVRNNT LQNWKFVI FSI IIK
E1BVU2 745 LREEIEELNAA IIS CQQLPATGVPVTWQRF DHI RSMFDE YVRNNT LQNWKFVI FSI IIK
*****

XM_040684550 841 PLFESFNGMVSTAS FKDLNQTA IAWLDQHCS LPVLRPMVLS SLRQLSVSTSVLSDPSRLP
E1BVU2 805 PLFESFNGMVSTAS FKDLNQTA IAWLDQHCS LPVLRPMVLS SLRQLSVSTSVLSDPSRLP
*****

XM_040684550 901 EQATEAVSRINETAGET
E1BVU2 865 EQATEAVSRINETAGET
*****

```

Figure 99 : Alignement de séquence entre la séquence protéique issu de l'ARN messenger de MONDOA poulet et la protéine de référence E1BVU2. Les séquences en jaune correspondent à des variants d'épissage.

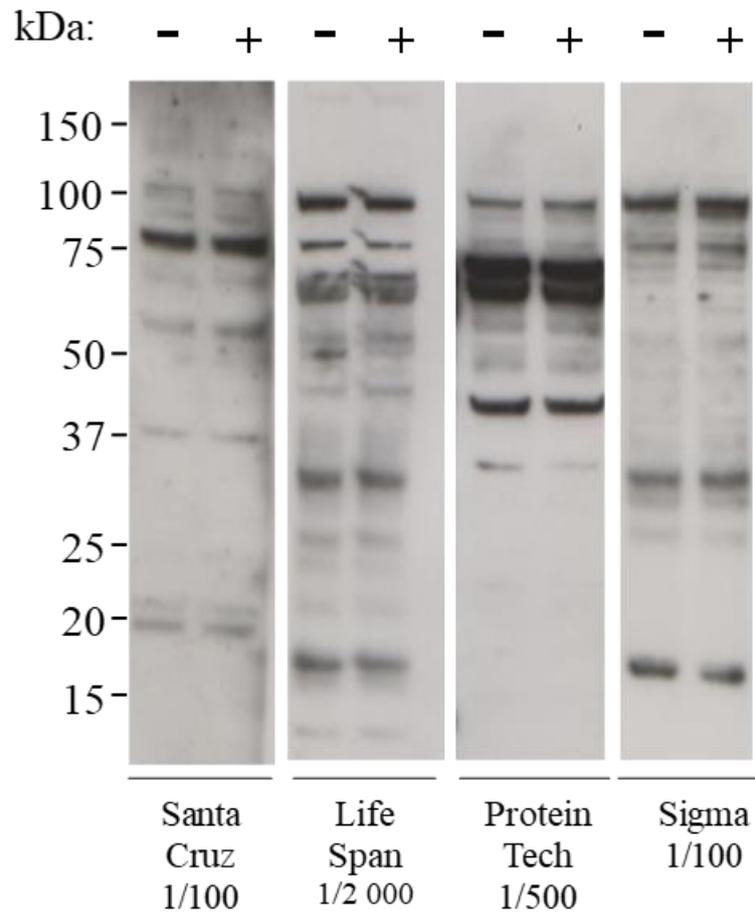


Figure 100 : Etude par *western blotting* de différents anticorps commerciaux par surexpression de la protéine MONDOA poulet par transfection transitoire d'un plasmide pcDNA3-chicken MONDOA. kDa : kilodalton, - : cellules COS-1 transfectées avec le plasmide contrôle pcDNA3, + : cellules transfectées avec le plasmide pcDNA3-chicken MONDOA.

A.

MAADVFMRPAQLLG AAGPLSPRTEPDESSD TDDGG ASPGGGRRRCGPRRG QPPGPQIIH **SGHF MVSSPH SEHPPKKG** Y
 DFDTVNEQTCQTY QFG AARGGGG AGGRLSID ASL TKLFECMSL AY SGKL VSPKWKNFKGLKL QWRDKIRL NNAIWR A
 WYMQ YLEKRN NPVCHFV TPLDGSVDVDEHRRPEAIATEGKYWKRRIE **IVIRE YHKWRTYF KKRLQK**HKDEDLSL VR
 DDDVVLWQKRRYGRE TP VPMEEGSLLD ADMLMSEF IDTLFSTLSSHQL VSWPNPREIAHLGN ADMIQPLIPLQPNFDF
 MDTFEPFQDLFTPSRSSAYFPSVSAVSSATTSSSHSSQSPVLP TG SLPNTLPSGNISDGLIASSVPSPVIPDVG TDQCS SIRSG
 G SFIQPADFAPDSSL SG PQIFLPVFQ TPLPLLQPAQQHQ SLP PAVPLNTLS SPPSAFAAPE TQKFGLCESTVIHTASATL
 THNAPATIFSQSNLVL ATQQPGAGVPCNL AFQTTVLQGGQPRPQLQSQL TFALPKAVPLASAGTRPKQSQK IASAPKPET
 VSL LLKNAFITPAAFQGSRAVIVTP TPLKREGIL TP AMPQSNVK IAPAGIAR APGVTEFRSNIL VGPAQQAPSSQSQS TV
 SHLFS TNV VQDVL VKGEQVP SHNSSQVPSPTP SRDCQNSG QASPC TSEQSPSPQSPQNSCSGKLATDSQMAALK TQRMK
 RTSSEQKRRFNIRIGCSILNSL VSVNSKLISHAITLQK TVEYIAKLQQER TQMQUEE TRRLREEIEELNAAIISCQQRLPATGVP
 V TWQRFDHIRSMFDEYVRNNTL QNWKFWIFSIIKPLFESFNGMVS TASFKDLNQ TALAWLDQHC SL PVL RMPVLSL RQ
 LSVSTSVLSDPSRLPEQATE AVSR TNE TAG ET

B.

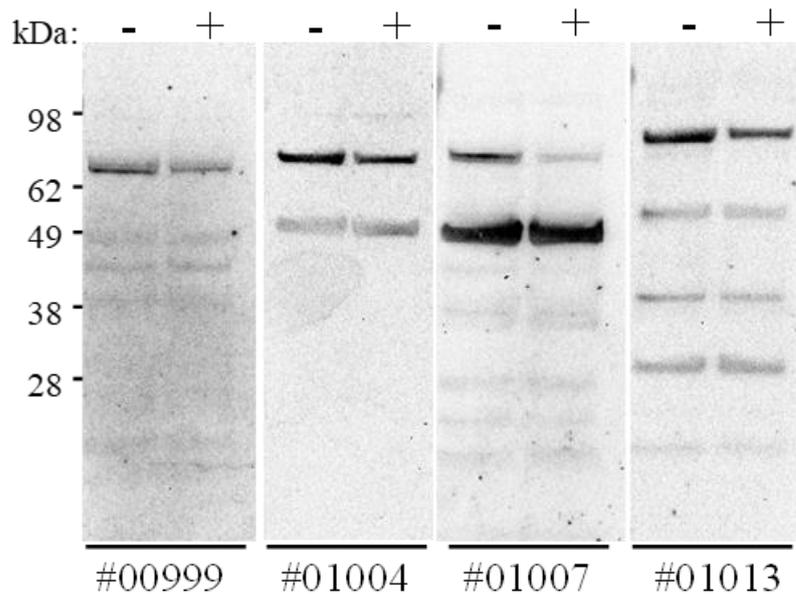


Figure 101 : Séra immun de lapin immunés avec les peptides immunogènes de MONDOA poulet. **A.** Séquences des deux peptides immunogènes de MONDOA poulet. **B.** Etude par *western blotting* de différents séra immun de lapin immunisés avec les peptides immunogènes de MONDOA de poulet. kDa : kilodalton; - : cellules COS-1 transfectées avec le plasmide contrôle pcDNA3, + : cellules transfectées avec le plasmide pcDNA3-chicken MONDOA.

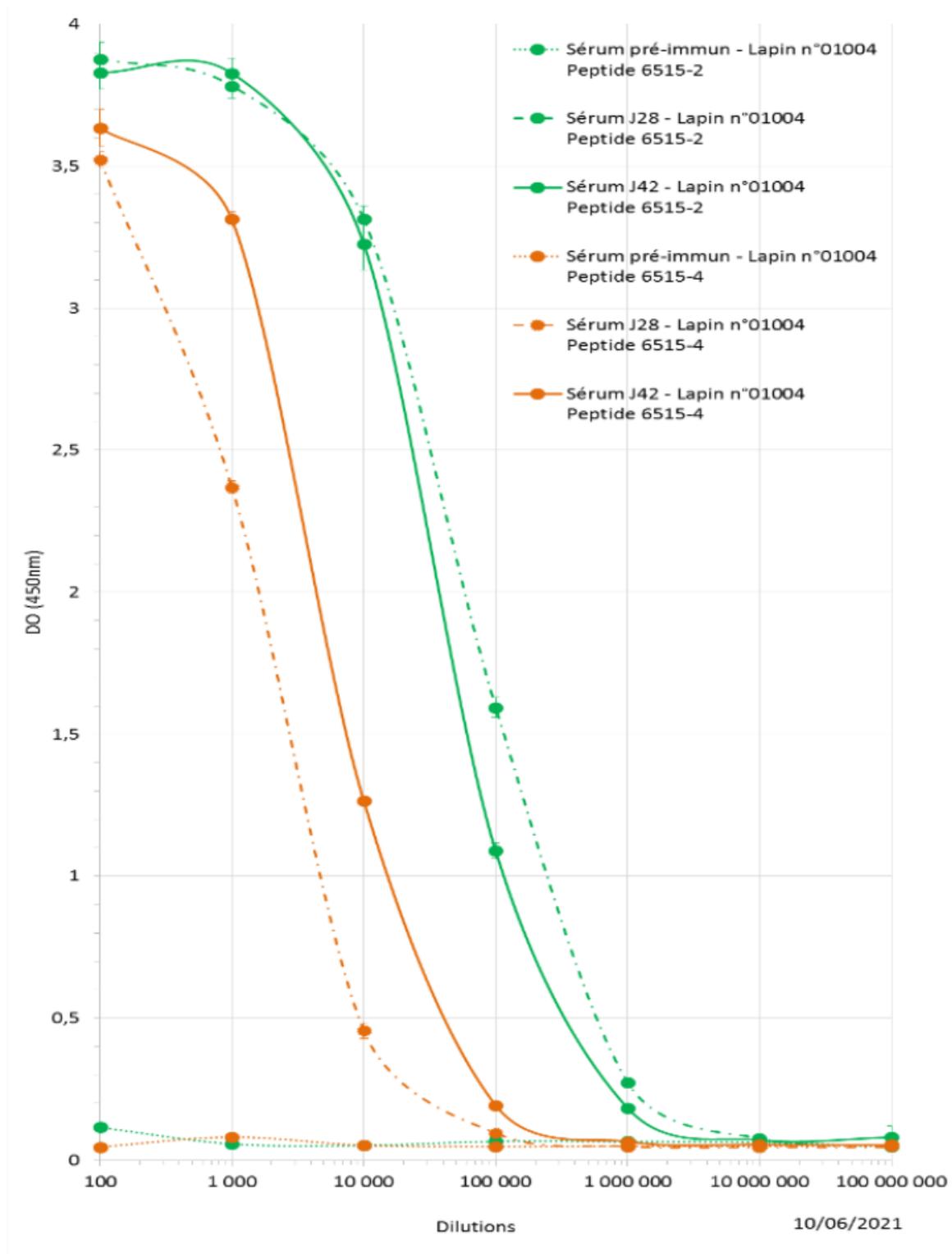


Figure 102 : Evaluation des titres sériques par ELISA indirect sur coating peptides libres pour le lapin # 01004 immunisé avec les deux peptides immunogènes de MONDOA : 6515-2 et 6515-02. 6515-02 = HSGHFMVSSPHSEHPPKKG et 6515-4 = IVIREYHKWRTYFKRLQK).

A. TIM23

Humain MEGGG-NTTKGSGLGGLFGAGGAGYSHADLAGVPLTGMSPLSPYLNLDPKYLVQDTDEF 59
Poulet MEGGGGSGNKTTGGLAGFFGAGGAGYSHADLAGVPLTGMNPLSPYLNVDPRYLVQDTDEF 60
*******.*:*****.*****:*.*****

Humain ILPTGANKTRGRFELAFFTIGGCCMTGAAFGALNGLRLGLKETQNMASKPRNVQILNMV 119
Poulet ILPTGANKTRGRFELAFFTIGGCCMTGAAFGAMNGLRLGLKETQNMASKPRNVQILNMV 120
*****:*****

Humain TRQGalWANTLGSLALLYSAFGVVIKTRGAEDDLNTIAAGTLTGMLYKSTGGVIRGIARG 179
Poulet TRQGalWANTLGSLALLYSAFGVIKTRGAEDDLNTVAAGTMTGMLYKCTGGLRGIARG 180
*****:*****:***:*****.***:*****

Humain GIAGLTLTGLYALYNNWEHMKGSIARQSL 208
Poulet GLTGLTLTSLYALYNNWEHMKGSLQQL 209
::*****.*****: :***

B. TBP

Humain MDQNNSLPPYAQGLASPQGAMTPGIPIFS PMMPYGTGLTPQPIQNTNSLSILEEQRRQQ 60
Poulet MDQNNSLPPYAQGLASPQGAMTPGIPIFS PMMPYGTGLTPQPVQSTNSLSILEEQRRQQ 60
*****:*.*****

Humain QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQAVAAAQVQSTSQATQGTSGQAPQ 120
Poulet QQQ-----AAQSSTSQATQGTSGQTPQ 83
*** *.*.*****:***

Humain LFHSQTLTAPLPGTTPLYPSFMTPTPITPATPASESSGIVPQLQNIIVSTVNLGCKLDL 180
Poulet LFHSQTLTAPLPGTTPLYPSFMTPTPITPATPASESSGIVPQLQNIIVSTVNLGCKLDL 143

Humain KTIALRARNAEYNPKRFAAVIMRIREPRTTALIFSSGKMVCTGAKSEEQSR LAARKYARV 240
Poulet KTIALRARNAEYNPKRFAAVIMRIREPRTTALIFSSGKMVCTGAKSEEQSR LAARKYARV 203

Humain VQKLGFPKFLDFKIQNMVGS CDVKFPIRLEGLVLTHQQFSSYEPELFPGLIYRMIKPRI 300
Poulet VQKLGFPKFLDFKIQNMVGS CDVKFPIRLEGLVLTHQQFSSYEPELFPGLIYRMIKPRI 263

Humain VLLIFVSGKVLTGAKVRAEIEAFENIYPILKGFRTT 339
Poulet VLLIFVSGKVLTGAKVRAEIEAFENIYPILKGFRTT 302

Figure 103 : Alignement de séquence protéiques de TIM23 et TBP humaine et poulet. A. Alignement de séquence de la protéine humaine mitochondriale TIM23 avec la protéine TIM23 chez le poulet. **B.** Alignement de séquence de la protéine nucléaire humaine TBP avec la protéine TBP chez le poulet. L'expansion de la séquence polyglutamine (Q) d'autres gènes est responsable chez l'homme de maladie neurodégénératives graves comme la maladie d'Huntington (Huang et al., 2019).

expérience car le sérum #01104 à 42 jours post immunisation présente bien une réactivité contre le peptide antigène 6515-02 (**Figure 102**). Anticipant un échec, nous avons inclus un tag HA à notre plasmide pcDNA3-chicken MONDOA pour pouvoir tester notre hypothèse après électroporation des cônes de poulet (Millet-Puel et al., 2021).

19.4. Etude de la translocation de MONDOA de la mitochondrie vers le noyau

J'ai mis au point avec Laurence Klipfel, un chercheur postdoctorant de l'équipe, la purification à partir de cultures de cônes d'embryons de poulet, des fractions mitochondriales et nucléaires. Nous avons utilisé deux kits commerciaux afin de séparer ces différents compartiments des cônes : le kit *Qproteome mitochondria isolation kit* (Qiagen ref : 37612) pour isoler les mitochondries et le kit *Qproteome nuclear protein kit* (Qiagen ref 37582) pour isoler les protéines nucléaires. Afin de valider le protocole par *western blotting*, nous avons utilisé des protéines spécifiques à chaque compartiment cellulaire ciblé. Pour la mitochondrie, nous avons utilisé une protéine mitochondriale : la *translocase of the inner membrane 23* (TIM23) située dans la membrane interne de la mitochondrie. Pour les noyaux, nous avons utilisé une protéine nucléaire qui est la *TATA binding protein* (TBP), qui est un facteur de transcription qui se lie spécifiquement à une séquence d'ADN appelée *TATA box*, proche du site d'initiation de la transcription. Ces deux protéines sont conservées entre le poulet et l'homme (**Figure 103**). Les premières mises au point sont encourageantes car nous sommes capables de séparer les noyaux cellulaires des cônes, des autres organites (**Figure 104A**) car nous détectons TBP dans la fraction qui correspond aux protéines nucléaires et nous avons détecté TIM23 dans la fraction qui correspond aux protéines mitochondriales (**Figure 104B**).

20. Etude mathématique de l'implication de PFKFB2 dans la direction du flux du glucose entre les photorécepteurs à bâtonnets et à cônes

Nous avons démontré que PFKFB2 est exprimé dans les cônes et pas dans les bâtonnets, mais quelle est la raison de cette différences d'expression dans les deux types de photorécepteurs ? Nous avons aussi démontré que RdCVF activait le promoteur de *PFKFB2* en

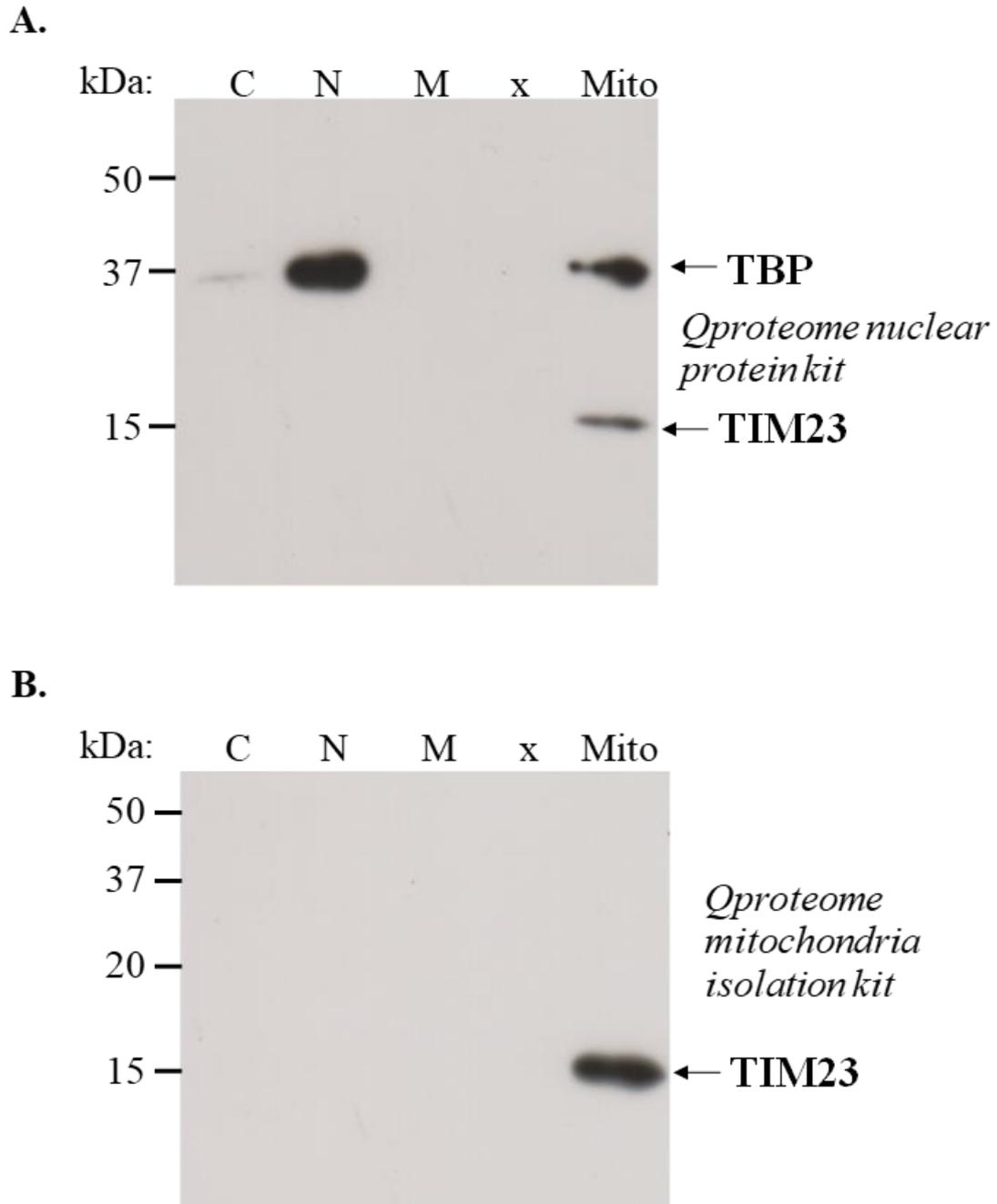


Figure 104 : Mise au point de la séparation des mitochondries et des noyaux de cônes d'embryons de poulet. **A.** Séparation des protéines nucléaires avec l'utilisation du kit *Qproteome nuclear protein kit*. Mise en évidence des protéines nucléaires par western blot avec un anticorps anti-TBP (*TATA binding protein*). **B.** Séparation des mitochondries avec l'utilisation du kit *Qproteome mitochondria kit*. Mise en évidence des protéines nucléaires par *western blotting* avec un anticorps anti-TIM23 (*translocase of the inner membrane 23*). **C** : fraction cytoplasmique ; **N** : fraction nucléaire, **M** : fraction microsomale, **Mito** : fraction mitochondriale.

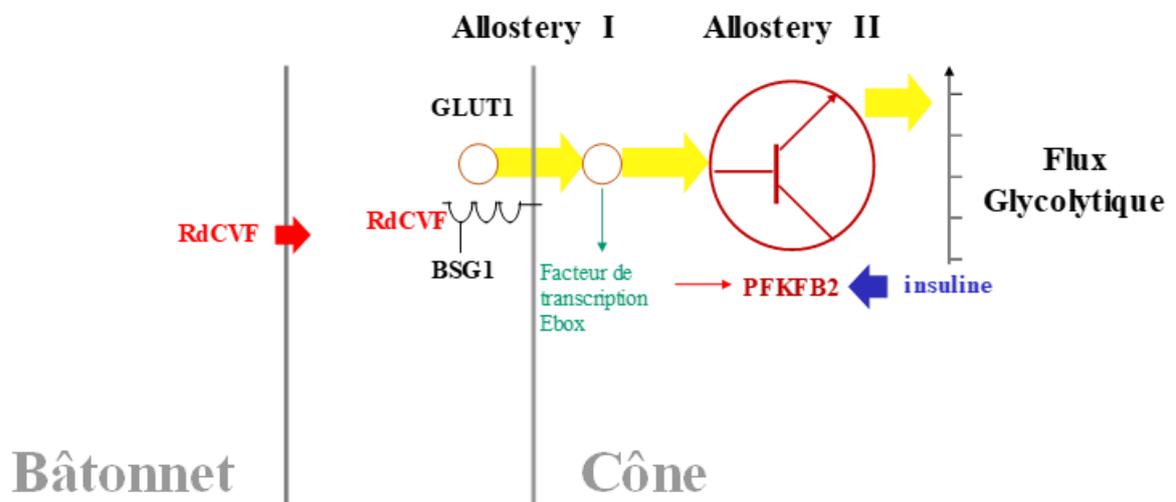
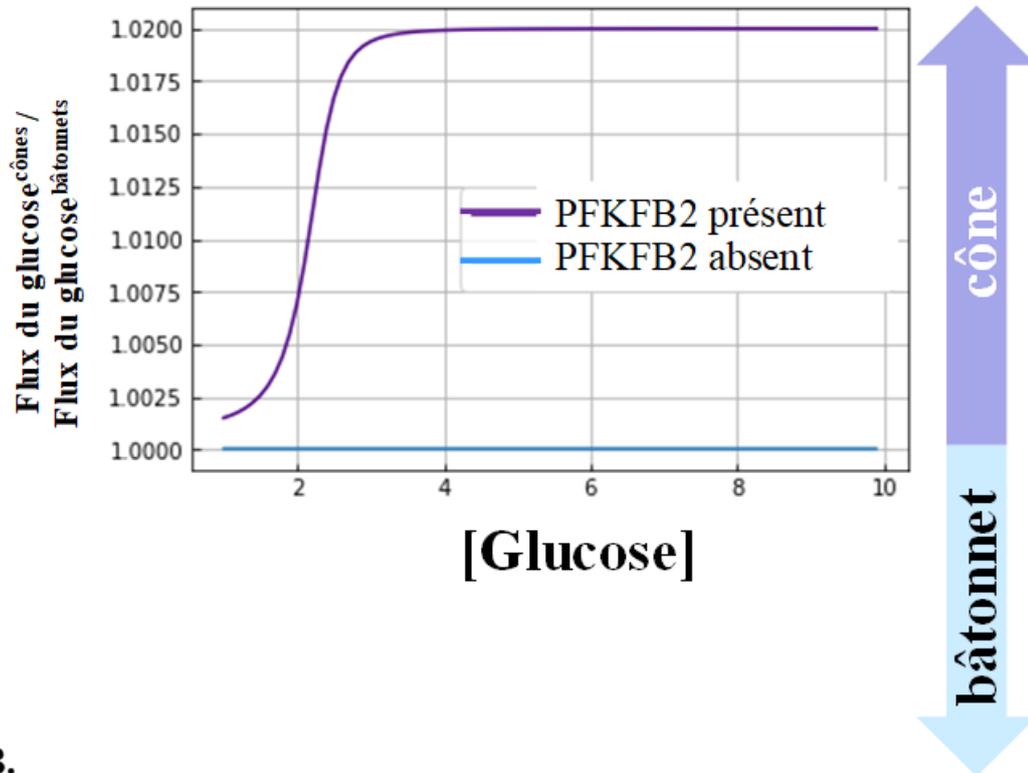


Figure 105 : PFKFB2, le transistor biologique de la signalisation de RdCVF. RdCVF: Rod derived viability factor, BSG: basigin.

favorisant l'entrée du glucose dans les cônes. Nous savons que RdCVF active la glycolyse aérobie dans les cônes afin de promouvoir le renouvellement de leurs segments externes (Ait-Ali et al., 2015). Cependant, étant donné que les segments externes des bâtonnets et des cônes sont renouvelés quotidiennement et que les bâtonnets et les cônes expriment BSG1, le récepteur de RdCVF, à leur surface (Ait-Ali et al., 2015), le modèle actuel n'explique pas de manière entièrement satisfaisante la direction de la signalisation RdCVF et du flux métabolique entre les bâtonnets et les cônes, même si RdCVF n'est exprimé que par les bâtonnets (Mei et al., 2016) (**Figure 42**). Nous n'avons jamais pu mettre en évidence que RdCVF avait un effet protecteur sur les bâtonnets, même s'ils expriment le récepteur de ce facteur trophique. Ceci s'explique en théorie par le fait que dans les modèles de RP que nous avons utilisés, les bâtonnets expriment une mutation qui entraîne leur mort par apoptose. Cet effet est très certainement dominant par rapport à une éventuelle protection via la stimulation du métabolisme du glucose des bâtonnets par RdCVF (Ait-Ali et al., 2015). Nous nous sommes donc interrogé sur l'impact de PFKFB2, vu sous le prisme d'un transistor biologique de la direction de la signalisation RdCVF (**Figure 105**). La raison d'être de RdCVF est-elle de fournir une boucle autocrine, RdCVF/BSG1, pour les bâtonnets dont profiteraient les cônes, un modèle égoïste et opportuniste. Une autre alternative est que RdCVF est sécrété par les bâtonnets exclusivement pour protéger les cônes, un modèle altruiste (Leveillard et al., 2015). Pour répondre à cette question nous avons collaboré avec Erika Camacho, biomathématicienne à Arizona State University (AZU) (Camacho et al., 2019). Erika Camacho et ses collaborateurs ont créé un modèle mathématique de RdCVF selon plusieurs situations : le cas d'un cône sain, d'un cône avec un faible apport de glucose, et d'un cône privé de RdCVF. Les trois processus clés identifiés sont le métabolisme du F16BP, la production de G3P et la compétition que les bâtonnets exercent sur l'approvisionnement en ressources des cônes. Les deux premiers processus sont proportionnels à la répartition du flux de carbone entre la glycolyse (**Figure 19**) et la voie des pentoses phosphates (**Figure 31**) ou la voie de Kennedy (**Figure 24**), respectivement. Le dernier processus est la compétition des bâtonnets pour le glucose, ce qui peut expliquer pourquoi les bâtonnets fournissent RdCVF pour compenser cette compétition. (Camacho et al., 2019). Afin d'élucider le rôle de PFKFB2 dans ce modèle, Erika Camacho a construit un modèle mathématique de PFKFB2, pris en compte comme une kinase (PFKFB2^{KD}) exprimée uniquement par les cônes. Le modèle mathématique est basé sur l'utilisation de l'équation de Michaelis-Menten qui définit les paramètres d'une réaction enzymatique en prenant en compte la concentration du substrat, la vitesse maximale (V_{max}) de la réaction et la constante de Michaelis (K_M) de l'enzyme. La glycolyse est donc modélisée comme une suite

A.



B.

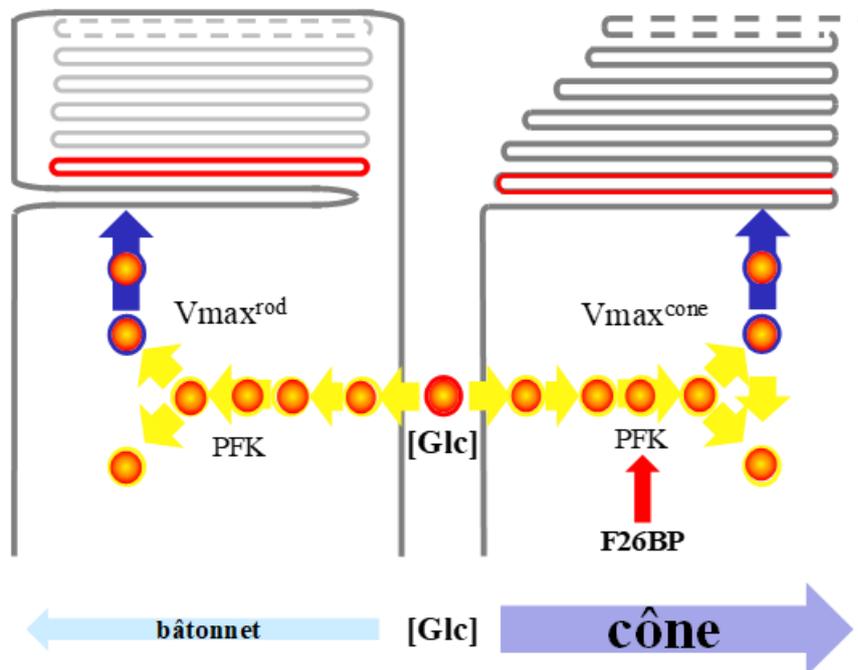


Figure 106 : Modèle mathématique de l'implication de PFKFB2 dans la direction du flux du glucose entre les photorécepteurs à bâtonnets et à cônes. A. Représentation mathématique simplifiée de l'importance de PFKFB2 dans le flux glycolytique. **B.** Modèle simplifié de l'implication de PFKFB2 dans le flux glycolytique entre les cônes et les bâtonnets.

d'équations différentielles qu'il est très difficile de maîtriser pour des non-mathématiciens (**Annexe 2**). *In fine*, ce modèle indique que le flux du glucose vers les cônes est supérieur au flux du glucose vers les bâtonnets du fait de l'accélération du flux glycolytique par l'activité kinase de PKFFB2 en présence d'insuline (**Figure 106A**). PFKFB2 est l'élément clé qui définit la direction du flux métabolique entre les bâtonnets et les cônes car $V_{\max}^{\text{cône}}$ est supérieur à $V_{\max}^{\text{bâtonnet}}$ pour la réaction $F6P \rightarrow F26BP$ (**Figure 106B**). Ceci indique donc que l'interaction entre les bâtonnets et les cônes est altruiste.

Nous avons enrichi notre modèle de l'interaction entre les bâtonnets et les cônes (**Figure 107**) et le manuscrit de ces travaux sera soumis lorsque nous aurons exécuté avec le concours de mes collègues les derniers travaux (**Figures 77, 79 et 100**).

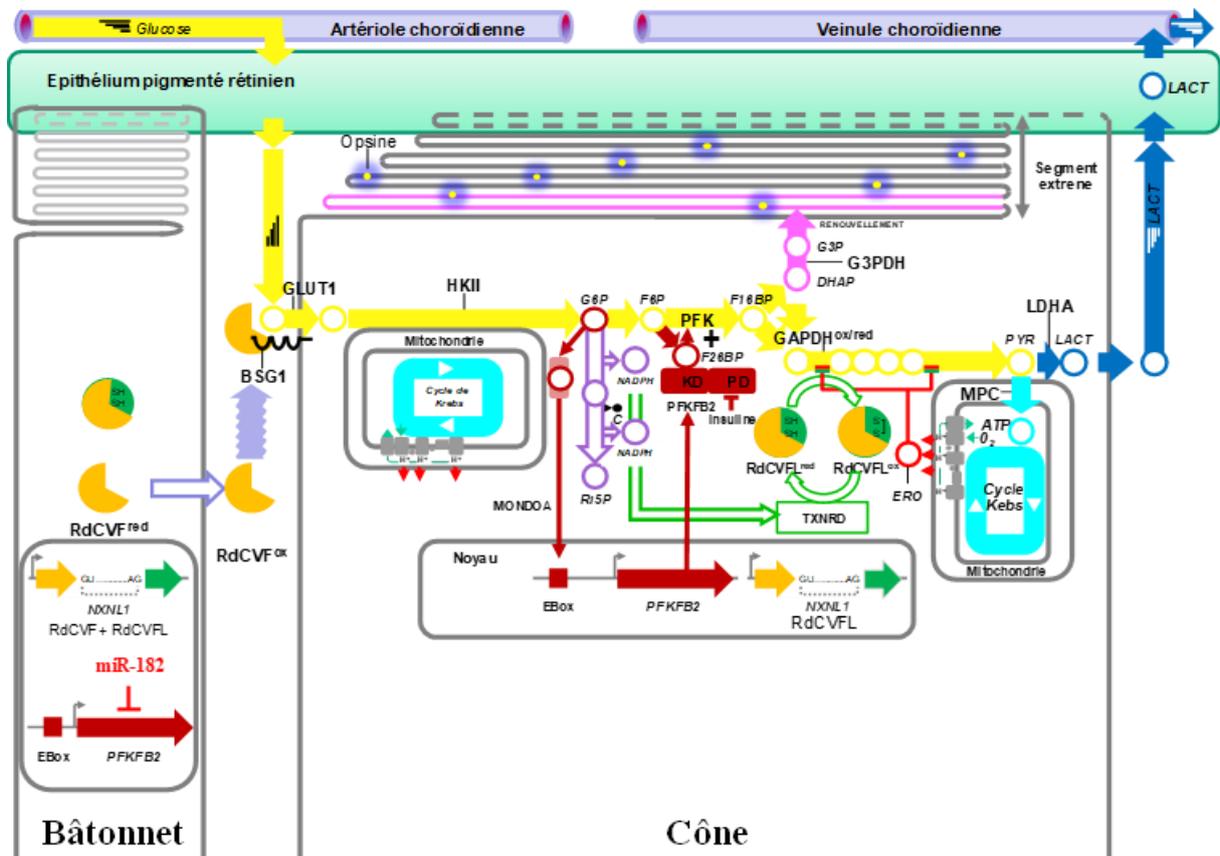


Figure 107 : Modèle de l'interaction entre les bâtonnets et les cônes. RdCVF : rod derived cone viability factor, RdCVFL : RdCVF : rod derived cone viability factor forme longue, BSG1: Basigin 1, HKII: hékokinase II, G6P: glucose 6 phosphate, PFK: phosphofruktokinase, F6P : fructose-6-phosphate, F16BP: fructose 1-6 biphosphate, F26BP: fructose 2-6 biphosphate, PFKFB2 : 6-phosphofructo-2 kinase/fructose 2-6 biphosphatase 2, KD: domaine kinase, PD : phosphatase domaine, G3P: glycérol-3-phosphate, DHAP: Dihydroxyacétone phosphate, G3PDH: Glycérol-3-phosphate déshydrogénase, GAP: glyceraldéhyde 3-phosphate, GAPDH: glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, PK: pyruvate kinase, PYR: pyruvate, LDHA: lactate déshydrogénase A, LACT: lactate, MPC: mitochondrial pyruvate carrier, ATP: adénosine triphosphate, ERO: espèces réactives de l'oxygène, NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide Phosphate forme réduite, 6PG: 6-phosphogluconate, Ri5P: Ribose-5-phosphate, TXNRD : Thiorédoxine réductase, ox : oxydé, red : réduit.

DISCUSSION

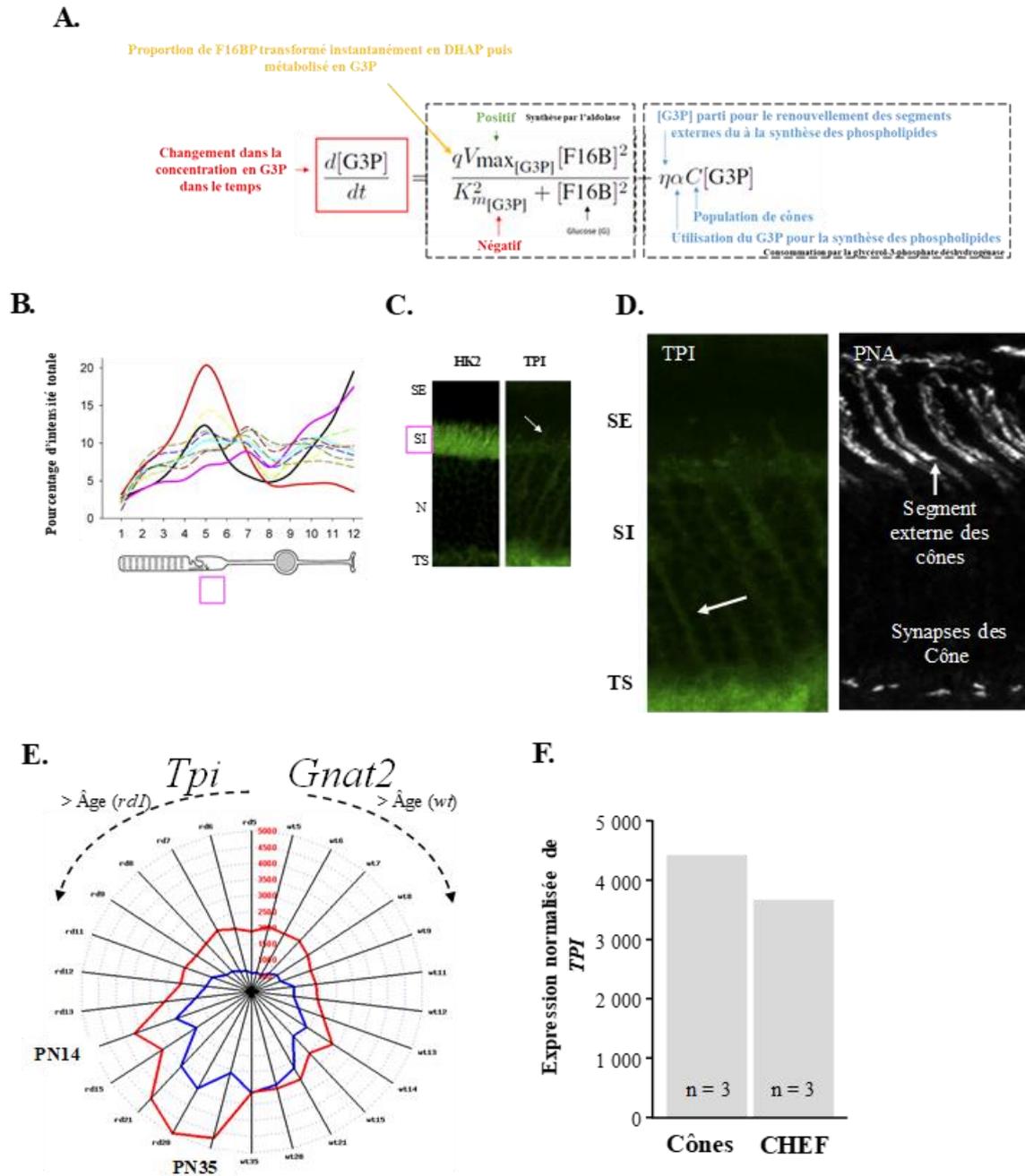


Figure 108 : Triose phosphate isomérase (TPI). **A.** Équation différentielle de la production de glyceraldeyde-3-phosphate (G3P) par la glycolyse. **B.** Analyse protéomique quantitative de la rétine de souris. **C.** Analyse immunohistochimique de l'expression de TPI dans la rétine de souris. **D.** Agrandissement de la région indiquée par une flèche blanche. **E.** Expression des ARNm de *Tpi* et de *Gnat2* dans les rétines de souris sauvage et *rd1* de PN5 à PN35. **F.** Expression de TPI dans une culture enrichie en cônes et de fibroblastes embryonnaire de poulet. CHEF : *chicken embryonic fibroblasts*, PNA : *Peanut Agglutinin*, HK : hexokinase, SE : segments externes, SI : segments internes, N : noyau, TS : terminaisons synaptiques.

DISCUSSION

1. TPI

En examinant la conséquence biologique de ce modèle, nous avons découvert un effet mathématique de l'interaction entre les bâtonnets et les cônes. Le dihydroxyacétone phosphate (DHAP), produit par la glycolyse, fournit des triglycérides via le glycérol-3-phosphate (G3P), les précurseurs des phospholipides nécessaires au renouvellement du segment externe (**Figure 24**). Une partie du fructose-1,6-biphosphate (F16BP), q , est convertie du DHAP en G3P et la partie restante du F16BP, $(1 - q)$, est reconvertie du DHAP en glyceraldehyde-3-phosphate (GAP), rejoignant ainsi le flux de la glycolyse. L'aldolase divise une molécule de F16BP à 6 carbones en deux molécules à 3 carbones : GAP et DHAP. Le GAP est entièrement converti en lactate et en CO_2 par la glycolyse aérobie (**Figure 19**) et la phosphorylation oxydative mitochondriale (**Figures 27 et 28**), tandis qu'une partie du DHAP est utilisée pour produire du G3P et, par conséquent, pour le renouvellement du segment externe du cône (**Figure 21**). Dans l'équation de la production du G3P (**Figure 108A**), q est la proportion de DHAP converti en G3P qui est proportionnel à l'activité de V_{max} et K_{m} de la triose phosphate isomérase (TPI). De façon frappante, les bâtonnets de la rétine de la souris n'expriment pas le TPI (Reidel et al., 2011) comme le montre une analyse protéomique (**Figure 108B**), confirmée par immunohistochimie (**Figure 108C**). Dans cette image, le faible marquage radial pourrait correspondre à l'expression du TPI par les cônes. L'ARNm de TPI de souris ne contient pas de séquence cible miR-182, de sorte que l'absence de son expression dans les bâtonnets (97% des photorécepteurs de la couche externe de la rétine, segments externes + segments internes) ne devrait pas résulter du silençage du gène. À plus fort grossissement, le faible marquage pointé par une flèche blanche suggère que la TPI est exprimée par les cônes (3% des photorécepteurs de la couche externe de la rétine), car il co-localise avec le marquage PNA, un marqueur de la matrice externe entourant les cônes (**Figure 108D**). Cette observation est corroborée par le fait que l'ARNm de TPI dans la rétine de souris présente un profil d'expression du type *cone like* (ou *Rolling stones*) observé dans le transcriptome rétinien de la souris *rd1* (**Figure 108E**). Nous observons dans la rétine de souris *rd1* une augmentation entre PN14 et PN35 des ARNm de *Tpi* et de la transducine $\alpha 2$ (*Gnat2*), qui est exprimée spécifiquement par les cônes. Au cours de la

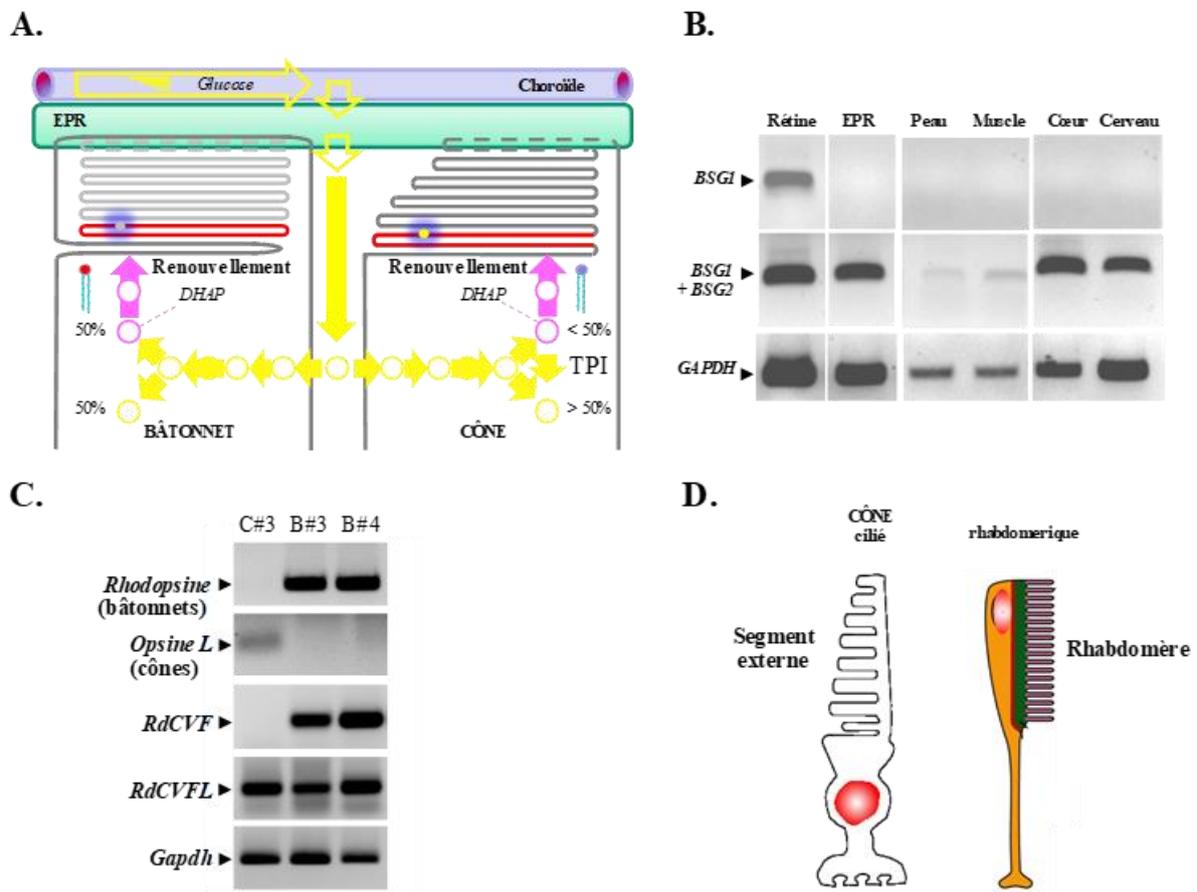


Figure 109 : L'origine de la signalisation métabolique des RdCVF. **A.** Modèle de l'avantage métabolique des bâtonnets sur les cônes dans le renouvellement de leurs segments externes. **B.** Expression de BSG1, le récepteur de surface cellulaire de RdCVF et de la protéine chaperonne BSG2 dans la rétine de la lamproie. **C.** Expression de RdCVF et RdCVFL par les bâtonnets et RdCVFL par les cônes de la lamproie. **D.** Cônes ciliés des mammifères et photorécepteurs rhabdomériques des insectes. EPR : épithélium pigmentaire rétinien, TPI : triose phosphate isomérase, GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, DHAP : Dihydroxyacétone phosphate, C : cône, B : bâtonnet.

dégénérescences des bâtonnets (PN14-35), la proportion d'ARNm spécifiques des cônes augmente (Blond and Leveillard, 2019). L'ARNm de TPI est également exprimé par les cônes issus de culture enrichie en cônes produites à partir de la rétine d'embryons de poulet (Millet-Puel et al., 2021) (**Figure 108F**). L'expression de TPI par les cônes et son absence dans les bâtonnets ont une implication profonde dans la nature de l'interaction entre les deux types de photorécepteurs. L'absence de TPI dans les cônes signifie que les bâtonnets ont un avantage sur les cônes concernant l'utilisation de ce métabolite du glucose, le DHAP pour le renouvellement du segment externe (Leveillard and Sahel, 2017) (**Figure 109A**). Mathématiquement, dans une compétition un contre un pour l'utilisation d'une molécule de glucose issue du sang et transporté à travers le RPE, la proportion de DHAP métabolisée en G3P est de 50% en l'absence de TPI, q égal 0 (**Figure 108A**). Pour les cônes, l'expression de TPI et son activité enzymatique imposeront $q > 0$, et par conséquent, la proportion de DHAP métabolisé en G3P pour les segments externes des cônes sera $< 50\%$.

Dans un projet visant à mettre en lumière l'origine évolutive de la signalisation métabolique de RdCVF, Najate Aït-Ali a étudié l'interaction entre les bâtonnets et les cônes chez les Agnathes tels que la lamproie (*Petromyzon marinus*). Chez cette espèce, BSG1 est spécifiquement exprimé par la rétine (**Figure 109B**) et RdCVF est exprimé spécifiquement par les bâtonnets, tandis que RdCVFL est exprimé par les bâtonnets et les cônes (Ait-Ali, 2018) (**Figure 109C**), comme chez la souris (Mei et al., 2016). *In vitro*, RdCVF de la lamproie se lie à BSG1 de la lamproie (3 boucles Ig) mais pas à BSG2 (2 boucles Ig) de la lamproie (*Petromyzon marinus*). La lamproie est première espèce où les bâtonnets émergent au cours de l'évolution à partir de leurs précurseurs, les cônes, (Fain et al., 2010; Morshedian and Fain, 2015, 2017). Ainsi, une signalisation métabolique et redox fonctionnelle du gène *NXNLI* entre les bâtonnets et les cônes peut être retracée jusqu'à il y a 450 millions d'années, *terminus ante quem* l'émergence des premiers bâtonnets, à partir de leurs ancêtres, les cônes. Najate a découvert que l'épissage alternatif produit des protéines de type RdCVF chez des animaux plus anciens comme *Hydra vulgaris*, mais c'est l'émergence d'un domaine Ig0 fonctionnel de BSG1 qui est à l'origine de la signalisation RdCVF au cours de l'évolution (Leveillard and Ait-Ali, 2017). La vision à forte acuité est assurée par les cônes, qui sont des photorécepteurs ciliés, ou par des photorécepteurs rhabdomériques (Veraszto et al., 2018) (**Figure 109D**). Certaines espèces possèdent à la fois des photorécepteurs ciliés et rhabdomériques comme la coquille Saint-Jacques (*Patinopecten yessoensis*) (Palmer et al., 2017) et l'amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*) (Pergner and Kozmik, 2017). Ces espèces ont une signalisation RdCVF.

fonctionnelle (Ait-Ali, 2018). Tous les génomes d'insectes, comme celui de *Drosophila megalomasters*, ne possèdent pas de gène *NXNL* (Chalmel et al., 2007; Funato and Miki, 2007)

Les rhabdomères ne se renouvellent pas quotidiennement comme les segments externes des photorécepteurs ciliés. *Drosophila megalomasters* n'a pas de photorécepteurs ciliés, elle les a perdus au cours de l'évolution (Claude Desplan, communication personnelle). Les cônes des mammifères nécessitent plus d'ATP que les bâtonnets (Ingram et al., 2020). Les bâtonnets ont émergés des cônes plus ancestraux, résultant en une économie énergétique (Ingram et al., 2016) qui a pris naissance en même temps que la diversification de l'utilisation du glucose dans le processus de céphalisation des poissons sans mâchoire, les Agnathes (Okawa et al., 2008). La lamproie possède un nombre égal de bâtonnets et de cônes de sorte que la compétition du glucose se fait un contre un et donc que l'existence de la signalisation métabolique RdCVF ne peut être attribuée à la prédominance des bâtonnets chez la plupart des espèces de mammifères (Peichl, 2005). L'avantage bioénergétique des bâtonnets sur les cônes pourrait conduire à une situation extrême où les cônes seraient entièrement convertis en bâtonnets au cours de l'évolution. Mais, compte tenu de l'importance de la vision des couleurs dans la vie d'un animal, les bâtonnets ont acquis un mécanisme compensatoire pour préserver la vision des couleurs et l'acuité visuelle en alimentant les cônes de manière altruiste (Perini et al., 2009).

Notre modèle de travail est que l'avantage compétitif des bâtonnets qui n'expriment pas TPI par rapport aux cônes est compensé par les bâtonnets qui fournissent un signal (RdCVF) qui accélère l'entrée du glucose (GLUT1) et la glycolyse (PFKFB2) et constitue la raison d'être de l'interaction entre les deux classes de photorécepteurs. La signalisation métabolique et redox de *NXNLI* a été recrutée il y a 450 millions d'années pour l'interaction entre les bâtonnets et les cônes. Aujourd'hui, les patients atteints de RP perdent la vision centrale en raison de l'interruption de la signalisation métabolique et redox de *NXNLI* entre les bâtonnets et les cônes. L'administration des deux produits du gène *NXNLI* fournira une thérapie indépendante de la cause génétique de cette maladie cécitante (Clerin et al., 2020). Le travail d'investigation sur l'implication de TPI dans ce modèle sera réalisé par moi-même avec Erika Camacho, notre collaboratrice mathématicienne, qui sera à l'Institut de la Vision pour une année sabbatique d'août 2022 à Juillet 2023, en formation expérimentale afin d'appréhender les méthodes d'obtention de toutes les données qu'elle traite mathématiquement.

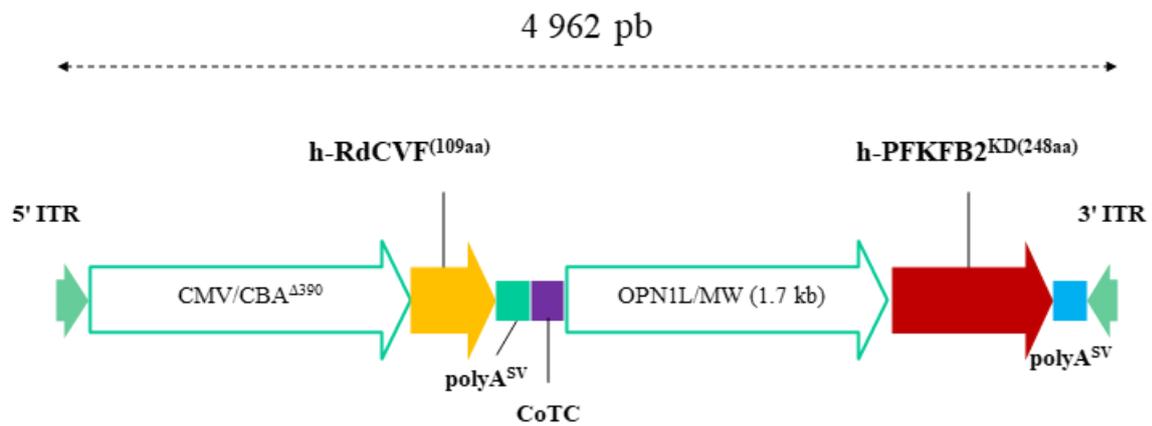


Figure 110 : Vecteur viral AAV2-CMV/CBA^{Δ390}-RdCVF^(109aa)-OPN1L/MW^{1.7kb}-PFKFB2^{KD(248aa)}. ITR : *Inverted Terminal Repeat Sequences*, CMV : cytomegalovirus, CBA : *chicken β-actin*, OPN1/MW : opsin 1, medium wave sensitive, CoTC : *Co-Transcriptional Cleavage*.

2. Renouvellement des segments externes

RdCVF agit sur la cinétique du transporteur de glucose GLUT1 de manière non autonome et RdCVFL répare les dommages de la S-oxydation des protéines des photorécepteurs (**Figure 33**). En d'autres termes, RdCVF prévient la perte de fonction des cônes et RdCVFL prévient la mort cellulaire des cônes (**Figures 40, 42 et 43**). Considérant que dans la RP, les cônes non fonctionnels persistent pendant des années, une observation qui est probablement liée à la concentration locale des cônes dans la fovéa des primates, la logique est de combiner les activités allostériques du RdCVF et du domaine kinase du PFKFB2 sur l'accélération du flux glycolytique dans les cônes (**Figure 105**). Théoriquement, une stimulation accrue de la glycolyse aérobie par les deux transgènes combinés pourrait restaurer les segments externes des cônes et la vision centrale des patients atteints de RP. Pour tester cette hypothèse, nous avons mise en place une collaboration internationale à laquelle je participe. Nous produisons un seul vecteur viral combiné : AAV2-CMV/CBA^{Δ390}-RdCVF^(109aa)-OPN1L/MW^{1.7kb}-PFKFB2^{KD(248aa)} (**Figure 110**) par ultracentrifugation au chlorure de césium (CsCl). Cette production sera assurée par le laboratoire de Jane Farrar au *Trinity College* à Dublin. Le contrôle positif aura la même structure que le vecteur à tester, sauf qu'à la place de PFKFB2^{KD}, nous mettrons RdCVFL(212aa) (Clérin et al., ARVO 2021) (**Figure 43**). Ce vecteur de thérapie génique sera évalué dans deux modèles de RP, la souris *rd10* et un nouveau modèle de RP autosomique dominante, le cochon nain *RHO*^{P347L/+} construit avec une subvention de la fondation maladies rares. La mutation du gène *RHO* la plus répandue chez les patients atteints de RP autosomique dominante aux États-Unis est la mutation P23H mais en Europe c'est la mutation P347L qui est la plus prévalente. La perte de visions chez les patients atteints de RP est plus sévère pour la mutation P347L que pour la mutation P23H (Bonilha et al., 2015). Cette thérapie conduirait à la restauration de la vision centrale chez de nombreux patients atteints de RP dont les cônes non fonctionnels survivent sans segments externes (Busskamp et al., 2010). Les modèles de RP chez les rongeurs ne sont pas compatibles avec cet objectif car la perte de fonction des cônes est suivie trop rapidement de leur mort. Dans un modèle de RP chez le porc transgénique (*RHO*^{P23H}), les bâtonnets dégèrent rapidement et les segments externes des cônes raccourcissent en quelques semaines, mais les corps cellulaires des cônes sont maintenus pendant au moins quatre ans (Ross et al., 2012). Compte tenu de cette observation, nous avons construit avec Eckhard Wolf de l'Université Ludwig-Maximilians en Allemagne, un nouveau modèle de RP dominante en éditant le génome du mini-porc de Göttingen. Après avoir

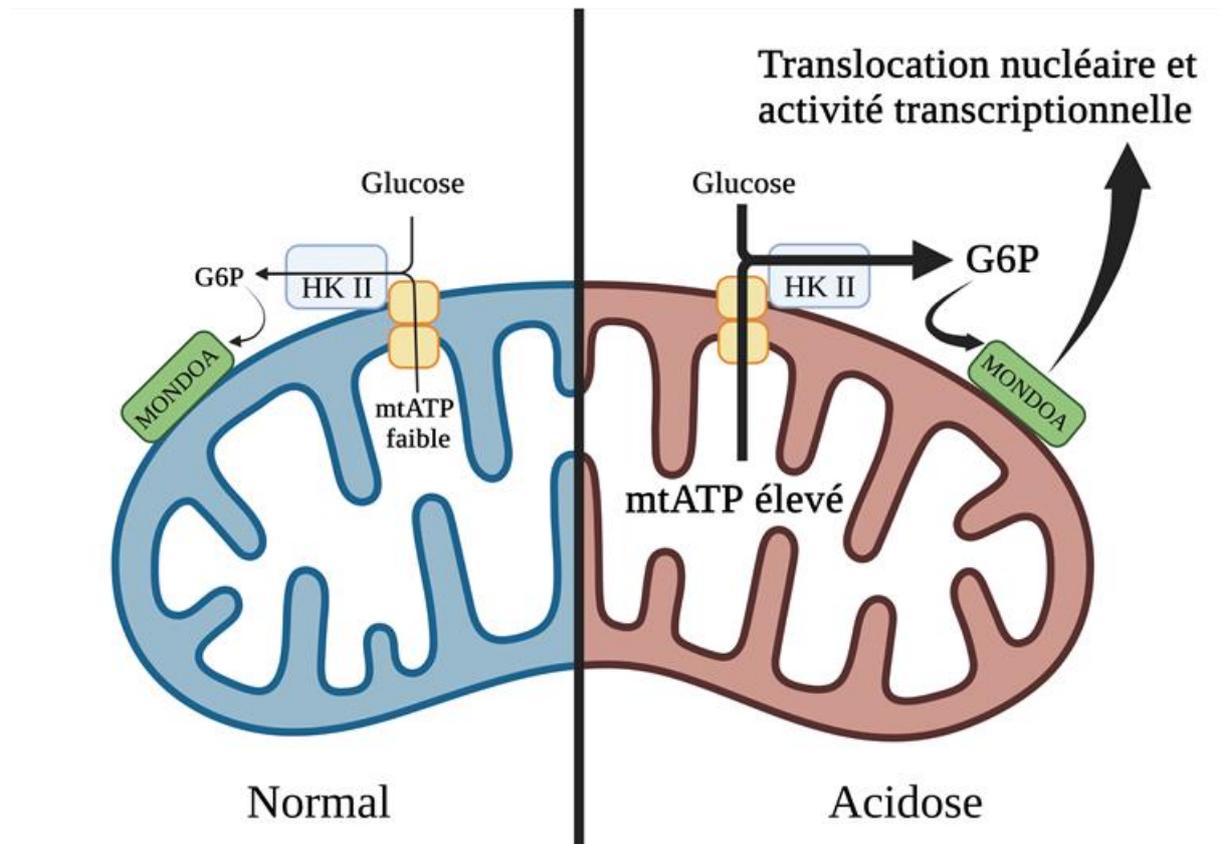


Figure 111 : Translocation de MONDOA de la membrane mitochondriale vers le noyau en condition d'acidose. G6P : glucose-6-phosphate, HKII : hexokinase II, mtATP : ATP mitochondrial (Wilde et al., 2019).

standardisé les paramètres de dégénérescence des photorécepteurs du cochon nain hétérozygote $RHO^{P347L/+}$ (Tso et al., 1997), nous testerons la combinaison RdCVF + PFKB2^{KD} pour leur capacité à prévenir la perte de fonction des cônes dans ce modèle. Nous traiterons ensuite des cochons nains $RHO^{P347L/+}$ aveugles pour tester la restauration de la vision des cônes par la repousse de leurs segments externes. Un avantage supplémentaire des cochons est que, contrairement aux rongeurs, ils ont une proportion élevée de cônes dans une région appelée *area centralis*, ce qui facilitera les analyses biochimiques pour étudier les mécanismes sous-jacents (Hendrickson and Hicks, 2002).

3. Geralexin

Il est établi par de nombreuses études que les acétogénines neurotoxiques agissent sur le complexe I de la mitochondrie (Zafra-Polo et al., 1996). La particularité des acétogénines est la présence d'un noyau lactone, or la structure chimique de Geralexin diffère de par son hétérocycle lactone ouvert contrairement aux autres acétogénines pour lesquelles il est cyclisé. Une étude montre que MONDOA requière le glucose, ainsi que d'autres signaux modulateurs pour activer la transcription (**Figure 95**). L'un de ces signaux est l'acidose, qui augmente l'activité de MONDOA. En milieu acide, la production d'ATP mitochondrial augmente et celui-ci est ensuite exporté de la mitochondrie vers la matrice mitochondriale. L'hexokinase liée à la mitochondrie transfère un groupement phosphate de cet ATP au glucose cytoplasmique pour produire du glucose-6-phosphate (G6P) (**Figure 19**), qui est un activateur de MONDOA. La localisation à la membrane mitochondriale externe de MONDOA suggère que ce facteur de transcription est positionné ainsi pour coordonner la réponse transcriptionnelle adaptée aux sources d'énergie les plus abondantes de la cellule, le glucose cytoplasmique et l'ATP produit par la mitochondrie (**Figure 28**). L'hexokinase 2 (HKII) est aussi localisée sur la surface extérieure de la mitochondrie (Stoltzman et al., 2008). MONDOA utilise G6P produits par HKII, mais son décrochage de la membrane externe de la mitochondrie a lieu si la mitochondrie contient beaucoup d'ATP (Wilde et al., 2019) (**Figure 111**). Nous proposons une hypothèse raisonnable pour expliquer l'absence de neurotoxicité de Geralexin. Geralexin agit bien sur la chaîne mitochondriale, mais l'absence de noyau lactone cyclisé entraîne non pas un blocage du flux des électrons dans le complexe I, mais son accélération puisque les acétogénines interagissent avec ND1 qui régule le flux des électrons qui réduisent l'ubiquinone (**Figure 112**). Dans ce cas, la mitochondrie produit plus d'ATP ce qui conduit le décrochage de MONDOA

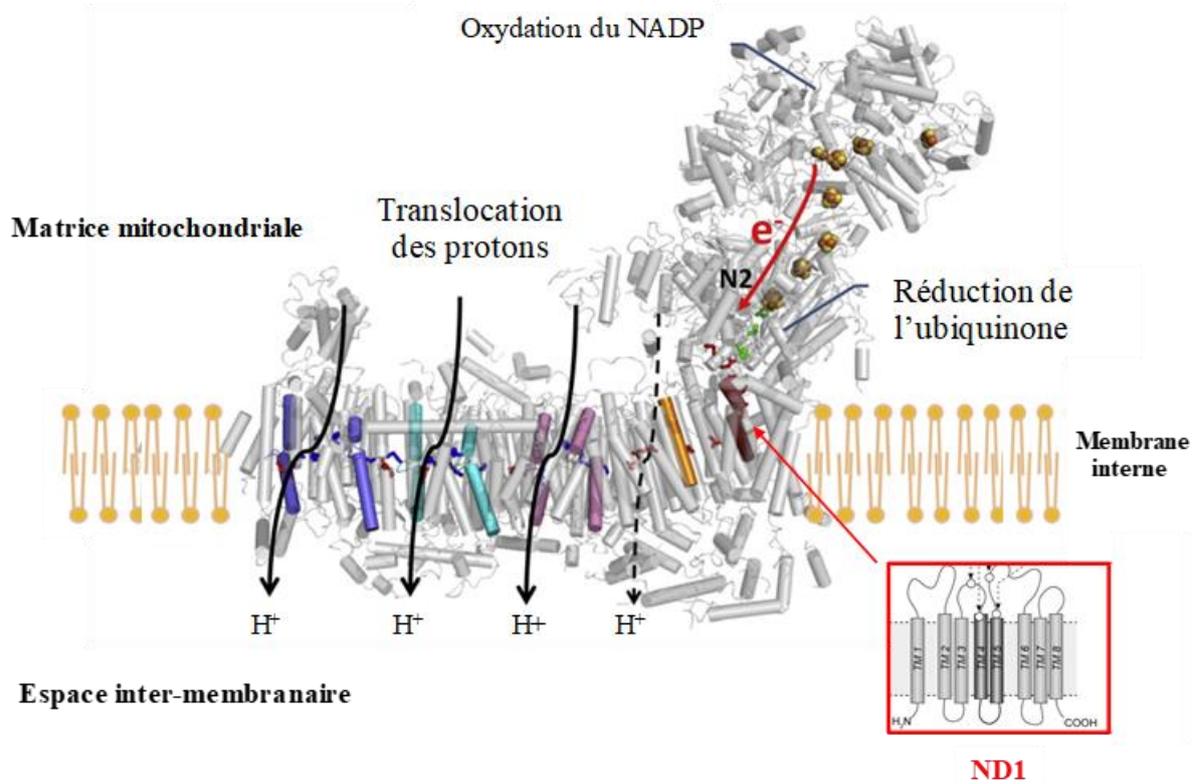


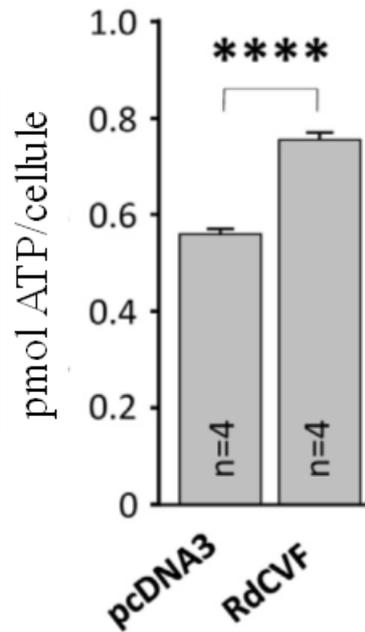
Figure 112 : Complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale ou NADH déshydrogénase. La protéine ND1 (*NADH-ubiquinone oxydoréductase chain 1*) est la sous-unité de la NADH déshydrogénase qui est située dans la membrane interne de la mitochondrie, la cible des acétogénines. Le complexe I est le plus grand des cinq complexes de la chaîne de transport des électrons.

qui stimule la glycolyse via son action sur l'expression de *PFKFB2* par les cônes. Pour ce qui concerne le mécanisme d'action de RdCVF, il n'est pas inconcevable que l'ATP produit par la mitochondrie soit aussi impliqué. En effet, nous avons montré que RdCVF stimule la production d'ATP (**Figure 113A**) (Ait-Ali et al., 2015). Néanmoins, nous avons également démontré que le blocage de la phosphorylation oxydative n'avait aucun impact sur l'effet protecteur de RdCVF (**Figure 113B**). Ceci est une contradiction avec le mécanisme proposé. Dans l'état actuel de nos connaissances, ce paradoxe ne peut être résolu que par un approvisionnement en Geralexin qui nous permettra d'aborder les faits expérimentalement.

Pour ce faire nous allons produire Geralexin, avec l'aide de nos collaborateurs de la société GreenPharma. A plus long terme, une molécule Geralexin sera synthétisée *de novo*, une réalisation majeure pour son transfert vers la clinique. De nombreux rapports sur la synthèse *de novo* d'acétogénines plaident pour une faisabilité de cette synthèse (Li et al., 2008). La structure de Geralexin a été résolue en utilisant la RMN à 700 MHz et le fractionnement MS. La synthèse *de novo* de Geralexin est réalisable. L'analyse rétrosynthétique montre deux synthons au sein de la Geralexin qui peuvent être synthétisés à l'aide de chimie conventionnelle et réassemblés. Nous testerons l'activité des molécules synthétisées en utilisant les cultures enrichies en cônes provenant de la rétine d'embryons de poulet (Leveillard et al., 2004; Millet-Puel et al., 2021).

Notre objectif est de développer un traitement pharmacologique de la DMLA. La thérapie génique est très appropriée pour les dégénérescences rétiniennes héréditaires, tandis que les petites molécules peuvent s'appliquer parfaitement à la DMLA puisque le traitement peut être interrompu s'il n'est pas bénéfique. La DMLA est une maladie à génétique complexe avec seulement des allèles de susceptibilité, pas de gènes à très forte pénétrance. Comme Geralexin agit sur un effecteur en aval de RdCVF, nous utiliserons la souris *rd10* pour valider le bénéfice de Geralexin pour les cônes (Byrne et al., 2015). Nous avons créé à l'aide de CRISPR-Cas9 un nouveau modèle de DMLA, la souris modèle *metabolic age-related macular degeneration* (*Slc16a8*^{MAD/MAD}), homozygote pour l'allèle à risque rs77968014G (mutation d'un site donneur d'épissage) (Fritsche et al., 2016; Klipfel et al., 2021; Leveillard et al., 2019). Il s'agit d'un modèle de déficit du transport du lactate médié par MCT3 chez l'animal homozygote, puisque les deux copies du gène sont inactivées. Léa Thiébault, étudiante en thèse dans notre équipe a montré que MCT3 n'est plus exprimé par l'épithélium pigmenté rétinien chez ce mutant. Emmanuelle Clérin, ingénieur de recherche de notre équipe, a réalisé un suivi longitudinal de la fonction des bâtonnets et des cônes de la souris *Slc16a8*^{MAD/MAD} par électrorétinographie (ERG) scotopique et photopique. Elle a aussi réalisé une analyse de

A.



B.

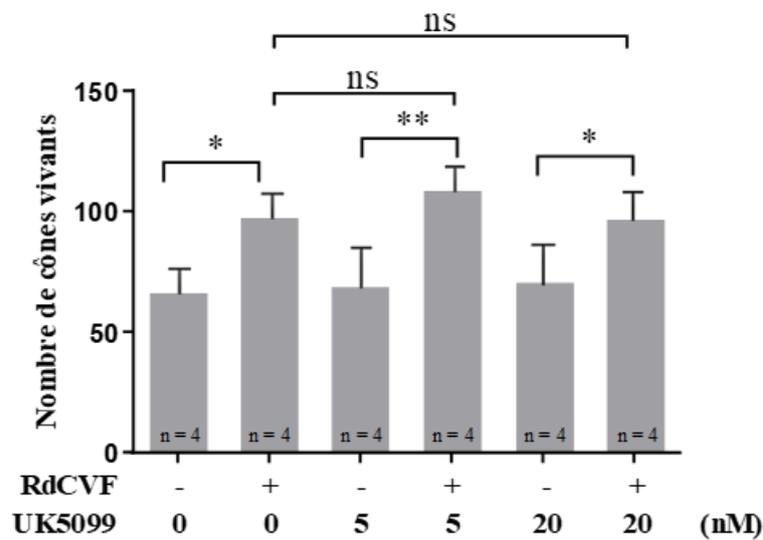


Figure 113 : Effet de RdCVF sur la glycolyse aérobie et la phosphorylation oxydative. A. Concentration d'ATP dans des extraits de culture enrichies en cônes en présence de milieux conditionnés de cellules transfectées COS-1. Test de Student, $p < 0,001$ (SD) (Ait-Ali et al., 2015). **B.** Effet de l'inhibiteur du transporteur de pyruvate mitochondrial, UK5099, sur la survie des cultures enrichies en cônes, médiée par le RdCVF. Etude statistique faite avec un one-way ANalysis Of VAriance (ANOVA), Test de Tukey comparaison multiple, * $p = 0,0123$ (SD), ** $p = 0,0013$ (SD), * $p = 0,0438$ (SD) (Ait-Ali et al., 2015).

l'épaisseur de la couche externe (97% de bâtonnets) de la rétine par tomographie en cohérence optique (OCT en Anglais) et de l'acuité visuelle avec un test qui repose sur la fonction des cônes enregistrée par le réflexe optocinétique. La souris *Slc16a8*^{MAD/MAD} présente une surcharge en lactate dans l'EPR et la rétine qui provoque une perte de fonction et une dégénérescence des bâtonnets et des cônes. La souris hétérozygote *Slc16a8*^{MAD/+} qui est un modèle plus approprié de la situation clinique, présente le même phénotype à une amplitude réduite. Geralexin sera donc administré aux souris hétérozygotes *Slc16a8*^{MAD/+} pour tester *in vivo* la protection des cônes par résolution de l'efflux du lactate (Figure 40).

MATERIELS

ET

METHODES

MATERIELS ET METHODES

1. QPCR pour analyser l'expression de gènes chez la souris

Pour analyser l'expression de gènes dans la rétine de souris, nous devons récupérer les yeux de souris par énucléation. Dans du PBS, les yeux sont dissectés de façon à récupérer que la rétine. Les rétines sont congelées immédiatement après dissection afin de préserver un maximum les ARNs. Les ARNs des rétines sont extraits avec un kit RNeasy minikit (Qiagen) et traités avec de la DNASE I (Invitrogen, ref : EN0521) avant rétrotranscription. La rétrotranscription a été faite avec le kit SuperScript II d'Invitrogen (18064014) en suivant le protocole utilisant des amorces aléatoires appelées également « *randoms primers* » (Promega ref : C1181). Nous avons mesuré le niveau de l'expression des gènes en utilisant des amorces spécifiques (**Table 4**) et en utilisant la technique de PCR en temps réel utilisant du SyberGreen (4367659). Le matériel utilisé pour cette analyse est un 7500 Fast Real Time PCR system.

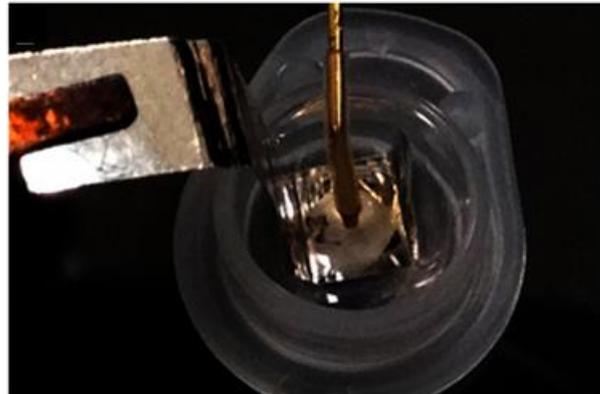
2. QPCR pour analyser l'expression normalisée de gènes dans les cônes d'embryons de poulet

Pour analyser l'expression de gènes, dans les cônes d'embryons de poulet *in vitro*, nous avons récupérés les cellules à J+4 post ensemencement et congelé immédiatement les cellules afin de préserver les ARNs. Les ARNs des cônes ont été extraits avec un kit RNeasy minikit (Qiagen) et traités avec de la DNASE I (Invitrogen, ref : EN0521) avant rétrotranscription. La rétrotranscription a été faite avec le kit SuperScript II (Invitrogen, ref : 18064014) en suivant le protocole utilisant des amorces aléatoires appelées également « *randoms primers* » (Promega, ref : C1181). Nous avons mesuré le niveau de l'expression des gènes en utilisant des amorces spécifiques (**Table 4**) et en utilisant la technique de PCR en temps réel utilisant du SyberGreen (Invitrogen, ref : 4367659). Le matériel utilisé pour cette analyse est un 7500 Fast Real Time PCR system.

3. Culture de cônes d'embryons de poulet

Cette technique a été décrite et publiée sur JOVE (Millet-Puel et al., 2021) mais en résumé, les œufs utilisés pour cette culture sont issus de poulets de la souche 667 Label Rouge de l'élevage Morizeau dans l'Eure et Loire (28). Ces œufs embryonnés sont produits de manière naturelle après ponte et maintenus jusqu'à leur utilisation à l'Institut de la Vision à Paris à 17°C (zéro biologique). Les œufs sont incubés pour 24 heures à 20°C puis 136 heures à 37°C avec réversion intermittente de l'inclinaison des œufs dans une couveuse. Après 6 jours ½ d'incubation, les embryons de poulet sont au stade 29. L'embryon est délicatement extrait de l'œuf grâce à une pince courbe, puis transféré dans une boîte de Pétri contenant du PBS préalablement chauffé à 37°C. Pour pouvoir observer correctement le stade de l'embryon, il est nécessaire d'enlever l'enveloppe qui l'entoure. Il est très important que l'embryon soit au stade 29, et non au stade 28 ou bien 30. Après avoir sélectionné les deux embryons au stade 29, ceux-ci sont décapités et énucléés grâce à une pince courbe, et les quatre yeux sont transférés dans du milieu CO₂-indépendant (Invitrogen, ref : 18045054). L'œil est positionné cornée face cachée, le nerf optique face à l'expérimentateur. A l'aide de deux pinces droites, un trou au niveau du nerf optique est percé puis une branche de chaque pince est insérée entre la rétine et l'épithélium pigmentaire. Il faut tirer sur chaque pince et faire tourner l'œil au fur et à mesure afin de décoller l'épithélium de la rétine. Lorsque l'épithélium est éliminé, la cornée est retirée, puis le cristallin et le vitré. Il faut s'assurer qu'il ne reste plus que la rétine, et retirer les éventuelles traces de vitré et d'épithélium restant. Les rétines sont transférées dans du milieu Ringer pH 7,2, puis découpées très finement à l'aide de deux pinces droites. Les fragments rétiniens sont lavés deux fois dans du milieu Ringer avant d'être digérés avec de la trypsine 0,25% pendant 20 minutes au bain marie à 37°C en agitant au bout de 10 minutes, et en vérifiant la dissociation des rétines. Après 20 minutes, la digestion est stoppée à l'aide du milieu M199 (Invitrogen, ref : 31150022) + 10% de SVF. Puis 0,025 mg de DNase I (Sigma ref : D4263) pour 2 rétines est ajouté à la suspension cellulaire afin de digérer l'ADN qui interfère avec la mise en culture. A l'aide d'une pipette Pasteur rodée, les amas cellulaires et l'ADN sont dissociés par aspiration et refoulement successif. Puis la suspension cellulaire rétinienne est lavée deux fois avec du milieu CDM afin d'éliminer le sérum ainsi que la DNase I. Le culot cellulaire est ensuite repris dans du milieu CDM et les cellules sont comptées. La concentration cellulaire est déterminée par comptage sur cellule de Malassez après coloration des cellules mortes avec le bleu de Trypan, seules les cellules vivantes sont comptabilisées. Il faut ensuite

A.



B.

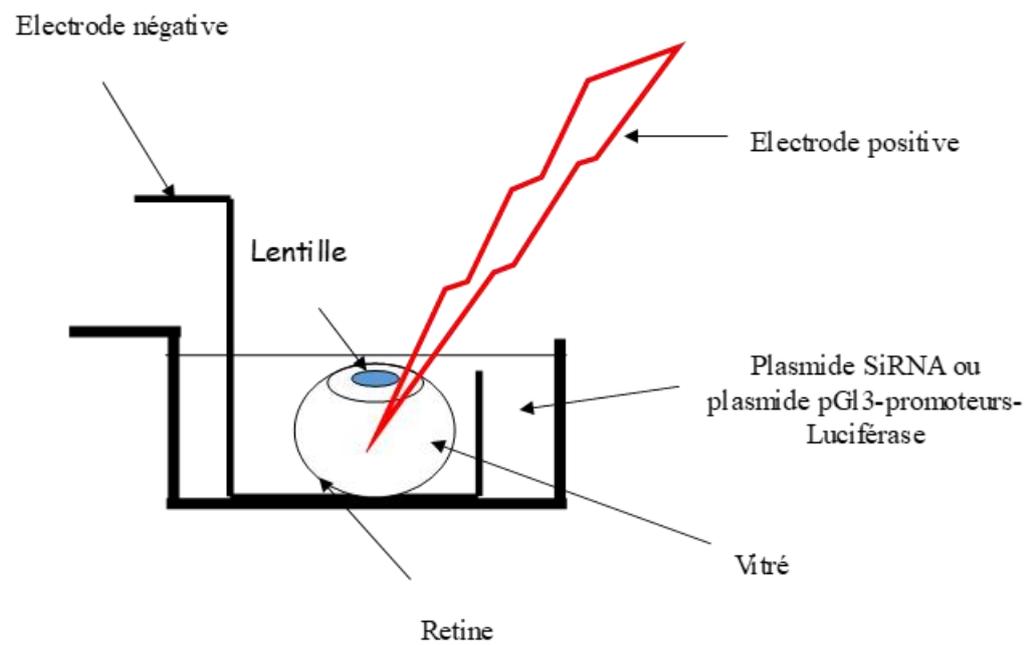


Figure 114 : Electroporation de globes oculaires d'embryons de poulet afin de surexprimer un gène. A. Photo du montage d'électroporation (Vergara et al., 2015). B. Schéma explicatif du montage d'électroporation.

répartir les échantillons à tester sur deux plaques 96 puits noires à fond transparent (Corning, ref : 3603), préalablement traitées pendant 2 heures à 37°C avec de la poly-L-Lysine à 32,25 µg/cm² afin d'augmenter l'adhérence des cellules, puis rincées par deux fois avec du milieu M199. Les plaques sont ensemencées avec la suspension cellulaire de manière à ce que la concentration cellulaire soit de 1 x 10⁵ cellules/cm² dans une plaque, et 2 x 10⁵ cellules/cm² dans la deuxième plaque pour un volume de 50 µl de suspension cellulaire par puits. Les plaques sont incubées pendant 7 jours à 37°C + 5% de CO₂.

4. Electroporation de globes oculaires d'embryons de poulet afin de surexprimer un gène

Cette technique a été mise au point à l'Université John Hopkins à Baltimore et publiée en 2015 (Vergara et al., 2015). Le protocole est similaire aux cultures de cônes d'embryons de poulet sauf que durant le processus de dissociation nous allons introduire un plasmide dans les cellules par électroporation. Pour l'anode, utiliser une électrode à pointe d'or épaisse. Nettoyer avec de l'éthanol à 70%. Fabriquer une cathode à partir d'un filament métallique de 2,5 mm de côté et de 4,5 mm de large. A l'aide d'une pince, plier le filament en forme de 'U' carré de 3 mm de long à la base et de 2 mm de haut sur un côté, l'autre côté étant la longueur restante du filament. À l'aide d'une pince, plongez l'électrode dans de l'éthanol à 96 %. Fixez ensuite un fil électrique avec une petite pince crocodile sur le bras le plus long de l'électrode. Préparez la chambre d'électroporation en découpant le couvercle d'un tube de microcentrifugation stérile de 1,5 ml et en le fixant, côté plat vers le bas. Régler les paramètres de l'électroporateur pour délivrer 5 impulsions de 15 volts, d'une durée de 50 msec et d'un intervalle de 950 msec. Placer l'électrode négative en forme de 'U' dans la chambre d'électroporation contenant 120 µl de solution plasmidique. Procéder ensuite à l'extraction de l'embryon de la coquille comme décrit plus haut. Placer les yeux dans du CO₂ indépendant (Invitrogen, ref :18045054) et procéder à la dissection comme expliqué plus haut. Lorsque l'EPR a été retiré et que l'œil a toujours sa forme ronde grâce au vitrée encore présent, placer À l'aide de pinces de Dumont le globe oculaire dans la solution plasmidique, partie postérieure de la rétine vers le bas de l'électrode et la lentille vers le haut (**Figure 114A et B**). La solution plasmidique comprend le plasmide à électroporer ainsi qu'un plasmide pCAG-RFP qui nous permettra au moment de l'analyse des cellules électroporées, de normaliser par rapport au nombre réel de cellules électroporées. Placez

l'anode de façon à ce qu'elle touche la partie antérieure de l'œil, à côté du cristallin, et à l'aide de la pédale de l'électroporateur, délivrez les impulsions électriques. Transférer la cupule rétinienne électroporée dans une nouvelle boîte de Pétri avec Ringer et répéter la procédure d'électroporation avec chacun des globes oculaires restants. Jusqu'à 6 globes oculaires peuvent être électroporés avec la même solution plasmidique sans diminution significative de l'efficacité de la transfection. Lorsque tous les globes ont été électroporés, procéder à la suite de la dissection comme expliqué plus haut. Les cellules électroporées sontensemencées à 3×10^5 cellules/cm².

5. Etude par Western Blot de l'expression de PFKFB2 dans différents tissus

Pour l'analyse en western blot de l'expression de PFKFB2 dans les différents tissus; le cœur, le cerveau et la rétine, 3 souris C57bl6J ont été sacrifiées par élancement et les différents organes ont été prélevés et soniqués dans du tampon de lyse contenant 10mM Tris HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP40, 1% sodium déoxycholate en présence de cocktail d'inhibiteur de protéase (Sigma, ref : P2714,) et d'inhibiteur de phosphatases (Calbiochem, ref : 524627), 3 fois pendant 10 secondes sur glace, puis centrifugés pendant 5 minutes à 13000g à 4°C. Le surnageant de lyse a été prélevé et la concentration en protéines a été dosé grâce à un kit de dosage Bradford (Sigma, ref : B6916). 40µg de protéines totales ont été déposés sur un gel SDS 4-12% (Invitrogen, ref : NP0322BOX) et les protéines sont séparés selon leur taille sur le gel. Les protéines sont alors transférées sur une membrane en nitrocellulose grâce au système semi humide TransBlot, en 7 min. Après avoir saturé la membrane dans du lait à 5%, la membrane est incubée avec un anticorps anti-lapin polyclonal dirigé contre la protéine PFKFB2 (AssayBiotech ref B0761, 1/500^{ème}) sur la nuit à 4°C. La membrane est lavée trois fois avec du PBS Tween 0.05% avant d'être incubée 1 heure avec un anticorps secondaire dirigés contre les IgG de lapin couplé à une peroxydase (Jackson Immuno Research, ref : 111-035-003). Les protéines PFKFB2 sont révélées avec un substrat *Hydrogen peroxide oxidoreductase* (HRP) chimio-luminescent et chimio-fluorescent à base d'acridane (ThermoFisher Scientific ref :32134) et d'un film radiographique.

6. Préparation du matériel biologique pour Immunohistochimie et hybridation *in situ*

Les animaux sont sacrifiés par élévation. Les yeux sont prélevés puis fixés dans du Paraformaldéhyde (PAF) 4%, sur la nuit à température ambiante. Les yeux subissent ensuite un bain dans du saccharose 10 % PBS pendant 3 heures à température ambiante, puis un bain dans du saccharose 20% PBS pendant 24 heures. Les yeux sont ensuite inclus dans de l'*Optimal Cutting Temperature* (OCT) en prenant soin d'orienter l'œil de façon à ce que celui-ci ait la cornée perpendiculaire à un des côtés du support d'inclusion. Des coupes de dix ou douze micromètres sont obtenues grâce à l'utilisation d'un cryostat, en prenant soin de commencer la coupe de l'œil côté cornée. Les coupes transversales des yeux sont ensuite déposées sur des lames en verre type pour immunohistochimie et congelées à -80°C.

7. Immunohistochimie PFKFB2

Pour l'étude de la localisation de la protéine PFKFB2 nous avons utilisé des coupes d'yeux de souris C27bl6N âgées de 7 semaines d'une épaisseur de 12 microns. Les lames contenant les coupes sont décongelées et les coupes sont réhydratées dans du PBS avant de subir une étape de blocage avec sérum de cheval normal (NHS) à 3%, du triton à 0.1% pendant 1h30 à température ambiante. Elles sont ensuite incubées avec un anticorps polyclonal de lapin PFKFB2 (Assaybiotech ref : ab-483, au 1/50^{ème}) sur la nuit à 4°C. Les lames sont rincées avec du PBS et incubées avec un anticorps secondaire dirigés contre les IgG de lapin et biotinylé (Vector BA-1100, 1/500^{ème}) pendant 1 heure à température ambiante. Le signal est ensuite amplifié en incubant les coupes avec de la Streptavidine couplé avec de l'Alexa 488 (Invitrogen S32354, 1/500^{ème}). Dans un second temps les lames sont ensuite incubées avec une *Lectine Peanut Agglutinin* (PNA) couplé à l'Alexa 594 (Invitrogen ref : L32459, au 1/50^{ème}). Les lames sont montées avec du Fluoromount (ThermoFischer ref : 00-4958-02) et observé avec un microscope confocal.

8. Electrorétinogramme

Des électrorétinogrammes ont été réalisés à l'âge de 12 et 16 mois. Brièvement, des souris ont été maintenues à l'obscurité pendant la nuit et anesthésiées avec un mélange de Kétamine 1000 (80 mg/kg, Axience, France) et de xylazine (8 mg/kg, Rompun 2%, Bayer HealthCare). Les pupilles ont été dilatées avec du tropicamide (Mydriaticum 0,5%, Thea) et de la phényléphrine (Neosynephrine 5%, CSP). La cornée a été anesthésiée par application locale de chlorhydrate d'oxybuprocaine (Théa). Les paupières supérieures et inférieures ont été rétractées pour garder les yeux ouverts et bombés. Une petite électrode à boucle en fil d'or en contact avec la cornée à travers une couche de Lubrithal (Dechra Veterinary Products, Danemark) a été utilisée pour enregistrer les réponses rétinienne aux stimuli lumineux. Des électrodes-aiguilles placées sur la tête et le dos des animaux ont été utilisées comme électrodes de référence et de masse, respectivement. La température corporelle a été maintenue à ~37°C avec un coussin chauffant. Le stimulus lumineux a été fourni par une Led blanche dans un stimulateur Ganzfeld (ColorDome Lab Cradle, Diagnosys LLC). Quatre niveaux d'intensité de stimulus (0,003, 0,3, 3 et 10 cds/m²) ont été utilisés pour l'enregistrement ERG scotopique. Chacune des réponses présentées a été moyennée sur cinq stimulations flash. Les ERG à cône photopique ont été enregistrés dans une lumière de fond supprimant les bâtonnets de 20 cd/m², après une période d'adaptation de cinq minutes. Un niveau d'intensité de stimulus de 10 cd.s/m² a été utilisé pour les ERG adaptés à la lumière. Chaque réponse ERG photopique à cône présentée a été moyennée sur dix flashes consécutifs. Des ERG de scintillement ont été enregistrés à 10 et 20 Hz. Les réponses ont été amplifiées et filtrées (filtres de coupure 1 Hz-bas et 300 Hz-haute) avec un amplificateur DC-/AC à un canal. L'analyse de l'ERG a été effectuée par le logiciel Espion V6 et complété par E.R.G (ERG. Report.Generator). Ce logiciel extrait les données enregistrées dans la base de données des analyses ERG (espion V6)) suivant les filtres donnés par l'utilisateur. Les signaux sont ensuite traités à l'aide d'une Transformée en ondelettes discrète (Discrete Wavelet Transform) afin d'éliminer les signaux parasites. Enfin l'utilisateur peut sélectionner plusieurs tracés pour obtenir un tracé moyen.

9. Test de viabilité des cultures de cônes d'embryons de poulet

Ce test de viabilité intervient après 7 jours de culture des cônes d'embryons de poulet. Il consiste à marquer les cellules vivantes avec de la calcéine (Invitrogen, ref : C1430) et les cellules mortes avec l'homodimère d'éthidium (Invitrogen, ref : E1169). La calcéine qui est un marqueur cellulaire fluorescent vert qui passe la membrane cellulaire. Dans les cellules cette molécule est hydrolysée par des estérases endogènes et devient fluorescente. Si la cellule est vivante ce fluorophore émet à 520 nm après avoir été excité à 485 nm. Les cellules vivantes sont imperméables aux grosses molécules comme l'homodimère d'éthidium, mais quand les cellules sont endommagées cette imperméabilité est perdue et cette molécule entre dans la cellule et va se lier à l'ADN. La liaison ADN-Homodimère d'éthidium provoque l'émission d'une fluorescence rouge à 635 nm après une excitation à 520 nm. Dans chaque puits contenant les cultures enrichies en cônes de poulet, on ajoute 2,7 μM de calcéine et 0,3 mM d'homodimère d'éthidium, puis on laisse incuber pendant 1 heure à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'évaluation de la viabilité cellulaire s'établit grâce une platine de comptage automatisée composée d'un microscope inversé (Nikon TE 2000) équipé d'une lampe au mercure avec deux filtres d'excitation à 485 et 520 nm, deux filtres d'émission à 520 et 635 nm, un objectif (x10), une platine motorisée contrôlée par un processeur (Multicontrol 2000, Martzauzer) et une caméra *charge-coupled device* (CCD, Coolsnap). Cette platine de comptage a été mise au point au laboratoire et est pilotée par le logiciel Metamorph. Elle permet d'acquérir en fluorescence les images des cellules vivantes et des cellules mortes simultanément dans chaque puits de la plaque 96 puits. A la fin de l'acquisition, le logiciel génère des données brutes, qu'il faut ensuite analyser sur le logiciel d'analyse Metamorph Offline. Celui-ci établit une taille moyenne A des cellules dans tous les puits des contrôles négatifs et va ensuite appliquer ces données aux autres puits afin de modifier la taille des cellules et ainsi éviter par exemple que des doublets cellulaires (regroupement de deux cellules) soient comptabilisés comme des simplets (cellules isolées). La formule empiriquement déterminée est : $A \times 29/20,74$.

10. Construction de sondes pour l'hybridation *in Situ* (ISH)

Deux types de sondes ont été construites, la première correspondant à un contrôle positif chez les cônes qui correspond à un ARN antisens du gène *Gnat2*. Ce gène code pour la sous unité alpha de la transducine spécifiquement dans les cônes. La deuxième sonde est la sonde qui va reconnaître l'ARNm de *Pfkfb2*. Les amorces dessinées pour amplifier les sondes par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sont :

T7_mPFKFB2_F3 : GCGTAATACGACTCATAGGGGTGGCCTATGGTTGCAAAGT

SP6_mPFKFB2_R3 : GCTATTTAGGTGACATAGCTCCTGCAGTTACAGCCACA

T7_mGNAT2_F1 : GCGTAATACGACTCATAGGGGCTGACAAGGAAGCCAAGAC

SP6_mGNAT2_R1 : GCTATTTAGGTGACATAGAAAGAGCCCACAGTCCTTGA

A partir de ces amorces et de l'ADN correspondant à chaque plasmide, une réaction PCR est effectuée qui comprend : 1x de tampon ; 50 mM MgSO₄, 10 mM dNTPs ; 10 µM d'amorce sens ; 10 µM d'amorce anti-sens et 1 unité d'enzyme dans un volume final de 50 µl. Le produit est amplifié à partir de la séquence d'ADN matriciel selon les cycles suivants :

Dénaturation : 94°C pendant 20 secondes	}	35 cycles
Hybridation : 60°C pendant 20 secondes		
Polymérisation : 68°C pendant 20 secondes		

Le produit de PCR (insert) est purifié par un kit QIAEX II (Qiagen ref : 20021), puis l'addition d'une queue Poly A est effectuée pour optimiser le clonage de la séquence dans le vecteur d'expression d'ADN PGEM-T Easy (Promega ref : A1360). Ceci a été réalisé en incubant pendant 30 minutes à 70°C 20 µl du produit de PCR dans un tampon de composition suivante : 1x tampon Taq ; 0,2 mM d'ATP ; 1,5 mM de MgCl₂ ; 15 Unité de Taq polymérase recombinante (Invitrogen ref : 10342020). Ces produits de PCR additionnés de la queue Poly A, sont alors clonés dans un vecteur PGEM-T Easy. Ce vecteur plasmidique contient les sites d'initiation de la transcription de l'ARN polymérase SP6 issue du bactériophage SP6 et la T7 ARN polymérase du bactériophage T7, c'est un vecteur d'expression d'ADN. Les produits de PCR sont sous-clonés dans le vecteur en utilisant 3 Unités de T4 DNA ligase. Cette réaction de ligation est incubée à 4°C sur la nuit. Des bactéries ultra compétentes XL-10 Gold (Stratagene ref : 200314) sont transformées avec les plasmides contenant les différentes conditions afin de procéder à l'amplification clonale du plasmide recombinant grâce à la culture de ces bactéries

dans du milieu Luria Bertani Broth (LB broth) additionné d'ampicilline (100 µg/ml). L'extraction plasmidique est faite grâce au kit Qiagen Plasmid plus Maxi de chez Qiagen. Les plasmides ainsi obtenus ont alors été linéarisés à 4°C sur la nuit selon deux modes : soit linéarisés avec l'enzyme de restriction NdeI pour les sondes anti-sens ou bien une linéarisation avec l'enzyme NcoI pour les sondes sens. La transcription de chaque plasmide linéarisé en ARN, est réalisée en prenant soin d'introduire un nucléotide marqué avec la digoxigénine : le UTP-11-Dig (Roche) qui sera incorporé lors de la synthèse de l'ARN, en place de l'UTP dans la réaction suivante : (5x Tampon de transcription ; 10 mM NTP ; 10 mM UTP-11-Dig ; 0,5 M DTT ; 20 Unités d'inhibiteur de RNase ; 41 Unités d'ARN polymérase T7 ou SP6 ; 1 µg de plasmide linéarisé. La transcription s'effectue pendant 2 heures à 37°C pour l'ARN polymérase T7 et à 40°C pour la d'ARN polymérase SP6. Les sondes sont stockées à -80°C.

11. Hybridation *In Situ*

Lorsque les coupes sont décongelées et séchées à température ambiante pendant 30 minutes et post fixées avec du PAF 4% pendant 10 minutes. On procède à la dénaturation de la sonde diluée au 1/50ème dans du tampon d'hybridation de composition suivante : 0,195 M NaCl; 5 mM Tris-HCl; 1 mM Tris-Base; 5 mM NaH₂PO₄, H₂O; 5 mM NaHPO₄, 12 H₂O; 5 mM EDTA pH 8,0; 10% Dextran Sulphate ; 1mg/ml ARN de transfert; 1x de solution de Denhardt; 50% de formamide déionisée, durant 15 minutes à 65°C. La sonde dénaturée est ensuite déposée sur le tissu à hybrider et incubée la nuit à 65°C. Après l'hybridation, on procède à deux lavages de 30 minutes chacun à 65°C avec la solution de lavage des sondes [50% de formamide, 1x de tampon Saline sodium citrate (SSC) ; 0,01% Tween-20] et deux lavages de 30 minutes chacun à température ambiante avec une solution Tween acide maléique (MATB) de composition suivante : 0,1M d'acide maléique ; 0,15 M de NaCl ; 0,05% Tween-20, ajuster le pH 7,5 avec du NaOH. Par la suite, les sites non spécifiques sont bloqués avec de la solution de blocage (MABT contenant 2% de Blocking Reagent (Roche) et 20% de sérum de chèvre inactivé) pendant 1 heure à température ambiante. Les nucléotides marqués avec la digoxigénine sont alors révélés avec un anticorps anti-Dig (Roche) couplé à la phosphatase alcaline, dilué au 1/2000^{ème} dans le tampon MABT pendant la nuit à 4°C. Cinq lavages successifs de 20 minutes chacun avec du tampon MABT sont alors nécessaires pour éliminer tous les anticorps non fixés. On procède ensuite à deux lavages de 10 minutes chacun avec du tampon de détection NTMT (NaCl 100 mM ; Tris-HCl 100 mM ; MgCl₂, 6 H₂O 50 mM ; Tween-20 0,1%). Les sondes

hybridées sont alors révélées avec le nitroblue tetrazolium chloride (NBT, Roche) à 0,35 mg/ml et du Bromo chloro indolyl phosphate toluidine (BICP, Roche) qui est le substrat de la phosphatase alcaline, à 0,175 mg/ml à température ambiante. La coloration est vérifiée après quelques heures et stoppée avec du PBS contenant du Tween-20 0,05% ; 0,5 M EDTA. Les lames sont montées avec du milieu de montage Fluoromount (ThermoFischer ref : 00-4958-02). Les lames sont observées à l'aide d'un microscope LEICA DM 6000 et les images sont acquises avec le logiciel Metavue.

12. Marquage β -Galactosidase

Pour la coloration enzymatique à la β -galactosidase, des souris C57Bl6J et PFKFB2cd/cd âgées de deux mois ont été perfusées par perfusion transcardiaque avec 4 % de paraformaldéhyde. Les yeux ont été prélevés et fixés par immersion dans du paraformaldéhyde à 4% pendant 2 h suivi d'une incubation dans du saccharose à 30 % pendant une nuit. Les yeux sont ensuite inclus dans de l'*Optimal Cutting Temperature* (OCT) en prenant soin d'orienter l'œil de façon à ce que celui-ci ait la cornée perpendiculaire à un des côtés du support d'inclusion. Des coupes de dix ou douze micromètres sont obtenues grâce à l'utilisation d'un cryostat, en prenant soin de commencer la coupe de l'œil côté cornée. Pour la détection de la β -galactosidase, les coupes sont rincées dans une solution de PBS 1X et incubées pendant 24 heures dans une solution de coloration (0,1 M ferricyanure, 0,1 M ferrocyanure, 1 M $MgCl_2$, 20 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside dans du PBS 1x 0,1% Tween®) à 37°C dans un incubateur humidifié. Après lavage dans du PBS, les coupes ont été montées dans du Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium (ThermoFischer ref : 00-4958-02). Les lames ont été scannées à résolution cellulaire avec un Nanozoomer (Hamamatsu).

13. Préparation des cellules rétinienne pour le tri des bâtonnets et des cônes par FACS

Le souris C57Bl/6J sont sacrifiés par élévation des cervicales. Les yeux sont énucléés et placés dans du PBS préalablement chauffé à 37°C. Les rétines sont extraites, à raison de 2 rétines par

tube et placées dans 1 ml de la trypsine 0.25% par tube pendant 30 minutes à 37°C. L'action de la trypsine est stoppée avec l'ajout de 1 ml de DMEM + 10 % de SVF par tube ainsi que de 0,025 mg de DNase (Sigma Ref : D4263). Les cellules sont dissociées par aspiration et refoulement grâce à une pipette avec un embout fin type p1000, puis centrifugées à température ambiante pendant 5 minutes à 1000 g. Les surnageant est extrait du tube et les cellules sont re-suspendus dans du PBS préalablement refroidi à 4°C. Les cellules sont à nouveau centrifugées pendant 5 min à température ambiante pendant 5 minutes à 1000 g. Les cellules ne sont pas comptées car nous partons du postulat qu'après dissociation et à partir de 2 rétines nous obtenons 2 millions de cellules. A cette étapes les cellules sont fixées pendant 30 minutes dans du PAF 2% à 4°C. Les cellules sont rincées à deux reprises dans du PBS1X puis rincées une dernière fois dans du PBS + 1 % de SVF. Les cellules sont ensuite bloquées dans du PBS contenant 0,4% d'albumine de sérum bovin (BSA), 1% de sérum de veau fœtal (SVF) et 1 mg/ml de Saponine pendant 30 minutes à température ambiante. L'incubation des cellules avec les anticorps primaires se fait durant 1 heure à température ambiante dans du tampon de blocage. L'anticorps anti-arrestine mCAR obtenu grâce à une collaboration, est dilué au 1/2000^{ème} afin de visualiser les cônes, Le sérum non immun (NGS) (Millipore ref : NS01L) qui sert de contrôle sera dilué au 1/6000^{ème}, l'anticorps anti-rhodopsine (Rho4D2, Abcam ref : 98887) qui sert à visualiser les bâtonnets, est dilué au 1/200^{ème}, et l'anticorps anti IgG1 isotype, qui sert de contrôle (Cell Signaling ref : 01-2012) sera dilué au 1/200^{ème}. Les cellules sont ensuite lavées trois fois dans la solution de blocage avant d'être incubées avec l'anticorps secondaire. Les cellules ayant été marqués avec l'anticorps anti-rhodopsine sont marquées avec un anticorps secondaire anti-lapin couplé à l'Alexa 488 (Invitrogen ref : A21206) dilué au 1/200^{ème} et les cellules ayant été marqués avec l'anticorps anti-arrestine sont marquées avec un anticorps anti-souris couplé à l'Alexa 647 (Invitrogen ref : A31573) dilué au 1/200^{ème}.

14. PCR

Pour amplifier et mettre en évidence *MLXIP* chez le poulet par réaction de polymérase en chaine, nous avons utilisé une TAQ polymérase (TaKaRa ref : R001C). A partir de l'ADNc issu de cônes d'embryons de poulet, une réaction PCR est effectuée qui comprend : 1x de tampon, 0.2 mM dNTPs ; 0.6 µM d'amorce sens (**Table 4**) ; 0.6 µM d'amorce antisens et 5 unité d'enzyme dans un volume final de 50 µl. Le produit est amplifié selon les cycles suivants:

Dénaturation : 98°C pendant 10 secondes	}	30cycles
Hybridation : 48-57°C (en fonction des amorces) pendant 30 secondes		
Polymérisation : 72°C pendant 1 minutes		

Les produits de PCR sont ensuite déposés sur un gel d'agarose à 1.5% afin de vérifier la bonne amplification du fragment d'ADN.

15. Extraction des métabolites secondaires de cônes d'embryons de poulet pour analyse métabolomique.

Ce protocole d'extraction de métabolites à partir de cellules adhérentes a été fourni par la plateforme de métabolomique METATOUL. Pour chaque condition de culture, il faut filtrer 1ml de milieu extracellulaire à l'aide d'une seringue et d'un filtre seringue stérile et récupérer le filtrat dans un tube Eppendorf puis placer les échantillons à -80°C jusqu'à l'envoi de tous les échantillons. Les cellules sont ensuite rincées avec un volume de PBS, qui a été préalablement placé à 4°C, équivalant à 3 fois le volume de culture. Le PBS est éliminé par aspiration et le métabolisme des cellules dit aussi *quenching* est bloqué en plongeant rapidement les boîtes de culture dans l'azote liquide. Les boîtes de culture sont sorties de l'azote liquide et un volume de 5ml d'un mélange d'acétone / méthanol / eau ultra-pure (4 :4 :2 volume/volume), placé préalablement à -20°C pendant plusieurs heures auparavant, est ajouté par boîte de culture. 120µL du standard individuel interne (IDMS) fourni par la plateforme METATOUL est ajouté au mélange acétone/méthanol/eau. Les cellules sont ensuite décollées par grattage dans le solvant froid, puis transférées dans un tube annoté. Le mélange cellules/solvant est vortexé et placé au minimum 20 minutes à -20°C. Les échantillons sont placés ensuite à -80°C jusqu'à l'envoi de ces derniers.

16. Electrophorèse 2 Dimensions

Les souris sont sacrifiées par élongation et les yeux sont énucléés et placés dans du PBS. La rétine est séparée du reste de l'œil et placée dans un tube Eppendorf et congelée immédiatement afin de préserver toutes les protéines. Les rétines sont ensuite dissociées dans du tampon de lyse contenant : 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1% Triton X-100, 1m M

PMSF, 0.14 mM TLCK en présence d'un cocktail de protéase inhibiteurs (P2714, Sigma) et soniquées 3 fois pendant 10 secondes sur glace, puis centrifugés pendant 5 minutes à 13000g à 4°C. Le surnageant de lyse a été prélevé et placé dans un nouveau tube et immédiatement placé à -80°C. Les protéines ont été précipitées avec le kit Perfect-Focus (G-Biosciences) et remises en suspension dans un tampon contenant 7 M urée, 2 M thiourée, 1% CHAPS, 10% isobutanol, 0,5% Triton X-100, 0,5% SB 3-10 et 40 mM DTT. La concentration en protéines totales de l'échantillon a été établie à l'aide du Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad) en utilisant l'albumine de sérum bovin comme étalon. L'échantillon a été mélangé avec un tampon de réhydratation de la bandelette contenant 7 M d'urée, 2 M de thiourée, 1% de CHAPS, 10% d'isobutanol, 0,5% de Triton X-100, 0,5% de SB 3-10, 40mM de DTT et 0,735% de tampon IPG 3-11 NL (concentration finale du tampon IPG de 0,5% après mélange avec l'échantillon) pour un volume total de 125 µL. Une bande sèche Immobiline de 7 cm à pH 3-10 (GE Healthcare) a été incubée pendant la nuit dans le mélange pour une réhydratation complète. La focalisation isoélectrique a ensuite été réalisée à 21°C pour un total de 16 000 Vh en utilisant le système IPGphor Ettan II (GE Healthcare). Après la migration, les bandes ont été incubées 2 heures dans 30 µL de tampon contenant 7 M urée, 2 M thiourée, 1% CHAPS, 10% isobutanol, 0,5% Triton X-100, 0,5% SB 3-10, 40 mM DTT, et 0,5% IPG tampon 3-11 NL. La focalisation isoélectrique a été effectuée à nouveau à 21°C pour un total de 14 000 V/h. La bande a été équilibrée par deux incubations dans un tampon contenant du SDS (urée 6 M, Tris 75 mM pH 8,8, glycérol 26% et SDS 2%), la première avec du DTT 65 mM pour la réduction et la seconde avec de l'iodoacétamide 135 mM pour l'alkylation. La bande a été chargée sur un gel de polyacrylamide SDS (10 %) pour être séparée en fonction du poids moléculaire à l'aide d'une cellule d'électrophorèse Invitrogen.

17. Mesure de l'activité de promoteurs

Les cellules électroporées avec les différentes constructions de promoteurs ainsi que le plasmide contrôle pCAG-RFP, vont dans un premier temps subir une acquisition des cellules RFP positive grâce à une platine de comptage automatisée composée d'un microscope inversé (Nikon TE 2000) équipé d'une lampe au mercure avec deux filtres d'excitation à 485 et 520 nm, deux filtres d'émission à 520 et 635 nm, un objectif (x10), une platine motorisée contrôlée par un processeur (Multicontrol 2000, Martzauzer) et une caméra « charge-coupled device » (CCD, Coolsnap). Cette platine de comptage a été mise au point au laboratoire et est pilotée par

le logiciel Metamorph. Une fois cette acquisition terminée, la luminescence va être mesurée en utilisant un kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (promega, ref : E1910) grâce à un luminomètre TECAN Infinite M1000. La luminescence sera ensuite normalisée avec les cellules RPP positive.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Acland, G.M., Aguirre, G.D., Ray, J., Zhang, Q., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Pearce-Kelling, S.E., Anand, V., Zeng, Y., Maguire, A.M., Jacobson, S.G., Hauswirth, W.W., and Bennett, J. (2001). Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nature genetics* 28, 92-95. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11326284>
- Adijanto, J., Du, J., Moffat, C., Seifert, E.L., Hurle, J.B., and Philp, N.J. (2014). The retinal pigment epithelium utilizes fatty acids for ketogenesis. *The Journal of biological chemistry* 289, 20570-20582. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24898254>
- Adler, A.J., and Martin, K.J. (1982). Retinol-binding proteins in bovine interphotoreceptor matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 108, 1601-1608. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6891215>
- Adler, R. (1987). Nature and nurture in the differentiation of retinal photoreceptors and neurons. *Cell Differ* 20, 183-188. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3568137>
- Adler, R., and Hatlee, M. (1989). Plasticity and differentiation of embryonic retinal cells after terminal mitosis. *Science* 243, 391-393. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2911751>
- Agbaga, M.P., Brush, R.S., Mandal, M.N., Henry, K., Elliott, M.H., and Anderson, R.E. (2008). Role of Stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids. *P Natl Acad Sci USA* 105, 12843-12848. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18728184>
- Aguirre, G.D., Baldwin, V., Pearce-Kelling, S., Narfstrom, K., Ray, K., and Acland, G.M. (1998). Congenital stationary night blindness in the dog: common mutation in the RPE65 gene indicates founder effect. *Molecular vision* 4, 23. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9808841>
- Aherne, A., Kennan, A., Kenna, P.F., McNally, N., Lloyd, D.G., Alberts, I.L., Kiang, A.S., Humphries, M.M., Ayuso, C., Engel, P.C., Gu, J.J., Mitchell, B.S., Farrar, G.J., and Humphries, P. (2004). On the molecular pathology of neurodegeneration in IMPDH1-based retinitis pigmentosa. *Human molecular genetics* 13, 641-650. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14981049>
- Ahn, B.H., Kim, H.S., Song, S., Lee, I.H., Liu, J., Vassilopoulos, A., Deng, C.X., and Finkel, T. (2008). A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 14447-14452. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18794531>
- Ait-Ali, N. (2018). L'étude des mécanismes moléculaires de l'épissage alternatif du gène NXNL1 et celle de l'origine de la signalisation métabolique de RdCVF (Sorbonne université).
- Ait-Ali, N., Fridlich, R., Millet-Puel, G., Clerin, E., Delalande, F., Jaillard, C., Blond, F., Perrocheau, L., Reichman, S., Byrne, L.C., Olivier-Bandini, A., Bellalou, J., Moyse, E., Bouillaud, F., Nicol, X., Dalkara, D., van Dorsselaer, A., Sahel, J.A., and Leveillard, T. (2015). Rod-derived cone viability factor promotes cone survival by stimulating aerobic glycolysis. *Cell* 161, 817-832. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25957687>
- Allikmets, R. (1997). A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nature genetics* 17, 122. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9288113>
- Anastasiou, D., Pouligiannis, G., Asara, J.M., Boxer, M.B., Jiang, J.K., Shen, M., Bellinger, G., Sasaki, A.T., Locasale, J.W., Auld, D.S., Thomas, C.J., Vander Heiden, M.G., and Cantley, L.C. (2011). Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. *Science* 334, 1278-1283. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22052977>
- Antonny, B., Vanni, S., Shindou, H., and Ferreira, T. (2015). From zero to six double bonds: phospholipid unsaturation and organelle function. *Trends in cell biology* 25, 427-436. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25906908>
- Applebury, M.L. (1990). Molecular genetics. Insight into blindness. *Nature* 343, 316-317. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2137199>
- Apte, R.S. (2018). Gene Therapy for Retinal Degeneration. *Cell* 173, 5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29570997>

Arango-Gonzalez, B., Trifunovic, D., Sahaboglu, A., Kranz, K., Michalakis, S., Farinelli, P., Koch, S., Koch, F., Cottet, S., Janssen-Bienhold, U., Dedek, K., Biel, M., Zrenner, E., Euler, T., Ekstrom, P., Ueffing, M., and Paquet-Durand, F. (2014). Identification of a common non-apoptotic cell death mechanism in hereditary retinal degeneration. *PLoS one* 9, e112142. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25392995>

Arno, G., Hull, S., Robson, A.G., Holder, G.E., Cheetham, M.E., Webster, A.R., Plagnol, V., and Moore, A.T. (2015). Lack of Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein Caused by Homozygous Mutation of RBP3 Is Associated With High Myopia and Retinal Dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56, 2358-2365. <Go to ISI>://000355250700027

Ashoori, M., and Saedisomeolia, A. (2014). Riboflavin (vitamin B2) and oxidative stress: a review. *Br J Nutr* 111, 1985-1991. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24650639>

Audo, I., Manes, G., Mohand-Said, S., Friedrich, A., Lancelot, M.E., Antonio, A., Moskova-Doumanova, V., Poch, O., Zanlonghi, X., Hamel, C.P., Sahel, J.A., Bhattacharya, S.S., and Zeitz, C. (2010). Spectrum of rhodopsin mutations in French autosomal dominant rod-cone dystrophy patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 3687-3700. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164459>

Bachmann-Gagescu, R., and Neuhauss, S.C. (2019). The photoreceptor cilium and its diseases. *Curr Opin Genet Dev* 56, 22-33. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31260874>

Baehr, W., Wu, S.M., Bird, A.C., and Palczewski, K. (2003). The retinoid cycle and retina disease. *Vision Res* 43, 2957-2958. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14611932>

Bainbridge, J.W., Mehat, M.S., Sundaram, V., Robbie, S.J., Barker, S.E., Ripamonti, C., Georgiadis, A., Mowat, F.M., Beattie, S.G., Gardner, P.J., Feathers, K.L., Luong, V.A., Yzer, S., Balaggan, K., Viswanathan, A., de Ravel, T.J., Casteels, I., Holder, G.E., Tyler, N., Fitzke, F.W., Weleber, R.G., Nardini, M., Moore, A.T., Thompson, D.A., Petersen-Jones, S.M., Michaelides, M., van den Born, L.I., Stockman, A., Smith, A.J., Rubin, G., and Ali, R.R. (2015). Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 372, 1887-1897. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25938638>

Bainbridge, J.W., Smith, A.J., Barker, S.S., Robbie, S., Henderson, R., Balaggan, K., Viswanathan, A., Holder, G.E., Stockman, A., Tyler, N., Petersen-Jones, S., Bhattacharya, S.S., Thrasher, A.J., Fitzke, F.W., Carter, B.J., Rubin, G.S., Moore, A.T., and Ali, R.R. (2008). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358, 2231-2239. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18441371>

Baker, B.Y., Shi, W., Wang, B., and Palczewski, K. (2014). High-resolution crystal structures of the photoreceptor glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) with three and four-bound NAD molecules. *Protein Sci* 23, 1629-1639. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25176140>

Baker, S.A., Haeri, M., Yoo, P., Gospe, S.M., 3rd, Skiba, N.P., Knox, B.E., and Arshavsky, V.Y. (2008). The outer segment serves as a default destination for the trafficking of membrane proteins in photoreceptors. *The Journal of cell biology* 183, 485-498. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18981232>

Baldwin, S.A., Beal, P.R., Yao, S.Y., King, A.E., Cass, C.E., and Young, J.D. (2004). The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch* 447, 735-743. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12838422>

Ban, Y., and Rizzolo, L.J. (2000). Regulation of glucose transporters during development of the retinal pigment epithelium. *Brain Res Dev Brain Res* 121, 89-95. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837896>

Barbour, V. (2000). The balance of risk and benefit in gene-therapy trials. *Lancet* 355, 384. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10665565>

Bartrons, R., Simon-Molas, H., Rodriguez-Garcia, A., Castano, E., Navarro-Sabate, A., Manzano, A., and Martinez-Outschoorn, U.E. (2018). Fructose 2,6-Bisphosphate in Cancer Cell Metabolism. *Front Oncol* 8, 331. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30234009>

Baylor, D.A. (1987). Photoreceptor signals and vision. Proctor lecture. *Investigative ophthalmology & visual science* 28, 34-49. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3026986>

Bazan, N.G., Calandria, J.M., and Serhan, C.N. (2010). Rescue and repair during photoreceptor cell renewal mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1. *Journal of lipid research* 51, 2018-2031. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20382842>

Beatty, S., Koh, H., Phil, M., Henson, D., and Boulton, M. (2000). The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 45, 115-134. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11033038>

Behar-Cohen, F., Gelize, E., Jonet, L., and Lassiaz, P. (2020). [Anatomy of the retina]. *Medecine sciences : M/S* 36, 594-599. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32614310>

Bellon, A., Iyer, A., Bridi, S., Lee, F.C.Y., Ovando-Vazquez, C., Corradi, E., Longhi, S., Rocuzzo, M., Strohbuecker, S., Naik, S., Sarkies, P., Miska, E., Abreu-Goodger, C., Holt, C.E., and Baudet, M.L. (2017). miR-182 Regulates Slit2-Mediated Axon Guidance by Modulating the Local Translation of a Specific mRNA. *Cell reports* 18, 1171-1186. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28147273>

Beltran, W.A., Cideciyan, A.V., Iwabe, S., Swider, M., Kosyk, M.S., McDaid, K., Martynyuk, I., Ying, G.S., Shaffer, J., Deng, W.T., Boye, S.L., Lewin, A.S., Hauswirth, W.W., Jacobson, S.G., and Aguirre, G.D. (2015). Successful arrest of photoreceptor and vision loss expands the therapeutic window of retinal gene therapy to later stages of disease. *P Natl Acad Sci USA* 112, E5844-5853. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26460017>

Benedict, C., Hallschmid, M., Schultes, B., Born, J., and Kern, W. (2007). Intranasal insulin to improve memory function in humans. *Neuroendocrinology* 86, 136-142. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17643054>

Bennett, J., Ashtari, M., Wellman, J., Marshall, K.A., Cyckowski, L.L., Chung, D.C., McCague, S., Pierce, E.A., Chen, Y., Bennicelli, J.L., Zhu, X., Ying, G.S., Sun, J., Wright, J.F., Auricchio, A., Simonelli, F., Shindler, K.S., Mingozzi, F., High, K.A., and Maguire, A.M. (2012). AAV2 gene therapy readministration in three adults with congenital blindness. *Science translational medicine* 4, 120ra115. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22323828>

Bennett, L.D., Brush, R.S., Chan, M., Lydic, T.A., Reese, K., Reid, G.E., Busik, J.V., Elliott, M.H., and Anderson, R.E. (2014a). Effect of Reduced Retinal VLC-PUFA on Rod and Cone Photoreceptors. *Invest Ophth Vis Sci* 55, 3150-3157. <Go to ISI>://000339484800044

Bennett, L.D., Hopiavuori, B.R., Brush, R.S., Chan, M., Van Hook, M.J., Thoreson, W.B., and Anderson, R.E. (2014b). Examination of VLC-PUFA-Deficient Photoreceptor Terminals. *Invest Ophth Vis Sci* 55, 4063-4072. <Go to ISI>://000339487000009

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2002). *Biochemistry, Fifth Edition* (W.H. Freeman).

Berson, E.L. (1990). Ocular findings in a form of retinitis pigmentosa with a rhodopsin gene defect. *Trans Am Ophthalmol Soc* 88, 355-388. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2095030>

Bertrand, L., Alessi, D.R., Deprez, J., Deak, M., Viaene, E., Rider, M.H., and Hue, L. (1999). Heart 6-phosphofructo-2-kinase activation by insulin results from Ser-466 and Ser-483 phosphorylation and requires 3-phosphoinositide-dependent kinase-1, but not protein kinase B. *The Journal of biological chemistry* 274, 30927-30933. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10521487>

Birch, D.G., Bennett, L.D., Duncan, J.L., Weleber, R.G., and Pennesi, M.E. (2016). Long-term Follow-up of Patients With Retinitis Pigmentosa Receiving Intraocular Ciliary Neurotrophic Factor Implants. *Am J Ophthalmol* 170, 10-14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27457255>

Bird, A.C., Bressler, N.M., Bressler, S.B., Chisholm, I.H., Coscas, G., Davis, M.D., de Jong, P.T., Klaver, C.C., Klein, B.E., Klein, R., and et al. (1995). An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol* 39, 367-374. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7604360>

Bird, A.C., Phillips, R.L., and Hageman, G.S. (2014). Geographic atrophy: a histopathological assessment. *JAMA ophthalmology* 132, 338-345. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24626824>

Blackshaw, S., Fraioli, R.E., Furukawa, T., and Cepko, C.L. (2001). Comprehensive analysis of photoreceptor gene expression and the identification of candidate retinal disease genes. *Cell* 107, 579-589. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11733058>

Blank, T., Goldmann, T., Koch, M., Amann, L., Schon, C., Bonin, M., Pang, S., Prinz, M., Burnet, M., Wagner, J.E., Biel, M., and Michalakis, S. (2017). Early Microglia Activation Precedes Photoreceptor

Degeneration in a Mouse Model of CNGB1-Linked Retinitis Pigmentosa. *Front Immunol* 8, 1930. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29354133>

Blanks, J.C., and Johnson, L.V. (1984). Specific binding of peanut lectin to a class of retinal photoreceptor cells. A species comparison. *Invest Ophthalm Vis Sci* 25, 546-557. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6715128>

Blodgett, D.M., De Zutter, J.K., Levine, K.B., Karim, P., and Carruthers, A. (2007). Structural basis of GLUT1 inhibition by cytoplasmic ATP. *J Gen Physiol* 130, 157-168. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17635959>

Blond, F., and Leveillard, T. (2019). Functional Genomics of the Retina to Elucidate its Construction and Deconstruction. *Int J Mol Sci* 20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31590277>

Bokov, A., Chaudhuri, A., and Richardson, A. (2004). The role of oxidative damage and stress in aging. *Mechanisms of ageing and development* 125, 811-826. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15541775>

Bolanos, J.P., Almeida, A., and Moncada, S. (2010). Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends in biochemical sciences* 35, 145-149. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20006513>

Bonilha, V.L., Rayborn, M.E., Bell, B.A., Marino, M.J., Beight, C.D., Pauer, G.J., Traboulsi, E.I., Hollyfield, J.G., and Hagstrom, S.A. (2015). Retinal histopathology in eyes from patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa caused by rhodopsin mutations. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 253, 2161-2169. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26202387>

Borges, R., Johnson, W.E., O'Brien, S.J., Gomes, C., Heesy, C.P., and Antunes, A. (2018). Adaptive genomic evolution of opsins reveals that early mammals flourished in nocturnal environments. *BMC Genomics* 19, 121. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29402215>

Botta, S., de Prisco, N., Marrocco, E., Renda, M., Sofia, M., Curion, F., Bacci, M.L., Ventrella, D., Wilson, C., Gesualdo, C., Rossi, S., Simonelli, F., and Surace, E.M. (2017). Targeting and silencing of rhodopsin by ectopic expression of the transcription factor KLF15. *JCI Insight* 2. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29263295>

Bouzier-Sore, A.K., and Bolanos, J.P. (2015). Uncertainties in pentose-phosphate pathway flux assessment underestimate its contribution to neuronal glucose consumption: relevance for neurodegeneration and aging. *Front Aging Neurosci* 7. <Go to ISI>://000360163900001

Bowes, C., Li, T., Danciger, M., Baxter, L.C., Applebury, M.L., and Farber, D.B. (1990). Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. *Nature* 347, 677-680. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1977087>

Boye, S.E., Huang, W.C., Roman, A.J., Sumaroka, A., Boye, S.L., Ryals, R.C., Olivares, M.B., Ruan, Q., Tucker, B.A., Stone, E.M., Swaroop, A., Cideciyan, A.V., Hauswirth, W.W., and Jacobson, S.G. (2014). Natural history of cone disease in the murine model of Leber congenital amaurosis due to CEP290 mutation: determining the timing and expectation of therapy. *PloS one* 9, e92928. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24671090>

Brennan, L.A., Lee, W., and Kantorow, M. (2010). TXNL6 is a novel oxidative stress-induced reducing system for methionine sulfoxide reductase a repair of alpha-crystallin and cytochrome C in the eye lens. *PloS one* 5, e15421. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21079812>

Brownstein, C.D. (2019). *The Rise and Fall of the Dinosaurs: A New History of a Lost World.*—By Stephen L. Brusatte (Oxford University Press).

Burgoyne, T., Meschede, I.P., Burden, J.J., Bailly, M., Seabra, M.C., and Futter, C.E. (2015). Rod disc renewal occurs by evagination of the ciliary plasma membrane that makes cadherin-based contacts with the inner segment. *P Natl Acad Sci USA* 112, 15922-15927. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26668363>

Busskamp, V., Duebel, J., Balya, D., Fradot, M., Viney, T.J., Siegert, S., Groner, A.C., Cabuy, E., Forster, V., Seeliger, M., Biel, M., Humphries, P., Paques, M., Mohand-Said, S., Trono, D., Deisseroth, K., Sahel, J.A., Picaud, S., and Roska, B. (2010). Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. *Science* 329, 413-417. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20576849>

Busskamp, V., Krol, J., Nelidova, D., Daum, J., Szikra, T., Tsuda, B., Juttner, J., Farrow, K., Scherf, B.G., Alvarez, C.P., Genoud, C., Sothilingam, V., Tanimoto, N., Stadler, M., Seeliger, M., Stoffel, M., Filipowicz, W., and Roska, B. (2014). miRNAs 182 and 183 are necessary to maintain adult cone photoreceptor outer segments and visual function. *Neuron* 83, 586-600. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25002228>

Byrne, L.C., Dalkara, D., Luna, G., Fisher, S.K., Clerin, E., Sahel, J.A., Leveillard, T., and Flannery, J.G. (2015). Viral-mediated RdCVF and RdCVFL expression protects cone and rod photoreceptors in retinal degeneration. *J Clin Invest* 125, 105-116. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25415434>

Camacho, E.T., Brager, D., Elachouri, G., Korneyeva, T., Millet-Puel, G., Sahel, J.A., and Leveillard, T. (2019). A Mathematical Analysis of Aerobic Glycolysis Triggered by Glucose Uptake in Cones. *Scientific reports* 9, 4162. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30858444>

Campochiaro, P.A., Iftikhar, M., Hafiz, G., Akhlaq, A., Tsai, G., Wehling, D., Lu, L., Wall, G.M., Singh, M.S., and Kong, X. (2020). Oral N-acetylcysteine improves cone function in retinitis pigmentosa patients in phase I trial. *The Journal of clinical investigation* 130, 1527-1541. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31805012>

Capeau, J. (2005). [Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]. *Med Sci (Paris)* 21 *Spec No*, 34-39. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16598903>

Carruthers, A., DeZutter, J., Ganguly, A., and Devaskar, S.U. (2009). Will the original glucose transporter isoform please stand up! *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E836-848. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19690067>

Carter-Dawson, L.D., LaVail, M.M., and Sidman, R.L. (1978). Differential effect of the rd mutation on rods and cones in the mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17, 489-498. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/659071>

Caruso, R.C., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Roman, A.J., Sumaroka, A., Mullins, C.L., Boye, S.L., Hauswirth, W.W., and Jacobson, S.G. (2010). Retinal disease in Rpe65-deficient mice: comparison to human leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 5304-5313. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20484585>

Catala, A. (2006). An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The international journal of biochemistry & cell biology* 38, 1482-1495. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16621670>

Cater, R.J., Chua, G.L., Erramilli, S.K., Keener, J.E., Choy, B.C., Tokarz, P., Chin, C.F., Quek, D.Q.Y., Kloss, B., Pepe, J.G., Parisi, G., Wong, B.H., Clarke, O.B., Marty, M.T., Kosiakoff, A.A., Khelashvili, G., Silver, D.L., and Mancina, F. (2021). Structural basis of omega-3 fatty acid transport across the blood-brain barrier. *Nature* 595, 315-319. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34135507>

Cehajic-Kapetanovic, J., Xue, K., Martinez-Fernandez de la Camara, C., Nanda, A., Davies, A., Wood, L.J., Salvetti, A.P., Fischer, M.D., Aylward, J.W., Barnard, A.R., Jolly, J.K., Luo, E., Lujan, B.J., Ong, T., Girach, A., Black, G.C.M., Gregori, N.Z., Davis, J.L., Rosa, P.R., Lotery, A.J., Lam, B.L., Stanga, P.E., and MacLaren, R.E. (2020). Initial results from a first-in-human gene therapy trial on X-linked retinitis pigmentosa caused by mutations in RPGR. *Nature medicine* 26, 354-359. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32094925>

Chalmel, F., Leveillard, T., Jaillard, C., Lardenois, A., Berdugo, N., Morel, E., Koehl, P., Lambrou, G., Holmgren, A., Sahel, J.A., and Poch, O. (2007). Rod-derived Cone Viability Factor-2 is a novel bifunctional-thioredoxin-like protein with therapeutic potential. *BMC Mol Biol* 8, 74. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17764561>

Chan-Ling, T., Chu, Y., Baxter, L., Weible, M., and Hughes, S. (2009). In vivo characterization of astrocyte precursor cells (APCs) and astrocytes in developing rat retinae: differentiation, proliferation, and apoptosis. *Glia* 57, 39-53. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18661555>

Chang, B., Hawes, N.L., Hurd, R.E., Davisson, M.T., Nusinowitz, S., and Heckenlively, J.R. (2002). Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Res* 42, 517-525. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11853768>

Chauhan, N., Farine, L., Pandey, K., Menon, A.K., and Butikofer, P. (2016). Lipid topogenesis--35years on. *Biochimica et biophysica acta* 1861, 757-766. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26946259>

Chidlow, G., Wood, J.P.M., Sia, P.I., and Casson, R.J. (2019). Distribution and Activity of Mitochondrial Proteins in Vascular and Avascular Retinas: Implications for Retinal Metabolism. *Invest Ophth Vis Sci* 60, 331-344. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30664793>

Chinchore, Y., Begaj, T., Wu, D., Drokhlyansky, E., and Cepko, C.L. (2017). Glycolytic reliance promotes anabolism in photoreceptors. *eLife* 6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28598329>

Choi, R.Y., Engbretson, G.A., Solessio, E.C., Jones, G.A., Coughlin, A., Aleksic, I., and Zuber, M.E. (2011). Cone degeneration following rod ablation in a reversible model of retinal degeneration. *Invest Ophth Vis Sci* 52, 364-373. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20720220>

Choudhury, S., Bhootada, Y., Gorbatyuk, O., and Gorbatyuk, M. (2013). Caspase-7 ablation modulates UPR, reprograms TRAF2-JNK apoptosis and protects T17M rhodopsin mice from severe retinal degeneration. *Cell Death Dis* 4, e528. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23470535>

Chuang, J.Z., Zhao, Y., and Sung, C.H. (2007). SARA-regulated vesicular targeting underlies formation of the light-sensing organelle in mammalian rods. *Cell* 130, 535-547. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17693260>

Chung, H.S., Wang, S.B., Venkatraman, V., Murray, C.I., and Van Eyk, J.E. (2013). Cysteine oxidative posttranslational modifications: emerging regulation in the cardiovascular system. *Circulation research* 112, 382-392. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23329793>

Cideciyan, A.V., Aleman, T.S., Boye, S.L., Schwartz, S.B., Kaushal, S., Roman, A.J., Pang, J.J., Sumaroka, A., Windsor, E.A., Wilson, J.M., Flotte, T.R., Fishman, G.A., Heon, E., Stone, E.M., Byrne, B.J., Jacobson, S.G., and Hauswirth, W.W. (2008). Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *P Natl Acad Sci USA* 105, 15112-15117. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18809924>

Cideciyan, A.V., Hood, D.C., Huang, Y., Banin, E., Li, Z.Y., Stone, E.M., Milam, A.H., and Jacobson, S.G. (1998). Disease sequence from mutant rhodopsin allele to rod and cone photoreceptor degeneration in man. *P Natl Acad Sci USA* 95, 7103-7108. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9618546>

Cideciyan, A.V., Jacobson, S.G., Beltran, W.A., Sumaroka, A., Swider, M., Iwabe, S., Roman, A.J., Olivares, M.B., Schwartz, S.B., Komaromy, A.M., Hauswirth, W.W., and Aguirre, G.D. (2013). Human retinal gene therapy for Leber congenital amaurosis shows advancing retinal degeneration despite enduring visual improvement. *P Natl Acad Sci USA* 110, E517-525. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23341635>

Cideciyan, A.V., Sudharsan, R., Dufour, V.L., Massengill, M.T., Iwabe, S., Swider, M., Lisi, B., Sumaroka, A., Marinho, L.F., Appelbaum, T., Rossmiller, B., Hauswirth, W.W., Jacobson, S.G., Lewin, A.S., Aguirre, G.D., and Beltran, W.A. (2018). Mutation-independent rhodopsin gene therapy by knockdown and replacement with a single AAV vector. *P Natl Acad Sci USA* 115, E8547-E8556. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30127005>

Clerin, E., Marussig, M., Sahel, J.A., and Leveillard, T. (2020). Metabolic and Redox Signaling of the Nucleoredoxin-Like-1 Gene for the Treatment of Genetic Retinal Diseases. *Int J Mol Sci* 21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32120883>

Clerin, E., Yang, Y., Forster, V., Fontaine, V., Sahel, J.A., and Leveillard, T. (2014). Vibratome sectioning mouse retina to prepare photoreceptor cultures. *J Vis Exp*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25548881>

Collins, H.E., and Chatham, J.C. (2020). Regulation of cardiac O-GlcNAcylation: More than just nutrient availability. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1866, 165712. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32014551>

Comitato, A., Sanges, D., Rossi, A., Humphries, M.M., and Marigo, V. (2014). Activation of Bax in three models of retinitis pigmentosa. *Invest Ophth Vis Sci* 55, 3555-3562. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24825107>

Conart, J.B., Blot, G., Augustin, S., Millet-Puel, G., Roubex, C., Beguier, F., Charles-Messance, H., Touhami, S., Sahel, J.A., Berrod, J.P., Leveillard, T., Guillonneau, X., Delarasse, C., and Sennlaub, F. (2020). Insulin inhibits inflammation-induced cone death in retinal detachment. *J Neuroinflammation* 17, 358. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33243251>

Corrochano, S., Barhoum, R., Boya, P., Arroba, A.I., Rodriguez-Muela, N., Gomez-Vicente, V., Bosch, F., de Pablo, F., de la Villa, P., and de la Rosa, E.J. (2008). Attenuation of vision loss and delay in apoptosis of photoreceptors induced by proinsulin in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 4188-4194. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18515565>

Cortina, M.S., Gordon, W.C., Lukiw, W.J., and Bazan, N.G. (2003). Light-induced photoreceptor damage triggers DNA repair: differential fate of rods and cones. *Adv Exp Med Biol* 533, 229-240. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15180269>

Country, M.W. (2017). Retinal metabolism: A comparative look at energetics in the retina. *Brain research* 1672, 50-57. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28760441>

Craig, P., Cannon, A., Kennedy, J., and Kukla, R. (2010). Pattern browsing and query adjustment for the exploratory analysis and cooperative visualisation of microarray time-course data. In *Cooperative Design, Visualization, and Engineering* (Springer), pp. 199-206.

Cremers, F.P.M., Boon, C.J.F., Bujakowska, K., and Zeitz, C. (2018). Special Issue Introduction: Inherited Retinal Disease: Novel Candidate Genes, Genotype-Phenotype Correlations, and Inheritance Models. *Genes (Basel)* 9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29659558>

Crochet, R.B., Kim, J.D., Lee, H., Yim, Y.S., Kim, S.G., Neau, D., and Lee, Y.H. (2017). Crystal structure of heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB2) and the inhibitory influence of citrate on substrate binding. *Proteins* 85, 117-124. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27802586>

Cronin, T., Raffelsberger, W., Lee-Rivera, I., Jaillard, C., Niepon, M.L., Kinzel, B., Clerin, E., Petrosian, A., Picaud, S., Poch, O., Sahel, J.A., and Leveillard, T. (2010). The disruption of the rod-derived cone viability gene leads to photoreceptor dysfunction and susceptibility to oxidative stress. *Cell Death Differ* 17, 1199-1210. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20139892>

Curcio, C.A., Medeiros, N.E., and Millican, C.L. (1996). Photoreceptor loss in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 1236-1249. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8641827>

Dai, W., Dierschke, S.K., Toro, A.L., and Dennis, M.D. (2018). Consumption of a high fat diet promotes protein O-GlcNAcylation in mouse retina via NR4A1-dependent GFAT2 expression. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1864, 3568-3576. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30254013>

Dai, Z., Shestov, A.A., Lai, L., and Locasale, J.W. (2016). A Flux Balance of Glucose Metabolism Clarifies the Requirements of the Warburg Effect. *Biophys J* 111, 1088-1100. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27602736>

Daiger, S.P., Humphries, M.M., Giesenschlag, N., Sharp, E., McWilliam, P., Farrer, J., Bradley, D., Kenna, P., McConnell, D.J., Sparkes, R.S., and et al. (1989). Linkage analysis of human chromosome 4: exclusion of autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP) and detection of new linkage groups. *Cytogenet Cell Genet* 50, 181-187. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2572401>

Dalkara, D., Byrne, L.C., Lee, T., Hoffmann, N.V., Schaffer, D.V., and Flannery, J.G. (2012). Enhanced gene delivery to the neonatal retina through systemic administration of tyrosine-mutated AAV9. *Gene Ther* 19, 176-181. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22011645>

Darrow, J.J. (2019). Luxturna: FDA documents reveal the value of a costly gene therapy. *Drug discovery today* 24, 949-954. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30711576>

Dasgupta, T., Croll, D.H., Owen, J.A., Vander Heiden, M.G., Locasale, J.W., Alon, U., Cantley, L.C., and Gunawardena, J. (2014). A fundamental trade-off in covalent switching and its circumvention by enzyme bifunctionality in glucose homeostasis. *The Journal of biological chemistry* 289, 13010-13025. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24634222>

De Meyts, P. (2000). The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network. In *Endotext*, K.R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W.W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, J. Hofland, et al., eds. (South Dartmouth (MA)).

Deak, F., Anderson, R.E., Fessler, J.L., and Sherry, D.M. (2019). Novel Cellular Functions of Very Long Chain-Fatty Acids: Insight From ELOVL4 Mutations. *Front Cell Neurosci* 13, 428. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31616255>

DeClercq, V., d'Eon, B., and McLeod, R.S. (2015). Fatty acids increase adiponectin secretion through both classical and exosome pathways. *Biochimica et biophysica acta* 1851, 1123-1133. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25900100>

Delhove, J., Osenk, I., Prichard, I., and Donnelley, M. (2020). Public Acceptability of Gene Therapy and Gene Editing for Human Use: A Systematic Review. *Hum Gene Ther* 31, 20-46. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31802714>

Delyfer, M.N., Raffelsberger, W., Mercier, D., Korobelnik, J.F., Gaudric, A., Charteris, D.G., Tadayoni, R., Metge, F., Caputo, G., Barale, P.O., Ripp, R., Muller, J.D., Poch, O., Sahel, J.A., and Leveillard, T. (2011). Transcriptomic analysis of human retinal detachment reveals both inflammatory response and photoreceptor death. *PLoS one* 6, e28791. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22174898>

Deprez, J., Vertommen, D., Alessi, D.R., Hue, L., and Rider, M.H. (1997). Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *The Journal of biological chemistry* 272, 17269-17275. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9211863>

Deturco, E.B.R., Gordon, W.C., and Bazan, N.G. (1994). Docosahexaenoic Acid Is Taken up by the Inner Segment of Frog Photoreceptors Leading to an Active Synthesis of Docosahexaenoyl-Inositol Lipids - Similarities in Metabolism in-Vivo and in-Vitro. *Curr Eye Res* 13, 21-28. <Go to ISI>://A1994MX15300003

Diez, J.J., and Iglesias, P. (2003). The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* 148, 293-300. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12611609>

Dowling, J.E. (1987). *The retina: an approachable part of the brain* (Harvard University Press).

Drin, G. (2014). Topological regulation of lipid balance in cells. *Annu Rev Biochem* 83, 51-77. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24606148>

Dryja, T.P., Hahn, L.B., Reboul, T., and Arnaud, B. (1996). Missense mutation in the gene encoding the alpha subunit of rod transducin in the Nougaret form of congenital stationary night blindness. *Nature genetics* 13, 358-360. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8673138>

Dryja, T.P., McGee, T.L., Hahn, L.B., Cowley, G.S., Olsson, J.E., Reichel, E., Sandberg, M.A., and Berson, E.L. (1990a). Mutations within the rhodopsin gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *N Engl J Med* 323, 1302-1307. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2215617>

Dryja, T.P., McGee, T.L., Reichel, E., Hahn, L.B., Cowley, G.S., Yandell, D.W., Sandberg, M.A., and Berson, E.L. (1990b). A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 343, 364-366. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2137202>

Du, J., Cleghorn, W.M., Contreras, L., Lindsay, K., Rountree, A.M., Chertov, A.O., Turner, S.J., Sahaboglu, A., Linton, J., Sadilek, M., Satrustegui, J., Sweet, I.R., Paquet-Durand, F., and Hurley, J.B. (2013). Inhibition of mitochondrial pyruvate transport by zaprinast causes massive accumulation of aspartate at the expense of glutamate in the retina. *The Journal of biological chemistry* 288, 36129-36140. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24187136>

Du, J., Rountree, A., Cleghorn, W.M., Contreras, L., Lindsay, K.J., Sadilek, M., Gu, H., Djukovic, D., Raftery, D., Satrustegui, J., Kanow, M., Chan, L., Tsang, S.H., Sweet, I.R., and Hurley, J.B. (2016). Phototransduction Influences Metabolic Flux and Nucleotide Metabolism in Mouse Retina. *The Journal of biological chemistry* 291, 4698-4710. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26677218>

Duncan, J.L., Pierce, E.A., Laster, A.M., Daiger, S.P., Birch, D.G., Ash, J.D., Iannaccone, A., Flannery, J.G., Sahel, J.A., Zack, D.J., Zarbin, M.A., and the Foundation Fighting Blindness Scientific Advisory, B. (2018). Inherited Retinal Degenerations: Current Landscape and Knowledge Gaps. *Transl Vis Sci Technol* 7, 6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30034950>

Eade, K., Gantner, M.L., Hostyk, J.A., Nagasaki, T., Giles, S., Fallon, R., Harkins-Perry, S., Baldini, M., Lim, E.W., Schepke, L., Dorrell, M.I., Cai, C., Baugh, E.H., Wolock, C.J., Wallace, M., Berlow, R.B., Goldstein, D.B., Metallo, C.M., Friedlander, M., and Allikmets, R. (2021). Serine biosynthesis defect due to haploinsufficiency of PHGDH causes retinal disease. *Nat Metab* 3, 366-377. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33758422>

Eandi, C.M., Charles Messance, H., Augustin, S., Dominguez, E., Lavalette, S., Forster, V., Hu, S.J., Siquieros, L., Craft, C.M., Sahel, J.A., Tadayoni, R., Paques, M., Guillonnet, X., and Sennlaub, F. (2016). Subretinal mononuclear phagocytes induce cone segment loss via IL-1beta. *eLife* 5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27438413>

Elachouri, G., Lee-Rivera, I., Clerin, E., Argentini, M., Fridlich, R., Blond, F., Ferracane, V., Yang, Y., Raffelsberger, W., Wan, J., Bennett, J., Sahel, J.A., Zack, D.J., and Leveillard, T. (2015). Thioredoxin rod-derived cone viability factor protects against photooxidative retinal damage. *Free radical biology & medicine* 81C, 22-29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25596499>

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17562483>

Eudy, J.D., Weston, M.D., Yao, S., Hoover, D.M., Rehm, H.L., Ma-Edmonds, M., Yan, D., Ahmad, I., Cheng, J.J., Ayuso, C., Cremers, C., Davenport, S., Moller, C., Talmadge, C.B., Beisel, K.W., Tamayo, M., Morton, C.C., Swaroop, A., Kimberling, W.J., and Sumegi, J. (1998). Mutation of a gene encoding a protein with extracellular matrix motifs in Usher syndrome type IIa. *Science* 280, 1753-1757. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9624053>

Euler, T., Haverkamp, S., Schubert, T., and Baden, T. (2014). Retinal bipolar cells: elementary building blocks of vision. *Nat Rev Neurosci* 15, 507-519. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25158357>

Fain, G.L., Hardie, R., and Laughlin, S.B. (2010). Phototransduction and the evolution of photoreceptors. *Current biology : CB* 20, R114-124. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20144772>

Fajnkuchen, F., and Cohen, S.Y. (2008). [Update on the genetics of age-related macular degeneration]. *J Fr Ophtalmol* 31, 630-637. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18772819>

Farber, D.B., and Lolley, R.N. (1974). Cyclic guanosine monophosphate: elevation in degenerating photoreceptor cells of the C3H mouse retina. *Science* 186, 449-451. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4369896>

Fernandez-San Jose, P., Blanco-Kelly, F., Corton, M., Trujillo-Tiebas, M.J., Gimenez, A., Avila-Fernandez, A., Garcia-Sandoval, B., Lopez-Molina, M.I., Hernan, I., Carballo, M., Riveiro-Alvarez, R., and Ayuso, C. (2015). Prevalence of Rhodopsin mutations in autosomal dominant Retinitis Pigmentosa in Spain: clinical and analytical review in 200 families. *Acta Ophthalmol* 93, e38-44. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25408095>

Findlay, A.S., Carter, R.N., Starbuck, B., McKie, L., Novakova, K., Budd, P.S., Keighren, M.A., Marsh, J.A., Cross, S.H., Simon, M.M., Potter, P.K., Morton, N.M., and Jackson, I.J. (2018). Mouse *Idh3a* mutations cause retinal degeneration and reduced mitochondrial function. *Dis Model Mech* 11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30478029>

Finkel, T. (2015). The metabolic regulation of aging. *Nature medicine* 21, 1416-1423. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26646498>

Fintz, A.C., Audo, I., Hicks, D., Mohand-Said, S., Leveillard, T., and Sahel, J. (2003). Partial characterization of retina-derived cone neuroprotection in two culture models of photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalm Vis Sci* 44, 818-825. <Go to ISI>://WOS:000180966800051

Foulds, W.S. (1990). The choroidal circulation and retinal metabolism--an overview. *Eye (Lond)* 4 (Pt 2), 243-248. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2199233>

Friedel, R.H., Seisenberger, C., Kaloff, C., and Wurst, W. (2007). EUCOMM--the European conditional mouse mutagenesis program. *Brief Funct Genomic Proteomic* 6, 180-185. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17967808>

Fritsche, L.G., Chen, W., Schu, M., Yaspan, B.L., Yu, Y., Thorleifsson, G., Zack, D.J., Arakawa, S., Cipriani, V., Ripke, S., Igo, R.P., Jr., Buitendijk, G.H., Sim, X., Weeks, D.E., Guymer, R.H., Merriam, J.E., Francis, P.J., Hannum, G., Agarwal, A., Armbrecht, A.M., Audo, I., Aung, T., Barile, G.R., Benchaboune, M., Bird, A.C., Bishop, P.N., Branham, K.E., Brooks, M., Brucker, A.J., Cade, W.H., Cain, M.S., Campochiaro, P.A., Chan, C.C., Cheng, C.Y., Chew, E.Y., Chin, K.A., Chowers, I., Clayton, D.G., Cojocar, R., Conley, Y.P., Cornes, B.K., Daly, M.J., Dhillon, B., Edwards, A.O., Evangelou, E., Fagerness, J., Ferreyra, H.A., Friedman, J.S., Geirsdottir, A., George, R.J., Gieger, C., Gupta, N., Hagstrom, S.A., Harding, S.P., Haritoglou, C., Heckenlively, J.R., Holz, F.G., Hughes, G., Ioannidis, J.P., Ishibashi, T., Joseph, P., Jun, G., Kamatani, Y., Katsanis, N., C, N.K., Khan, J.C., Kim, I.K., Kiyohara, Y., Klein, B.E., Klein, R., Kovach, J.L., Kozak, I., Lee, C.J., Lee, K.E., Lichtner, P., Lotery, A.J., Meitinger, T., Mitchell, P., Mohand-Said, S., Moore, A.T., Morgan, D.J., Morrison, M.A., Myers, C.E., Naj, A.C., Nakamura, Y., Okada, Y., Orlin, A., Ortube, M.C., Othman, M.I., Pappas, C., Park, K.H., Pauer, G.J., Peachey, N.S., Poch, O., Priya, R.R., Reynolds, R., Richardson, A.J., Ripp, R., Rudolph, G., Ryu, E., Sahel, J.A., Schaumberg, D.A., Scholl, H.P.,

Schwartz, S.G., Scott, W.K., Shahid, H., Sigurdsson, H., Silvestri, G., Sivakumaran, T.A., Smith, R.T., Sobrin, L., Souied, E.H., Stambolian, D.E., Stefansson, H., Sturgill-Short, G.M., Takahashi, A., Tosakulwong, N., Truitt, B.J., Tsironi, E.E., Uitterlinden, A.G., van Duijn, C.M., Vijaya, L., Vingerling, J.R., Vithana, E.N., Webster, A.R., Wichmann, H.E., Winkler, T.W., Wong, T.Y., Wright, A.F., Zelenika, D., Zhang, M., Zhao, L., Zhang, K., Klein, M.L., Hageman, G.S., Lathrop, G.M., Stefansson, K., Allikmets, R., Baird, P.N., Gorin, M.B., Wang, J.J., Klaver, C.C., Seddon, J.M., Pericak-Vance, M.A., Iyengar, S.K., Yates, J.R., Swaroop, A., Weber, B.H., Kubo, M., Deangelis, M.M., Leveillard, T., Thorsteinsdottir, U., Haines, J.L., Farrer, L.A., Heid, I.M., and Abecasis, G.R. (2013). Seven new loci associated with age-related macular degeneration. *Nature genetics* 45, 433-439, 439e431-432. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23455636>

Fritsche, L.G., Igl, W., Bailey, J.N., Grassmann, F., Sengupta, S., Bragg-Gresham, J.L., Burdon, K.P., Hebbiring, S.J., Wen, C., Gorski, M., Kim, I.K., Cho, D., Zack, D., Souied, E., Scholl, H.P., Bala, E., Lee, K.E., Hunter, D.J., Sardell, R.J., Mitchell, P., Merriam, J.E., Cipriani, V., Hoffman, J.D., Schick, T., Lechanteur, Y.T., Guymer, R.H., Johnson, M.P., Jiang, Y., Stanton, C.M., Buitendijk, G.H., Zhan, X., Kwong, A.M., Boleda, A., Brooks, M., Gieser, L., Ratnapriya, R., Branham, K.E., Foerster, J.R., Heckenlively, J.R., Othman, M.I., Vote, B.J., Liang, H.H., Souzeau, E., McAllister, I.L., Isaacs, T., Hall, J., Lake, S., Mackey, D.A., Constable, I.J., Craig, J.E., Kitchner, T.E., Yang, Z., Su, Z., Luo, H., Chen, D., Ouyang, H., Flagg, K., Lin, D., Mao, G., Ferreyra, H., Stark, K., von Strachwitz, C.N., Wolf, A., Brandl, C., Rudolph, G., Olden, M., Morrison, M.A., Morgan, D.J., Schu, M., Ahn, J., Silvestri, G., Tsironi, E.E., Park, K.H., Farrer, L.A., Orlin, A., Brucker, A., Li, M., Curcio, C.A., Mohand-Said, S., Sahel, J.A., Audo, I., Benchaboune, M., Cree, A.J., Rennie, C.A., Goverdhan, S.V., Grunin, M., Hagbi-Levi, S., Campochiaro, P., Katsanis, N., Holz, F.G., Blond, F., Blanche, H., Deleuze, J.F., Igo, R.P., Jr., Truitt, B., Peachey, N.S., Meuer, S.M., Myers, C.E., Moore, E.L., Klein, R., Hauser, M.A., Postel, E.A., Courtenay, M.D., Schwartz, S.G., Kovach, J.L., Scott, W.K., Liew, G., Tan, A.G., Gopinath, B., Merriam, J.C., Smith, R.T., Khan, J.C., Shahid, H., Moore, A.T., McGrath, J.A., Laux, R., Brantley, M.A., Jr., Agarwal, A., Ersoy, L., Caramoy, A., Langmann, T., Saksens, N.T., de Jong, E.K., Hoyng, C.B., Cain, M.S., Richardson, A.J., Martin, T.M., Blangero, J., Weeks, D.E., Dhillon, B., van Duijn, C.M., Doheny, K.F., Romm, J., Klaver, C.C., Hayward, C., Gorin, M.B., Klein, M.L., Baird, P.N., den Hollander, A.I., Fauser, S., Yates, J.R., Allikmets, R., Wang, J.J., Schaumberg, D.A., Klein, B.E., Hagstrom, S.A., Chowers, I., Lotery, A.J., Leveillard, T., Zhang, K., Brilliant, M.H., Hewitt, A.W., Swaroop, A., Chew, E.Y., Pericak-Vance, M.A., DeAngelis, M., Stambolian, D., Haines, J.L., Iyengar, S.K., Weber, B.H., Abecasis, G.R., and Heid, I.M. (2016). A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nature genetics* 48, 134-143. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26691988>

Funato, Y., and Miki, H. (2007). Nucleoredoxin, a novel thioredoxin family member involved in cell growth and differentiation. *Antioxid Redox Sign* 9, 1035-1057. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17567240>

Futterman, S., and Kinoshita, J.H. (1959). Metabolism of the retina: I. Respiration of cattle retina. *Journal of Biological Chemistry* 234, 723-726.

Geller, A.M., and Sieving, P.A. (1993). Assessment of foveal cone photoreceptors in Stargardt's macular dystrophy using a small dot detection task. *Vision Res* 33, 1509-1524. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8351823>

Gesteland, R.F., Cech, T., and Atkins, J.F. (2006). *The RNA world the nature of modern RNA suggests a prebiotic RNA world*, 3rd ed. edn (Cold Spring Harbor (N.Y.): Cold Spring Harbor laboratory press).

Ghazi, N.G. (2002). Retinal angiomatous proliferation in age-related macular degeneration. *Retina* 22, 509-511; author reply 512. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12172126>

Ghiretti, F. (1983). History and Philosophy of the Life Sciences. *Hist Phil Life Sci* 5, 221-224. <http://www.jstor.org/stable/23328348>

Goncalves, R.A., and De Felice, F.G. (2021). The crosstalk between brain and periphery: Implications for brain health and disease. *Neuropharmacology* 197, 108728. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34331960>

Gong, Q., Wang, H., Yu, P., Qian, T., and Xu, X. (2021). Protective or Harmful: The Dual Roles of Autophagy in Diabetic Retinopathy. *Front Med (Lausanne)* 8, 644121. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33842506>

Gonzalez-Fernandez, F. (2002). Evolution of the visual cycle: the role of retinoid-binding proteins. *J Endocrinol* 175, 75-88. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12379492>

Gonzalez-Fernandez, F. (2003). Interphotoreceptor retinoid-binding protein--an old gene for new eyes. *Vision Res* 43, 3021-3036. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14611938>

Gonzalez-Fernandez, F., and Ghosh, D. (2008). Focus on molecules: Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP). *Exp Eye Res* 86, 169-170. <Go to ISI>://000254271600002

Gonzalez-Resines, S., Quinn, P.J., Naftalin, R.J., and Domene, C. (2021). Multiple Interactions of Glucose with the Extra-Membranous Loops of GLUT1 Aid Transport. *J Chem Inf Model*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34260246>

Gorbatyuk, M.S., Knox, T., LaVail, M.M., Gorbatyuk, O.S., Noorwez, S.M., Hauswirth, W.W., Lin, J.H., Muzyczka, N., and Lewin, A.S. (2010). Restoration of visual function in P23H rhodopsin transgenic rats by gene delivery of BiP/Grp78. *P Natl Acad Sci USA* 107, 5961-5966. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20231467>

Goren, M.A., Morizumi, T., Menon, I., Joseph, J.S., Dittman, J.S., Cherezov, V., Stevens, R.C., Ernst, O.P., and Menon, A.K. (2014). Constitutive phospholipid scramblase activity of a G protein-coupled receptor. *Nat Commun* 5, 5115. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25296113>

Gorgels, T.G., van der Pluijm, I., Brandt, R.M., Garinis, G.A., van Steeg, H., van den Aardweg, G., Jansen, G.H., Ruijter, J.M., Bergen, A.A., van Norren, D., Hoeijmakers, J.H., and van der Horst, G.T. (2007). Retinal degeneration and ionizing radiation hypersensitivity in a mouse model for Cockayne syndrome. *Molecular and cellular biology* 27, 1433-1441. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17145777>

Gray, J.H., Owen, R.P., and Giacomini, K.M. (2004). The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflug Arch Eur J Phys* 447, 728-734. <Go to ISI>://000188837300029

Graymore, C. (1959). Metabolism of the developing retina. I. Aerobic and anaerobic glycolysis in the developing rat retina. *The British journal of ophthalmology* 43, 34-39. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13618528>

Gregoriou, M., Trayer, I.P., and Cornish-Bowden, A. (1983). Isotope-exchange evidence that glucose 6-phosphate inhibits rat-muscle hexokinase II at an allosteric site. *European journal of biochemistry / FEBS* 134, 283-288. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6603359>

Gregory-Evans, K., Pennesi, M.E., and Weleber, R.G. (2013). Chapter 40 - Retinitis Pigmentosa and Allied Disorders. In *Retina (Fifth Edition)*, S.J. Ryan, S.R. Sadda, D.R. Hinton, A.P. Schachar, S.R. Sadda, C.P. Wilkinson, P. Wiedemann, and A.P. Schachar, eds. (London: W.B. Saunders), pp. 761-835.

Grek, C.L., Zhang, J., Manevich, Y., Townsend, D.M., and Tew, K.D. (2013). Causes and consequences of cysteine S-glutathionylation. *The Journal of biological chemistry* 288, 26497-26504. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23861399>

Grenell, A., Wang, Y., Yam, M., Swarup, A., Dilan, T.L., Hauer, A., Linton, J.D., Philp, N.J., Gregor, E., Zhu, S., Shi, Q., Murphy, J., Guan, T., Lohner, D., Kolandaivelu, S., Ramamurthy, V., Goldberg, A.F.X., Hurley, J.B., and Du, J. (2019). Loss of MPC1 reprograms retinal metabolism to impair visual function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116, 3530-3535. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30808746>

Guillonneau, X., Eandi, C.M., Paques, M., Sahel, J.A., Sapieha, P., and Sennlaub, F. (2017). On phagocytes and macular degeneration. *Progress in retinal and eye research* 61, 98-128. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28602950>

Guillou, H., Zdravec, D., Martin, P.G., and Jacobsson, A. (2010). The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Progress in lipid research* 49, 186-199. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20018209>

Guo, C., Otani, A., Oishi, A., Kojima, H., Makiyama, Y., Nakagawa, S., and Yoshimura, N. (2012). Knockout of *ccr2* alleviates photoreceptor cell death in a model of retinitis pigmentosa. *Exp Eye Res* 104, 39-47. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23022404>

Guo, X., Wang, S.B., Xu, H., Ribic, A., Mohns, E.J., Zhou, Y., Zhu, X., Biederer, T., Crair, M.C., and Chen, B. (2015). A short N-terminal domain of HDAC4 preserves photoreceptors and restores visual function in retinitis pigmentosa. *Nat Commun* 6, 8005. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26272629>

Gurel, Z., and Sheibani, N. (2018). O-Linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) modification: a new pathway to decode pathogenesis of diabetic retinopathy. *Clin Sci (Lond)* 132, 185-198. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29352075>

Haines, J.L., Hauser, M.A., Schmidt, S., Scott, W.K., Olson, L.M., Gallins, P., Spencer, K.L., Kwan, S.Y., Noureddine, M., Gilbert, J.R., Schnetz-Boutaud, N., Agarwal, A., Postel, E.A., and Pericak-Vance, M.A. (2005). Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 308, 419-421. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761120>

Halligan, B.D. (2009). ProMoST: a tool for calculating the pI and molecular mass of phosphorylated and modified proteins on two-dimensional gels. *Methods Mol Biol* 527, 283-298, ix. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19241021>

Hamburger, V., and Hamilton, H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88, 49-92. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24539719>

Hamel, C. (2006). Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis* 1, 40. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17032466>

Hamel, C.P. (2007). Cone rod dystrophies. *Orphanet J Rare Dis* 2, 7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17270046>

Hamel, C.P., Tsilou, E., Pfeiffer, B.A., Hooks, J.J., Detrick, B., and Redmond, T.M. (1993). Molecular cloning and expression of RPE65, a novel retinal pigment epithelium-specific microsomal protein that is post-transcriptionally regulated in vitro. *The Journal of biological chemistry* 268, 15751-15757. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8340400>

Hamieh, A., and Nandrot, E.F. (2019). Retinal Pigment Epithelial Cells: The Unveiled Component in the Etiology of Prpf Splicing Factor-Associated Retinitis Pigmentosa. *Adv Exp Med Biol* 1185, 227-231. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31884616>

Hara, M.R., Agrawal, N., Kim, S.F., Cascio, M.B., Fujimuro, M., Ozeki, Y., Takahashi, M., Cheah, J.H., Tankou, S.K., Hester, L.D., Ferris, C.D., Hayward, S.D., Snyder, S.H., and Sawa, A. (2005). S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nature cell biology* 7, 665-674. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15951807>

Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology* 11, 298-300. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13332224>

Harrison, E.H. (2019). Mechanisms of Transport and Delivery of Vitamin A and Carotenoids to the Retinal Pigment Epithelium. *Molecular nutrition & food research* 63, e1801046. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30698921>

Hartong, D.T., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (2006). Retinitis pigmentosa. *Lancet* 368, 1795-1809. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17113430>

Hartong, D.T., Dange, M., McGee, T.L., Berson, E.L., Dryja, T.P., and Colman, R.F. (2008). Insights from retinitis pigmentosa into the roles of isocitrate dehydrogenases in the Krebs cycle. *Nature genetics* 40, 1230-1234. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18806796>

Hartveit, E., and Veruki, M.L. (2012). Electrical synapses between All amacrine cells in the retina: Function and modulation. *Brain research* 1487, 160-172. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22776293>

Hass, D.T., and Barnstable, C.J. (2021). Uncoupling proteins in the mitochondrial defense against oxidative stress. *Progress in retinal and eye research*, 100941. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33422637>

Hauswirth, W.W., and Lewin, A.S. (2000). Ribozyme uses in retinal gene therapy. *Progress in retinal and eye research* 19, 689-710. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11029552>

He, Z., You, C., and Zhao, D. (2018). Long non-coding RNA UCA1/miR-182/PFKFB2 axis modulates glioblastoma-associated stromal cells-mediated glycolysis and invasion of glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 500, 569-576. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29655792>

Heesy, C.P., and Hall, M.I. (2010). The nocturnal bottleneck and the evolution of mammalian vision. *Brain, behavior and evolution* 75, 195-203. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20733295>

Heine-Suner, D., Diaz-Guillen, M.A., Lange, A.J., and Rodriguez de Cordoba, S. (1998). Sequence and structure of the human 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase heart isoform gene (PFKFB2). *Eur J Biochem* 254, 103-110. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9652401>

Hendrickson, A., and Hicks, D. (2002). Distribution and density of medium- and short-wavelength selective cones in the domestic pig retina. *Exp Eye Res* 74, 435-444. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12076087>

Herrero-Mendez, A., Almeida, A., Fernandez, E., Maestre, C., Moncada, S., and Bolanos, J.P. (2009). The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nature cell biology* 11, 747-752. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19448625>

Herrero, E., and de la Torre-Ruiz, M.A. (2007). Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64, 1518-1530. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17415523>

Hetz, C., and Papa, F.R. (2018). The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Molecular cell* 69, 169-181. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29107536>

Hewitt, A.T., Lindsey, J.D., Carbott, D., and Adler, R. (1990). Photoreceptor survival-promoting activity in interphotoreceptor matrix preparations: characterization and partial purification. *Exp Eye Res* 50, 79-88. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2307198>

Hildebrandt, T., Knuesting, J., Berndt, C., Morgan, B., and Scheibe, R. (2015). Cytosolic thiol switches regulating basic cellular functions: GAPDH as an information hub? *Biological chemistry* 396, 523-537. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25581756>

Hirji, N., Aboshiha, J., Georgiou, M., Bainbridge, J., and Michaelides, M. (2018). Achromatopsia: clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options. *Ophthalmic Genet* 39, 149-157. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29303385>

Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* 54, 237-271. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3896121>

Huang, S., Zhu, S., Li, X.J., and Li, S. (2019). The Expanding Clinical Universe of Polyglutamine Disease. *Neuroscientist* 25, 512-520. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30614396>

Hughes, E.H., Schlichtenbrede, F.C., Murphy, C.C., Sarra, G.M., Luthert, P.J., Ali, R.R., and Dick, A.D. (2003). Generation of activated sialoadhesin-positive microglia during retinal degeneration. *Invest Ophthalm Vis Sci* 44, 2229-2234. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12714665>

Humphries, P., Kenna, P., and Farrar, G.J. (1992). On the molecular genetics of retinitis pigmentosa. *Science* 256, 804-808. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1589761>

Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 12, 99-110. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21245828>

Hurley, J.B. (2021). Retina Metabolism and Metabolism in the Pigmented Epithelium: A Busy Intersection. *Annu Rev Vis Sci*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34102066>

Igney, F.H., and Krammer, P.H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2, 277-288. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12001989>

Ingram, N.T., Fain, G.L., and Sampath, A.P. (2020). Elevated energy requirement of cone photoreceptors. *P Natl Acad Sci USA* 117, 19599-19603. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32719136>

Ingram, N.T., Sampath, A.P., and Fain, G.L. (2016). Why are rods more sensitive than cones? *J Physiol* 594, 5415-5426. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27218707>

Issad, T., Masson, E., and Pagesy, P. (2010). O-GlcNAc modification, insulin signaling and diabetic complications. *Diabetes Metab* 36, 423-435. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21074472>

Ivanovic, I., Anderson, R.E., Le, Y.Z., Fliesler, S.J., Sherry, D.M., and Rajala, R.V. (2011). Deletion of the p85alpha regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase in cone photoreceptor cells results in cone

photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 3775-3783. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21398281>

Jaarsma, D., van der Pluijm, I., van der Horst, G.T., and Hoeijmakers, J.H. (2013). Cockayne syndrome pathogenesis: lessons from mouse models. *Mechanisms of ageing and development* 134, 180-195. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23591128>

Jacobson, S.G., Cideciyan, A.V., Aguirre, G.D., Roman, A.J., Sumaroka, A., Hauswirth, W.W., and Palczewski, K. (2015a). Improvement in vision: a new goal for treatment of hereditary retinal degenerations. *Expert Opin Orphan Drugs* 3, 563-575. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26246977>

Jacobson, S.G., Cideciyan, A.V., Roman, A.J., Sumaroka, A., Schwartz, S.B., Heon, E., and Hauswirth, W.W. (2015b). Improvement and decline in vision with gene therapy in childhood blindness. *N Engl J Med* 372, 1920-1926. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25936984>

Jahangir, Z., Ahmad, W., and Shabbiri, K. (2014). Alternate Phosphorylation/O-GlcNAc Modification on Human Insulin IRSs: A Road towards Impaired Insulin Signaling in Alzheimer and Diabetes. *Adv Bioinformatics* 2014, 324753. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25580119>

Jin, Z.B., Hirokawa, G., Gui, L., Takahashi, R., Osakada, F., Hiura, Y., Takahashi, M., Yasuhara, O., and Iwai, N. (2009). Targeted deletion of miR-182, an abundant retinal microRNA. *Molecular vision* 15, 523-533. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279690>

Johnson, L.E., van Veen, T., and Ekstrom, P.A. (2005). Differential Akt activation in the photoreceptors of normal and rd1 mice. *Cell Tissue Res* 320, 213-222. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15789220>

Kaadige, M.R., Yang, J., Wilde, B.R., and Ayer, D.E. (2015). MondoA-Mlx transcriptional activity is limited by mTOR-MondoA interaction. *Molecular and cellular biology* 35, 101-110. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25332233>

Kaiser, J. (2011). Clinical research. Gene therapists celebrate a decade of progress. *Science* 334, 29-30. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21980087>

Kajiwara, K., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (1994). Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science* 264, 1604-1608. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8202715>

Kalloniatis, M., Loh, C.S., Acosta, M.L., Tomisich, G., Zhu, Y., Nivison-Smith, L., Fletcher, E.L., Chua, J., Sun, D., and Arunthavasothy, N. (2013). Retinal amino acid neurochemistry in health and disease. *Clinical & experimental optometry* 96, 310-332. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23464379>

Kaplan, H.J., Wang, W., and Dean, D.C. (2017). Restoration of Cone Photoreceptor Function in Retinitis Pigmentosa. *Transl Vis Sci Technol* 6, 5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28900578>

Karali, M., Guadagnino, I., Marrocco, E., De Cegli, R., Carissimo, A., Pizzo, M., Casarosa, S., Conte, I., Surace, E.M., and Banfi, S. (2020). AAV-miR-204 Protects from Retinal Degeneration by Attenuation of Microglia Activation and Photoreceptor Cell Death. *Mol Ther Nucleic Acids* 19, 144-156. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31837604>

Katsanis, N., Beales, P.L., Woods, M.O., Lewis, R.A., Green, J.S., Parfrey, P.S., Ansley, S.J., Davidson, W.S., and Lupski, J.R. (2000). Mutations in MKKS cause obesity, retinal dystrophy and renal malformations associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nature genetics* 26, 67-70. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10973251>

Katz, L.S., Baumel-Alterzon, S., Scott, D.K., and Herman, M.A. (2021). Adaptive and maladaptive roles for ChREBP in the liver and pancreatic islets. *The Journal of biological chemistry* 296, 100623. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33812993>

Kennan, A., Aherne, A., Palfi, A., Humphries, M., McKee, A., Stitt, A., Simpson, D.A., Demtroder, K., Orntoft, T., Ayuso, C., Kenna, P.F., Farrar, G.J., and Humphries, P. (2002). Identification of an IMPDH1 mutation in autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP10) revealed following comparative microarray analysis of transcripts derived from retinas of wild-type and Rho(-/-) mice. *Human molecular genetics* 11, 547-557. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11875049>

Kevany, B.M., and Palczewski, K. (2010). Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors. *Physiology (Bethesda)* 25, 8-15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20134024>

Kiang, A.S., Palfi, A., Ader, M., Kenna, P.F., Millington-Ward, S., Clark, G., Kennan, A., O'Reilly, M., Tam, L.C., Aherne, A., McNally, N., Humphries, P., and Farrar, G.J. (2005). Toward a gene therapy for dominant disease: validation of an RNA interference-based mutation-independent approach. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 12, 555-561. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15967729>

Kim, H.J., Ha, S., Lee, H.Y., and Lee, K.J. (2015). ROSics: chemistry and proteomics of cysteine modifications in redox biology. *Mass spectrometry reviews* 34, 184-208. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24916017>

Kitamura, K., Kangawa, K., Matsuo, H., and Uyeda, K. (1988). Phosphorylation of myocardial fructose-6-phosphate,2-kinase: fructose-2,6-bisphosphatase by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. Activation by phosphorylation and amino acid sequences of the phosphorylation sites. *The Journal of biological chemistry* 263, 16796-16801. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2846551>

Klein, R., Peto, T., Bird, A., and Vannewkirk, M.R. (2004). The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 137, 486-495. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15013873>

Klipfel, L., Cordonnier, M., Thiebault, L., Clerin, E., Blond, F., Millet-Puel, G., Mohand-Said, S., Goureau, O., Sahel, J.A., Nandrot, E.F., and Leveillard, T. (2021). A Splice Variant in SLC16A8 Gene Leads to Lactate Transport Deficit in Human iPS Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells. *Cells* 10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33477551>

Koehn, F.E., and Carter, G.T. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4, 206-220. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15729362>

Koenekoop, R.K., Wang, H., Majewski, J., Wang, X., Lopez, I., Ren, H., Chen, Y., Li, Y., Fishman, G.A., Genead, M., Schwartzentruber, J., Solanki, N., Traboulsi, E.I., Cheng, J., Logan, C.V., McKibbin, M., Hayward, B.E., Parry, D.A., Johnson, C.A., Nageeb, M., Finding of Rare Disease Genes Canada, C., Poulter, J.A., Mohamed, M.D., Jafri, H., Rashid, Y., Taylor, G.R., Keser, V., Mardon, G., Xu, H., Inglehearn, C.F., Fu, Q., Toomes, C., and Chen, R. (2012). Mutations in NMNAT1 cause Leber congenital amaurosis and identify a new disease pathway for retinal degeneration. *Nature genetics* 44, 1035-1039. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22842230>

Kohl, S., Baumann, B., Broghammer, M., Jagle, H., Sieving, P., Kellner, U., Spegal, R., Anastasi, M., Zrenner, E., Sharpe, L.T., and Wissinger, B. (2000). Mutations in the CNGB3 gene encoding the beta-subunit of the cone photoreceptor cGMP-gated channel are responsible for achromatopsia (ACHM3) linked to chromosome 8q21. *Human molecular genetics* 9, 2107-2116. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10958649>

Kohl, S., Marx, T., Giddings, I., Jagle, H., Jacobson, S.G., Apfelstedt-Sylla, E., Zrenner, E., Sharpe, L.T., and Wissinger, B. (1998). Total colourblindness is caused by mutations in the gene encoding the alpha-subunit of the cone photoreceptor cGMP-gated cation channel. *Nature genetics* 19, 257-259. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9662398>

Kolb, H., and Gouras, P. (1974). Electron microscopic observations of human retinitis pigmentosa, dominantly inherited. *Investigative ophthalmology* 13, 487-498. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4365999>

Kole, C., Berdugo, N., Da Silva, C., Ait-Ali, N., Millet-Puel, G., Pagan, D., Blond, F., Poidevin, L., Ripp, R., Fontaine, V., Wincker, P., Zack, D.J., Sahel, J.A., Poch, O., and Leveillard, T. (2016). Identification of an Alternative Splicing Product of the Otx2 Gene Expressed in the Neural Retina and Retinal Pigmented Epithelial Cells. *PLoS One* 11, e0150758. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26985665>

Krebs, H.A. (1927). Über den stoffwechsel der netzhaut. *Biochem Z* 189, 57-59.

Krebs, H.A. (1972). The Pasteur effect and the relations between respiration and fermentation. *Essays in biochemistry* 8, 1-34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4265190>

Krigel, A., Felder-Schmittbuhl, M.P., and Hicks, D. (2010). Circadian-clock driven cone-like photoreceptor phagocytosis in the neural retina leucine zipper gene knockout mouse. *Molecular vision* 16, 2873-2881. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21203345>

Kuipers, D.P., Scripture, J.P., Gunnink, S.M., Salie, M.J., Schotanus, M.P., Ubels, J.L., and Louters, L.L. (2012). Differential regulation of GLUT1 activity in human corneal limbal epithelial cells and fibroblasts. *Biochimie*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23009931>

Kumaran, N., Michaelides, M., Smith, A.J., Ali, R.R., and Bainbridge, J.W.B. (2018). Retinal gene therapy. *Br Med Bull* 126, 13-25. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29506236>

Kuny, S., Cho, W.J., Dimopoulos, I.S., and Sauve, Y. (2015). Early Onset Ultrastructural and Functional Defects in RPE and Photoreceptors of a Stargardt-Like Macular Dystrophy (STGD3) Transgenic Mouse Model. *Invest Ophth Vis Sci* 56, 7109-7121. <Go to ISI>://000368238200016

Lambard, S., Reichman, S., Berlinicke, C., Niepon, M.L., Goureau, O., Sahel, J.A., Leveillard, T., and Zack, D.J. (2010). Expression of rod-derived cone viability factor: dual role of CRX in regulating promoter activity and cell-type specificity. *PLoS One* 5, e13075. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20949100>

Lannuzel, A., Hoglinger, G.U., Verhaeghe, S., Gire, L., Belson, S., Escobar-Khondiker, M., Poullain, P., Oertel, W.H., Hirsch, E.C., Dubois, B., and Ruberg, M. (2007). Atypical parkinsonism in Guadeloupe: a common risk factor for two closely related phenotypes? *Brain* 130, 816-827. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17303592>

LaVail, M.M., Yasumura, D., Matthes, M.T., Drenser, K.A., Flannery, J.G., Lewin, A.S., and Hauswirth, W.W. (2000). Ribozyme rescue of photoreceptor cells in P23H transgenic rats: long-term survival and late-stage therapy. *P Natl Acad Sci USA* 97, 11488-11493. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11005848>

Le, Y.Z., Ash, J.D., Al-Ubaidi, M.R., Chen, Y., Ma, J.X., and Anderson, R.E. (2004). Targeted expression of Cre recombinase to cone photoreceptors in transgenic mice. *Molecular vision* 10, 1011-1018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15635292>

Ledford, H. (2015). Success against blindness encourages gene therapy researchers. *Nature* 526, 487-488. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26490597>

Lee, J.M., Lee, H., Kang, S., and Park, W.J. (2016). Fatty Acid Desaturases, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation, and Biotechnological Advances. *Nutrients* 8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26742061>

Lee, M., Harley, G., Katerelos, M., Gleich, K., Sullivan, M.A., Laskowski, A., Coughlan, M., Fraser, S.A., Mount, P.F., and Power, D.A. (2020). Mutation of regulatory phosphorylation sites in PFKFB2 worsens renal fibrosis. *Scientific reports* 10, 14531. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32884050>

Lehrman, S. (1999). Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature* 401, 517-518. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10524611>

Leiner, M. (1938). Die Augenkienendrüse (Pseudobranchie) der Knochenfische. Experimentelle Untersuchungen über ihre physiologische Bedeutung. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* 26, 416-466. <https://doi.org/10.1007/BF00338941>

Leveillard, T. (2015). Cancer metabolism of cone photoreceptors. *Oncotarget* 6, 32285-32286. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26450906>

Leveillard, T., and Ait-Ali, N. (2017). Cell Signaling with Extracellular Thioredoxin and Thioredoxin-Like Proteins: Insight into Their Mechanisms of Action. *Oxid Med Cell Longev* 2017, 8475125. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29138681>

Leveillard, T., Mohand-Said, S., Lorentz, O., Hicks, D., Fintz, A.C., Clerin, E., Simonutti, M., Forster, V., Cavusoglu, N., Chalmel, F., Dolle, P., Poch, O., Lambrou, G., and Sahel, J.A. (2004). Identification and characterization of rod-derived cone viability factor. *Nature genetics* 36, 755-759. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15220920>

Leveillard, T., Philp, N.J., and Sennlaub, F. (2019). Is Retinal Metabolic Dysfunction at the Center of the Pathogenesis of Age-related Macular Degeneration? *Int J Mol Sci* 20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30754662>

Leveillard, T., and Sahel, J.A. (2010). Rod-derived cone viability factor for treating blinding diseases: from clinic to redox signaling. *Sci Transl Med* 2, 26ps16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20375363>

Leveillard, T., and Sahel, J.A. (2017). Metabolic and redox signaling in the retina. *Cell Mol Life Sci* 74, 3649-3665. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27543457>

Leveillard, T., Van Dorsselaer, A., and Sahel, J.A. (2015). Altruism in the retina: rod feed cones. *Med Sci (Paris)* 31, 828-830. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26481018>

Lewin, A.S., Drenser, K.A., Hauswirth, W.W., Nishikawa, S., Yasumura, D., Flannery, J.G., and LaVail, M.M. (1998). Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nature medicine* 4, 967-971. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9701253>

Li, F., Jiang, D., and Samuel, M.A. (2019). Microglia in the developing retina. *Neural development* 14, 12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31888774>

Li, M.V., Chang, B., Imamura, M., Pongvarin, N., and Chan, L. (2006). Glucose-dependent transcriptional regulation by an evolutionarily conserved glucose-sensing module. *Diabetes* 55, 1179-1189. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16644671>

Li, N., Shi, Z., Tang, Y., Chen, J., and Li, X. (2008). Recent progress on the total synthesis of acetogenins from Annonaceae. *Beilstein J Org Chem* 4, 48. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19190742>

Liang, L., Li, Q., Huang, L., Li, D., and Li, X. (2015). Sirt3 binds to and deacetylates mitochondrial pyruvate carrier 1 to enhance its activity. *Biochemical and biophysical research communications* 468, 807-812. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26577410>

Lin, J.B., Kubota, S., Ban, N., Yoshida, M., Santeford, A., Sene, A., Nakamura, R., Zapata, N., Kubota, M., Tsubota, K., Yoshino, J., Imai, S.I., and Apte, R.S. (2016). NAMPT-Mediated NAD(+) Biosynthesis Is Essential for Vision In Mice. *Cell reports* 17, 69-85. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27681422>

Lipinski, D.M., Barnard, A.R., Singh, M.S., Martin, C., Lee, E.J., Davies, W.I.L., and MacLaren, R.E. (2015). CNTF Gene Therapy Confers Lifelong Neuroprotection in a Mouse Model of Human Retinitis Pigmentosa. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 23, 1308-1319. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25896245>

Lloyd, K.P., Ojelabi, O.A., De Zutter, J.K., and Carruthers, A. (2017). Reconciling contradictory findings: Glucose transporter 1 (GLUT1) functions as an oligomer of allosteric, alternating access transporters. *J Biol Chem* 292, 21035-21046. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29066623>

Lloyd, K.P., Ojelabi, O.A., Simon, A.H., De Zutter, J.K., and Carruthers, A. (2018). Kinetic Basis of Cis- and Trans-Allostery in GLUT1-Mediated Sugar Transport. *The Journal of membrane biology* 251, 131-152. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29209831>

Locker, M., Borday, C., and Perron, M. (2009). Stemness or not stemness? Current status and perspectives of adult retinal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 4, 118-130. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19442196>

Logan, S., Agbaga, M.P., Chan, M.D., Kabir, N., Mandal, N.A., Brush, R.S., and Anderson, R.E. (2013). Deciphering mutant ELOVL4 activity in autosomal-dominant Stargardt macular dystrophy. *P Natl Acad Sci USA* 110, 5446-5451. <Go to ISI>://000318037800051

Lopez-Grueso, M.J., Gonzalez, R., Muntane, J., Barcena, J.A., and Padilla, C.A. (2019). Thioredoxin Downregulation Enhances Sorafenib Effects in Hepatocarcinoma Cells. *Antioxidants (Basel)* 8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31652503>

Lopez, R., Lopez-Gallardo, M., Busturia, I., Anezary, L., and Prada, C. (2005). Spatial and temporal patterns of growth and differentiation of cone oil droplets in the chick retina. *J Neurosci Res* 79, 401-411. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15605374>

Lyor Bouaziz., A. (2014). Identification de métabolites secondaires des plantes, protecteurs des photorécepteurs à cônes pour le traitement de la rétinopathie pigmentaire (Sorbonne Université).

Lyssiotis, C.A., and Cantley, L.C. (2012). SIRT6 puts cancer metabolism in the driver's seat. *Cell* 151, 1155-1156. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23217699>

Lyu, Y., Zauhar, R., Dana, N., Strang, C.E., Hu, J., Wang, K., Liu, S., Pan, N., Gamlin, P., Kimble, J.A., Messinger, J.D., Curcio, C.A., Stambolian, D., and Li, M. (2021). Implication of specific retinal cell-type involvement and gene expression changes in AMD progression using integrative analysis of single-cell and bulk RNA-seq profiling. *Scientific reports* 11, 15612. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34341398>

Ma, H., Butler, M.R., Thapa, A., Belcher, J., Yang, F., Baehr, W., Biel, M., Michalakis, S., and Ding, X.Q. (2015a). cGMP/Protein Kinase G Signaling Suppresses Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Phosphorylation and Promotes Endoplasmic Reticulum Stress in Photoreceptors of Cyclic Nucleotide-gated Channel-deficient Mice. *The Journal of biological chemistry* 290, 20880-20892. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26124274>

Ma, S., Venkatesh, A., Langellotto, F., Le, Y.Z., Hall, M.N., Ruegg, M.A., and Punzo, C. (2015b). Loss of mTOR signaling affects cone function, cone structure and expression of cone specific proteins without affecting cone survival. *Exp Eye Res* 135, 1-13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25887293>

Madhusudhan, T., Wang, H., Ghosh, S., Dong, W., Kumar, V., Al-Dabet, M.M., Manoharan, J., Nazir, S., Elwakiel, A., Bock, F., Kohli, S., Marquardt, A., Sogut, I., Shahzad, K., Muller, A.J., Esmon, C.T., Nawroth, P.P., Reiser, J., Chavakis, T., Ruf, W., and Isermann, B. (2017). Signal integration at the PI3K-p85-XBP1 hub endows coagulation protease activated protein C with insulin-like function. *Blood* 130, 1445-1455. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28687614>

Magaway, C., Kim, E., and Jacinto, E. (2019). Targeting mTOR and Metabolism in Cancer: Lessons and Innovations. *Cells* 8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31817676>

Magovcevic, I., Weremowicz, S., Morton, C.C., Fong, S.L., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (1995). Mapping of the human cone transducin alpha-subunit (GNAT2) gene to 1p13 and negative mutation analysis in patients with Stargardt disease. *Genomics* 25, 288-290. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7774932>

Maguire, A.M., Simonelli, F., Pierce, E.A., Pugh, E.N., Jr., Mingozzi, F., Bennicelli, J., Banfi, S., Marshall, K.A., Testa, F., Surace, E.M., Rossi, S., Lyubarsky, A., Arruda, V.R., Konkle, B., Stone, E., Sun, J., Jacobs, J., Dell'Osso, L., Hertle, R., Ma, J.X., Redmond, T.M., Zhu, X., Hauck, B., Zeleniaia, O., Shindler, K.S., Maguire, M.G., Wright, J.F., Volpe, N.J., McDonnell, J.W., Auricchio, A., High, K.A., and Bennett, J. (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358, 2240-2248. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18441370>

Malanson, K.M., and Lem, J. (2009). Rhodopsin-mediated retinitis pigmentosa. *Prog Mol Biol Transl Sci* 88, 1-31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20374723>

Marcheselli, V.L., Mukherjee, P.K., Arita, M., Hong, S., Antony, R., Sheets, K., Winkler, J.W., Petasis, N.A., Serhan, C.N., and Bazan, N.G. (2010). Neuroprotectin D1/protectin D1 stereoselective and specific binding with human retinal pigment epithelial cells and neutrophils. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 82, 27-34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19931440>

Marigo, V. (2007). Programmed cell death in retinal degeneration: targeting apoptosis in photoreceptors as potential therapy for retinal degeneration. *Cell Cycle* 6, 652-655. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17374995>

Marlhens, F., Bareil, C., Griffoin, J.M., Zrenner, E., Amalric, P., Eliaou, C., Liu, S.Y., Harris, E., Redmond, T.M., Arnaud, B., Claustres, M., and Hamel, C.P. (1997). Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis. *Nature genetics* 17, 139-141. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9326927>

Marshall, E. (1999). Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 286, 2244-2245. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10636774>

Marsin, A.S., Bertrand, L., Rider, M.H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M.F., Van den Berghe, G., Carling, D., and Hue, L. (2000). Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Current biology : CB* 10, 1247-1255. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11069105>

Masaki, S., Hashimoto, K., Kihara, D., Tsuzuki, C., Kataoka, N., and Suzuki, K. (2020). The cysteine residue at 424th of pyruvate kinase M2 is crucial for tetramerization and responsiveness to oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 526, 973-977. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32295714>

Mata, N.L., Radu, R.A., Clemmons, R.C., and Travis, G.H. (2002). Isomerization and oxidation of vitamin a in cone-dominant retinas: a novel pathway for visual-pigment regeneration in daylight. *Neuron* 36, 69-80. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12367507>

Mattapallil, M.J., Wawrousek, E.F., Chan, C.C., Zhao, H., Roychoudhury, J., Ferguson, T.A., and Caspi, R.R. (2012). The Rd8 mutation of the Crb1 gene is present in vendor lines of C57BL/6N mice and embryonic stem cells, and confounds ocular induced mutant phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 2921-2927. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22447858>

Maurer, C.M., Schonthaler, H.B., Mueller, K.P., and Neuhauss, S.C. (2010). Distinct retinal deficits in a zebrafish pyruvate dehydrogenase-deficient mutant. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 11962-11972. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20826660>

Mayer, K., Albrecht, S., and Schaller, A. (2015). Targeted Analysis of Protein Phosphorylation by 2D Electrophoresis. *Methods Mol Biol* 1306, 167-176. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25930702>

McCall, M.A., Gregg, R.G., Merriman, K., Goto, Y., Peachey, N.S., and Stanford, L.R. (1996). Morphological and physiological consequences of the selective elimination of rod photoreceptors in transgenic mice. *Exp Eye Res* 63, 35-50. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8983962>

McFerrin, L.G., and Atchley, W.R. (2012). A novel N-terminal domain may dictate the glucose response of Mondo proteins. *PLoS one* 7, e34803. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22506051>

McLaughlin, M.E., Sandberg, M.A., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (1993). Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nature genetics* 4, 130-134. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8394174>

McMahon, A., and Kedzierski, W. (2010). Polyunsaturated very-long-chain C28-C36 fatty acids and retinal physiology. *The British journal of ophthalmology* 94, 1127-1132. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19666930>

McNay, E.C., and Pearson-Leary, J. (2020). GluT4: A central player in hippocampal memory and brain insulin resistance. *Exp Neurol* 323, 113076. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31614121>

Mei, X., Chaffiol, A., Kole, C., Yang, Y., Millet-Puel, G., Clerin, E., Ait-Ali, N., Bennett, J., Dalkara, D., Sahel, J.A., Duebel, J., and Leveillard, T. (2016). The thioredoxin encoded by the Rod-derived Cone Viability Factor gene protects cone photoreceptors against oxidative stress. *Antioxid Redox Sign.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27025156>

Mendes, H.F., van der Spuy, J., Chapple, J.P., and Cheetham, M.E. (2005). Mechanisms of cell death in rhodopsin retinitis pigmentosa: implications for therapy. *Trends Mol Med* 11, 177-185. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15823756>

Menu dit Huart, L., Lorentz, O., Goureau, O., Leveillard, T., and Sahel, J.A. (2004). DNA repair in the degenerating mouse retina. *Mol Cell Neurosci* 26, 441-449. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15234348>

Miezewska, K., van Veen, T., and Aguirre, G.D. (1993). Structural changes of the interphotoreceptor matrix in an inherited retinal degeneration: a lectin cytochemical study of progressive rod-cone degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 3056-3067. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8407213>

Miller, D.J., Cascio, M.A., and Rosca, M.G. (2020). Diabetic Retinopathy: The Role of Mitochondria in the Neural Retina and Microvascular Disease. *Antioxidants (Basel)* 9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32977483>

Millet-Puel, G., Pinault, M., Cordonnier, M., Fontaine, V., Sahel, J.A., and Leveillard, T. (2021). Cone-Enriched Cultures from the Retina of Chicken Embryos to Study Rod to Cone Cellular Interactions. *J Vis Exp.* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33818576>

Minn, A.H., Couto, F.M., and Shalev, A. (2006). Metabolism-independent sugar effects on gene transcription: the role of 3-O-methylglucose. *Biochemistry* 45, 11047-11051. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16964965>

Mitsui, A., Hamuro, J., Nakamura, H., Kondo, N., Hirabayashi, Y., Ishizaki-Koizumi, S., Hirakawa, T., Inoue, T., and Yodoi, J. (2002). Overexpression of human thioredoxin in transgenic mice controls oxidative stress and life span. *Antioxid Redox Sign* 4, 693-696. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12230882>

Mockel, A., Perdomo, Y., Stutzmann, F., Letsch, J., Marion, V., and Dollfus, H. (2011). Retinal dystrophy in Bardet-Biedl syndrome and related syndromic ciliopathies. *Progress in retinal and eye research* 30, 258-274. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21477661>

Mohand-Said, S., Deudon-Combe, A., Hicks, D., Simonutti, M., Forster, V., Fintz, A.C., Leveillard, T., Dreyfus, H., and Sahel, J.A. (1998). Normal retina releases a diffusible factor stimulating cone survival in the retinal degeneration mouse. *P Natl Acad Sci USA* 95, 8357-8362. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9653191>

Mohand-Said, S., Hicks, D., Dreyfus, H., and Sahel, J.A. (2000). Selective transplantation of rods delays cone loss in a retinitis pigmentosa model. *Arch Ophthalmol* 118, 807-811. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10865319>

Mohand-Said, S., Hicks, D., Simonutti, M., Tran-Minh, D., Deudon-Combe, A., Dreyfus, H., Silverman, M.S., Ogilvie, J.M., Tenkova, T., and Sahel, J. (1997). Photoreceptor transplants increase host cone survival in the retinal degeneration (rd) mouse. *Ophthalmic research* 29, 290-297. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9323720>

Moreno, A.M., Fu, X., Zhu, J., Katrekar, D., Shih, Y.-R.V., Marlett, J., Cabotaje, J., Tat, J., Naughton, J., Lisowski, L., Varghese, S., Zhang, K., and Mali, P. (2018). In Situ Gene Therapy via AAV-CRISPR-Cas9-Mediated Targeted Gene Regulation. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 26, 1818-1827. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29754775>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6035733/>

Morshedean, A., and Fain, G.L. (2015). Single-Photon Sensitivity of Lamprey Rods with Cone-like Outer Segments. *Current Biology* 25, 484-487. <Go to ISI>://000349375900025

Morshedean, A., and Fain, G.L. (2017). The evolution of rod photoreceptors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 372. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28193819>

Mueckler, M., and Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular aspects of medicine* 34, 121-138. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23506862>

Mukherjee, S. (2016). *The Gene: An Intimate History* (Bodley Head).

Nachury, M.V., Loktev, A.V., Zhang, Q., Westlake, C.J., Peranen, J., Merdes, A., Slusarski, D.C., Scheller, R.H., Bazan, J.F., Sheffield, V.C., and Jackson, P.K. (2007). A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell* 129, 1201-1213. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17574030>

Nakamura, T., Oh, C.K., Liao, L., Zhang, X., Lopez, K.M., Gibbs, D., Deal, A.K., Scott, H.R., Spencer, B., Masliah, E., Rissman, R.A., Yates, J.R., 3rd, and Lipton, S.A. (2021). Noncanonical transnitrosylation network contributes to synapse loss in Alzheimer's disease. *Science* 371. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33273062>

Nandrot, E., Dufour, E.M., Provost, A.C., Pequignot, M.O., Bonnel, S., Gogat, K., Marchant, D., Rouillac, C., Sepulchre de Conde, B., Bihoreau, M.T., Shaver, C., Dufier, J.L., Marsac, C., Lathrop, M., Menasche, M., and Abitbol, M.M. (2000). Homozygous deletion in the coding sequence of the c-mer gene in RCS rats unravels general mechanisms of physiological cell adhesion and apoptosis. *Neurobiol Dis* 7, 586-599. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11114258>

Newman, A.M., Gallo, N.B., Hancox, L.S., Miller, N.J., Radeke, C.M., Maloney, M.A., Cooper, J.B., Hageman, G.S., Anderson, D.H., Johnson, L.V., and Radeke, M.J. (2012). Systems-level analysis of age-related macular degeneration reveals global biomarkers and phenotype-specific functional networks. *Genome Med* 4, 16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22364233>

Newton, F., and Megaw, R. (2020). Mechanisms of Photoreceptor Death in Retinitis Pigmentosa. *Genes (Basel)* 11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32987769>

Nguyen-Ba-Charvet, K.T., and Rebsam, A. (2020). Neurogenesis and Specification of Retinal Ganglion Cells. *International journal of molecular sciences* 21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31936811>

Nguyen, L.N., Ma, D., Shui, G., Wong, P., Cazenave-Gassiot, A., Zhang, X., Wenk, M.R., Goh, E.L., and Silver, D.L. (2014). Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature* 509, 503-506. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24828044>

Nickelsen, K. (2018). On Otto Warburg, Nazi Bureaucracy and the difficulties of moral judgment. *Photosynthetica* 56, 75-85. <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0773-0>

Nieto, M.A. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 155-166. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11994736>

Nohl, H., Gille, L., and Staniek, K. (2005). Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochemical pharmacology* 69, 719-723. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15710349>

Novellasdemunt, L., Tato, I., Navarro-Sabate, A., Ruiz-Meana, M., Mendez-Lucas, A., Perales, J.C., Garcia-Dorado, D., Ventura, F., Bartrons, R., and Rosa, J.L. (2013). Akt-dependent activation of the

heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB2) isoenzyme by amino acids. *The Journal of biological chemistry* 288, 10640-10651. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23457334>

O'Reilly, M., Palfi, A., Chadderton, N., Millington-Ward, S., Ader, M., Cronin, T., Tuohy, T., Auricchio, A., Hildinger, M., Tivnan, A., McNally, N., Humphries, M.M., Kiang, A.S., Humphries, P., Kenna, P.F., and Farrar, G.J. (2007). RNA interference-mediated suppression and replacement of human rhodopsin in vivo. *Am J Hum Genet* 81, 127-135. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17564969>

Obituary (1970). Professor Otto Warburg. *Nature* 227, 1378-1378. <https://doi.org/10.1038/2271378a0>

Ochrietor, J.D., Moroz, T.P., van Ekeris, L., Clamp, M.F., Jefferson, S.C., deCarvalho, A.C., Fadool, J.M., Wistow, G., Muramatsu, T., and Linser, P.J. (2003). Retina-specific expression of 5A11/Basigin-2, a member of the immunoglobulin gene superfamily. *Invest Ophth Vis Sci* 44, 4086-4096. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12939332>

Oh, K.T., Longmuir, R., Oh, D.M., Stone, E.M., Kopp, K., Brown, J., Fishman, G.A., Sonkin, P., Gehrs, K.M., and Weleber, R.G. (2003). Comparison of the clinical expression of retinitis pigmentosa associated with rhodopsin mutations at codon 347 and codon 23. *Am J Ophthalmol* 136, 306-313. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12888054>

Oka, S., Hsu, C.P., and Sadoshima, J. (2012). Regulation of cell survival and death by pyridine nucleotides. *Circulation research* 111, 611-627. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22904041>

Okar, D.A., Manzano, A., Navarro-Sabate, A., Riera, L., Bartrons, R., and Lange, A.J. (2001). PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends in biochemical sciences* 26, 30-35. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11165514>

Okawa, H., Sampath, A.P., Laughlin, S.B., and Fain, G.L. (2008). ATP consumption by mammalian rod photoreceptors in darkness and in light. *Current biology : CB* 18, 1917-1921. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19084410>

Omri, S., Omri, B., Savoldelli, M., Jonet, L., Thillaye-Goldenberg, B., Thuret, G., Gain, P., Jeanny, J.C., Crisanti, P., and Behar-Cohen, F. (2010). The outer limiting membrane (OLM) revisited: clinical implications. *Clin Ophthalmol* 4, 183-195. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463783>

Oo, J.A., Irmer, B., Gunther, S., Warwick, T., Palfi, K., Izquierdo Ponce, J., Teichmann, T., Pflugger-Muller, B., Gilsbach, R., Brandes, R.P., and Leisegang, M.S. (2020). ZNF354C is a transcriptional repressor that inhibits endothelial angiogenic sprouting. *Scientific reports* 10, 19079. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33154469>

Osada, H., Toda, E., Homma, K., Guzman, N.A., Nagai, N., Ogawa, M., Negishi, K., Arita, M., Tsubota, K., and Ozawa, Y. (2021). ADIPOR1 deficiency-induced suppression of retinal ELOVL2 and docosahexaenoic acid levels during photoreceptor degeneration and visual loss. *Cell Death Dis* 12, 458. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33963174>

Palmer, B.A., Taylor, G.J., Brumfeld, V., Gur, D., Shemesh, M., Elad, N., Osherov, A., Oron, D., Weiner, S., and Addadi, L. (2017). The image-forming mirror in the eye of the scallop. *Science* 358, 1172-1175. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29191905>

Parikh, H., Carlsson, E., Chutkow, W.A., Johansson, L.E., Storgaard, H., Poulsen, P., Saxena, R., Ladd, C., Schulze, P.C., Mazzini, M.J., Jensen, C.B., Krook, A., Bjornholm, M., Tornqvist, H., Zierath, J.R., Ridderstrale, M., Altshuler, D., Lee, R.T., Vaag, A., Groop, L.C., and Mootha, V.K. (2007). TXNIP regulates peripheral glucose metabolism in humans. *PLoS Med* 4, e158. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17472435>

Park, J., Han, D., Kim, K., Kang, Y., and Kim, Y. (2009). O-GlcNAcylation disrupts glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homo-tetramer formation and mediates its nuclear translocation. *Biochimica et biophysica acta* 1794, 254-262. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19022411>

Park, S., Jeon, J.H., Min, B.K., Ha, C.M., Thoudam, T., Park, B.Y., and Lee, I.K. (2018). Role of the Pyruvate Dehydrogenase Complex in Metabolic Remodeling: Differential Pyruvate Dehydrogenase Complex Functions in Metabolism. *Diabetes Metab J* 42, 270-281. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30136450>

Park, S.W., Zhou, Y., Lee, J., Lu, A., Sun, C., Chung, J., Ueki, K., and Ozcan, U. (2010). The regulatory subunits of PI3K, p85alpha and p85beta, interact with XBP-1 and increase its nuclear translocation. *Nature medicine* 16, 429-437. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20348926>

Patel, U., Boucher, M., de Leseleuc, L., and Visintini, S. (2016). Voretigene Neparvovec: An Emerging Gene Therapy for the Treatment of Inherited Blindness. In *CADTH Issues in Emerging Health Technologies* (Ottawa (ON)), pp. 1-11.

Patra, K.C., and Hay, N. (2014). The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends in biochemical sciences* 39, 347-354. <Go to ISI>://000340075200003

Pauly, D., Agarwal, D., Dana, N., Schafer, N., Biber, J., Wunderlich, K.A., Jabri, Y., Straub, T., Zhang, N.R., Gautam, A.K., Weber, B.H.F., Hauck, S.M., Kim, M., Curcio, C.A., Stambolian, D., Li, M., and Grosche, A. (2019). Cell-Type-Specific Complement Expression in the Healthy and Diseased Retina. *Cell reports* 29, 2835-2848 e2834. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31775049>

Paxton, R.O. (1972). *Paxton's Vichy France: Old Guard and New Order, 1940-1944* (New York: Columbia University Press).

Peichl, L. (2005). Diversity of mammalian photoreceptor properties: adaptations to habitat and lifestyle? *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 287, 1001-1012. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16200646>

Pergner, J., and Kozmik, Z. (2017). Amphioxus photoreceptors - insights into the evolution of vertebrate opsins, vision and circadian rhythmicity. *Int J Dev Biol* 61, 665-681. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29319115>

Perini, E.S., Pessoa, V.F., and Pessoa, D.M. (2009). Detection of fruit by the Cerrado's marmoset (*Callithrix penicillata*): modeling color signals for different background scenarios and ambient light intensities. *Journal of experimental zoology Part A, Ecological genetics and physiology* 311, 289-302. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19296489>

Perrault, I., Hanein, S., Zanlonghi, X., Serre, V., Nicouleau, M., Defoort-Delhemmes, S., Delphin, N., Fares-Taie, L., Gerber, S., Xerri, O., Edelson, C., Goldenberg, A., Duncombe, A., Le Meur, G., Hamel, C., Silva, E., Nitschke, P., Calvas, P., Munnich, A., Roche, O., Dollfus, H., Kaplan, J., and Rozet, J.M. (2012). Mutations in *NMNAT1* cause Leber congenital amaurosis with early-onset severe macular and optic atrophy. *Nature genetics* 44, 975-977. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22842229>

Perrault, I., Rozet, J.M., Calvas, P., Gerber, S., Camuzat, A., Dollfus, H., Chatelin, S., Souied, E., Ghazi, I., Leowski, C., Bonnemaïson, M., Le Paslier, D., Frezal, J., Dufier, J.L., Pittler, S., Munnich, A., and Kaplan, J. (1996). Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's congenital amaurosis. *Nature genetics* 14, 461-464. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8944027>

Perrone, L., Devi, T.S., Hosoya, K.I., Terasaki, T., and Singh, L.P. (2010). Inhibition of TXNIP expression in vivo blocks early pathologies of diabetic retinopathy. *Cell Death Dis* 1, e65. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21364670>

Petersen-Jones, S.M., Occelli, L.M., Winkler, P.A., Lee, W., Sparrow, J.R., Tsukikawa, M., Boye, S.L., Chiodo, V., Capasso, J.E., Becirovic, E., Schon, C., Seeliger, M.W., Levin, A.V., Michalakakis, S., Hauswirth, W.W., and Tsang, S.H. (2018). Patients and animal models of CNGbeta1-deficient retinitis pigmentosa support gene augmentation approach. *The Journal of clinical investigation* 128, 190-206. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29202463>

Petit, L., and Punzo, C. (2015). mTORC1 sustains vision in retinitis pigmentosa. *Oncotarget* 6, 16786-16787. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26220206>

Petrie, J.L., Al-Oanzi, Z.H., Arden, C., Tudhope, S.J., Mann, J., Kieswich, J., Yaqoob, M.M., Towle, H.C., and Agius, L. (2013). Glucose induces protein targeting to glycogen in hepatocytes by fructose 2,6-bisphosphate-mediated recruitment of MondoA to the promoter. *Molecular and cellular biology* 33, 725-738. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23207906>

Picard, E., Jonet, L., Sergeant, C., Vesvres, M.H., Behar-Cohen, F., Courtois, Y., and Jeanny, J.C. (2010). Overexpressed or intraperitoneally injected human transferrin prevents photoreceptor degeneration in rd10 mice. *Molecular vision* 16, 2612-2625. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21179240>

Pillay, C.S., Eagling, B.D., Driscoll, S.R., and Rohwer, J.M. (2016). Quantitative measures for redox signaling. *Free radical biology & medicine* 96, 290-303. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27151506>

Poche, R.A., and Reese, B.E. (2009). Retinal horizontal cells: challenging paradigms of neural development and cancer biology. *Development* 136, 2141-2151. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19502480>

Portera-Cailliau, C., Sung, C.H., Nathans, J., and Adler, R. (1994). Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *P Natl Acad Sci USA* 91, 974-978. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8302876>

Punzo, C., Kornacker, K., and Cepko, C.L. (2009). Stimulation of the insulin/mTOR pathway delays cone death in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Nat Neurosci* 12, 44-52. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19060896>

Qu, X., Sun, J., Zhang, Y., Li, J., Hu, J., Li, K., Gao, L., and Shen, L. (2018). c-Myc-driven glycolysis via TXNIP suppression is dependent on glutaminase-MondoA axis in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 504, 415-421. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30103944>

Radi, E., Formichi, P., Battisti, C., and Federico, A. (2014). Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis* 42 Suppl 3, S125-152. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25056458>

Rajala, A., Dighe, R., Agbaga, M.P., Anderson, R.E., and Rajala, R.V. (2013). Insulin receptor signaling in cones. *The Journal of biological chemistry* 288, 19503-19515. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23673657>

Rajala, A., Wang, Y., Brush, R.S., Tsantilas, K., Jankowski, C.S.R., Lindsay, K.J., Linton, J.D., Hurley, J.B., Anderson, R.E., and Rajala, R.V.S. (2018a). Pyruvate kinase M2 regulates photoreceptor structure, function, and viability. *Cell Death Dis* 9, 240. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29445082>

Rajala, A., Wang, Y., Soni, K., and Rajala, R.V.S. (2018b). Pyruvate kinase M2 isoform deletion in cone photoreceptors results in age-related cone degeneration. *Cell Death Dis* 9, 737. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29970877>

Rajala, R.V. (2010). Phosphoinositide 3-kinase signaling in the vertebrate retina. *Journal of lipid research* 51, 4-22. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19638643>

Rajala, R.V., Ranjo-Bishop, M., Wang, Y., Rajala, A., and Anderson, R.E. (2015). The p110alpha isoform of phosphoinositide 3-kinase is essential for cone photoreceptor survival. *Biochimie* 112, 35-40. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25742742>

Rajala, R.V.S. (2020). Aerobic Glycolysis in the Retina: Functional Roles of Pyruvate Kinase Isoforms. *Front Cell Dev Biol* 8, 266. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32426353>

Rao, G.N., and Cotlier, E. (1984). Urea cycle enzymes in retina, ciliary body-iris, lens and senile cataracts. *Exp Eye Res* 39, 483-495. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6499961>

Redmond, T.M., Yu, S., Lee, E., Bok, D., Hamasaki, D., Chen, N., Goletz, P., Ma, J.X., Crouch, R.K., and Pfeifer, K. (1998). Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nature genetics* 20, 344-351. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9843205>

Reichman, S., Kalathur, R.K., Lambard, S., Ait-Ali, N., Yang, Y., Lardenois, A., Ripp, R., Poch, O., Zack, D.J., Sahel, J.A., and Leveillard, T. (2010). The homeobox gene CHX10/VSX2 regulates RdCVF promoter activity in the inner retina. *Hum Mol Genet* 19, 250-261. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19843539>

Reidel, B., Thompson, J.W., Farsiu, S., Moseley, M.A., Skiba, N.P., and Arshavsky, V.Y. (2011). Proteomic profiling of a layered tissue reveals unique glycolytic specializations of photoreceptor cells. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 10, M110 002469. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21173383>

Ren, X., Zou, L., Lu, J., and Holmgren, A. (2018). Selenocysteine in mammalian thioredoxin reductase and application of ebselen as a therapeutic. *Free radical biology & medicine* 127, 238-247. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29807162>

Ren, X., Zou, L., Zhang, X., Branco, V., Wang, J., Carvalho, C., Holmgren, A., and Lu, J. (2017). Redox Signaling Mediated by Thioredoxin and Glutathione Systems in the Central Nervous System. *Antioxid Redox Sign* 27, 989-1010. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28443683>

Rice, D.S., Calandria, J.M., Gordon, W.C., Jun, B., Zhou, Y., Gelfman, C.M., Li, S., Jin, M., Knott, E.J., Chang, B., Abuin, A., Issa, T., Potter, D., Platt, K.A., and Bazan, N.G. (2015). Adiponectin receptor 1

conserves docosahexaenoic acid and promotes photoreceptor cell survival. *Nat Commun* 6, 6228. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25736573>

Richards, P., Ourabah, S., Montagne, J., Burnol, A.F., Postic, C., and Guilmeau, S. (2017). MondoA/ChREBP: The usual suspects of transcriptional glucose sensing; Implication in pathophysiology. *Metabolism* 70, 133-151. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28403938>

Rider, M.H., Bertrand, L., Vertommen, D., Michels, P.A., Rousseau, G.G., and Hue, L. (2004). 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *The Biochemical journal* 381, 561-579. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15170386>

Rider, M.H., and Hue, L. (1984). Activation of rat heart phosphofructokinase-2 by insulin in vivo. *FEBS Lett* 176, 484-488. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6237934>

Rider, M.H., van Damme, J., Vertommen, D., Michel, A., Vandekerckhove, J., and Hue, L. (1992). Evidence for new phosphorylation sites for protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase in bovine heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *FEBS Lett* 310, 139-142. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1327869>

Rigoulet, M., Bouchez, C.L., Paumard, P., Ransac, S., Cuvellier, S., Duvezin-Caubet, S., Mazat, J.P., and Devin, A. (2020). Cell energy metabolism: An update. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1861, 148276. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32717222>

Ristow, M., Zarse, K., Oberbach, A., Klötting, N., Birringer, M., Kiehntopf, M., Stumvoll, M., Kahn, C.R., and Bluher, M. (2009). Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *P Natl Acad Sci USA* 106, 8665-8670. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19433800>

Rofagha, S., Bhisitkul, R.B., Boyer, D.S., Sadda, S.R., Zhang, K., and Group, S.-U.S. (2013). Seven-year outcomes in ranibizumab-treated patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON: a multicenter cohort study (SEVEN-UP). *Ophthalmology* 120, 2292-2299. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23642856>

Ros, S., and Schulze, A. (2013). Balancing glycolytic flux: the role of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatases in cancer metabolism. *Cancer Metab* 1, 8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24280138>

Rose, A.M., and Bhattacharya, S.S. (2016). Variant haploinsufficiency and phenotypic non-penetrance in PRPF31-associated retinitis pigmentosa. *Clinical genetics*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26853529>

Rosenberg, T., Haim, M., Piczenik, Y., and Simonsen, S.E. (1991). Autosomal dominant stationary night-blindness. A large family rediscovered. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 69, 694-702. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1789082>

Rosenfeld, P.J., Cowley, G.S., McGee, T.L., Sandberg, M.A., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (1992). A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nature genetics* 1, 209-213. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1303237>

Roska, B., and Sahel, J.A. (2018). Restoring vision. *Nature* 557, 359-367. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29769667>

Ross, J.W., Fernandez de Castro, J.P., Zhao, J., Samuel, M., Walters, E., Rios, C., Bray-Ward, P., Jones, B.W., Marc, R.E., Wang, W., Zhou, L., Noel, J.M., McCall, M.A., DeMarco, P.J., Prather, R.S., and Kaplan, H.J. (2012). Generation of an inbred miniature pig model of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalm Vis Sci* 53, 501-507. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22247487>

Roy, A., Tolone, A., Hilhorst, R., Groten, J., Tomar, T., and Durand, F.-P. (2021). Kinase activity profiling identifies putative downstream targets of cGMP/PKG signaling in inherited retinal neurodegeneration. *bioRxiv*, 2021.2009.2010.459762. <https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2021/09/11/2021.09.10.459762.full.pdf>

Ruan, H.B., Singh, J.P., Li, M.D., Wu, J., and Yang, X. (2013). Cracking the O-GlcNAc code in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 24, 301-309. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23647930>

Rubartelli, A., Bajetto, A., Allavena, G., Wollman, E., and Sitia, R. (1992). Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway. *The Journal of biological chemistry* 267, 24161-24164. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1332947>

Russell, S., Bennett, J., Wellman, J.A., Chung, D.C., Yu, Z.F., Tillman, A., Wittes, J., Pappas, J., Elci, O., McCague, S., Cross, D., Marshall, K.A., Walshire, J., Kehoe, T.L., Reichert, H., Davis, M., Raffini, L., George, L.A., Hudson, F.P., Dingfield, L., Zhu, X., Haller, J.A., Sohn, E.H., Mahajan, V.B., Pfeifer, W., Weckmann, M., Johnson, C., Gewaily, D., Drack, A., Stone, E., Wachtel, K., Simonelli, F., Leroy, B.P., Wright, J.F., High, K.A., and Maguire, A.M. (2017). Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 390, 849-860. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28712537>

Ryan, S.J. (2006). *Retina*, 4th edn (Philadelphia: Elsevier Mosby).

Sahel, J.A., Leveillard, T., Picaud, S., Dalkara, D., Marazova, K., Safran, A., Paques, M., Duebel, J., Roska, B., and Mohand-Said, S. (2013). Functional rescue of cone photoreceptors in retinitis pigmentosa. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 251, 1669-1677. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23575948>

Saino-Saito, S., Nourani, R.M., Iwasa, H., Kondo, H., and Owada, Y. (2009). Discrete localization of various fatty-acid-binding proteins in various cell populations of mouse retina. *Cell Tissue Res* 338, 191-201. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19763623>

Salie, M.J., Oram, D.S., Kuipers, D.P., Scripture, J.P., Chenge, J., MacDonald, G.J., and Louters, L.L. (2012). Nitroxyl (HNO) acutely activates the glucose uptake activity of GLUT1. *Biochimie* 94, 864-869. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22182490>

Samardzija, M., Wenzel, A., Thiersch, M., Frigg, R., Reme, C., and Grimm, C. (2006). Caspase-1 ablation protects photoreceptors in a model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 5181-5190. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17122101>

Sanchez-Chavez, G., Pena-Rangel, M.T., Riesgo-Escovar, J.R., Martinez-Martinez, A., and Salceda, R. (2012). Insulin stimulated-glucose transporter Glut 4 is expressed in the retina. *PLoS one* 7, e52959. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23285235>

Sanges, D., Comitato, A., Tamaro, R., and Marigo, V. (2006). Apoptosis in retinal degeneration involves cross-talk between apoptosis-inducing factor (AIF) and caspase-12 and is blocked by calpain inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 17366-17371. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17088543>

SanGiovanni, J.P., and Chew, E.Y. (2005). The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Progress in retinal and eye research* 24, 87-138. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15555528>

Sans, C.L., Satterwhite, D.J., Stoltzman, C.A., Breen, K.T., and Ayer, D.E. (2006). MondoA-Mlx heterodimers are candidate sensors of cellular energy status: mitochondrial localization and direct regulation of glycolysis. *Molecular and cellular biology* 26, 4863-4871. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16782875>

Sanz, A. (2016). Mitochondrial reactive oxygen species: Do they extend or shorten animal lifespan? *Biochimica et biophysica acta*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26997500>

Sarks, S.H. (1976). Ageing and degeneration in the macular region: a clinico-pathological study. *The British journal of ophthalmology* 60, 324-341. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/952802>

Sawa, A., Khan, A.A., Hester, L.D., and Snyder, S.H. (1997). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11669-11674. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9326668>

Scerri, T.S., Quagliari, A., Cai, C., Zernant, J., Matsunami, N., Baird, L., Schepke, L., Bonelli, R., Yannuzzi, L.A., Friedlander, M., MacTel Project, C., Egan, C.A., Fruttiger, M., Leppert, M., Allikmets, R., and Bahlo, M. (2017). Genome-wide analyses identify common variants associated with macular telangiectasia type 2. *Nature genetics* 49, 559-567. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28250457>

Schell, J.C., and Rutter, J. (2013). The long and winding road to the mitochondrial pyruvate carrier. *Cancer Metab* 1, 6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24280073>

Schubert, D. (2005). Glucose metabolism and Alzheimer's disease. *Ageing research reviews* 4, 240-257. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15950548>

Scott, P.A., de Castro, J.P., DeMarco, P.J., Ross, J.W., Njoka, J., Walters, E., Prather, R.S., McCall, M.A., and Kaplan, H.J. (2017). Progression of Pro23His Retinopathy in a Miniature Swine Model of Retinitis Pigmentosa. *Transl Vis Sci Technol* 6, 4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28316877>

Sengupta, R., and Holmgren, A. (2014). Thioredoxin and glutaredoxin-mediated redox regulation of ribonucleotide reductase. *World journal of biological chemistry* 5, 68-74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24600515>

Shahid, H., Khan, J.C., Cipriani, V., Sepp, T., Matharu, B.K., Bunce, C., Harding, S.P., Clayton, D.G., Moore, A.T., Yates, J.R., and Genetic Factors in, A.M.D.S.G. (2012). Age-related macular degeneration: the importance of family history as a risk factor. *The British journal of ophthalmology* 96, 427-431. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21865200>

Simon, M.V., Agnolazza, D.L., German, O.L., Garelli, A., Politi, L.E., Agbaga, M.P., Anderson, R.E., and Rotstein, N.P. (2016). Synthesis of docosahexaenoic acid from eicosapentaenoic acid in retina neurons protects photoreceptors from oxidative stress. *Journal of neurochemistry* 136, 931-946. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26662863>

Singh, C., Hoppe, G., Tran, V., McCollum, L., Bolok, Y., Song, W., Sharma, A., Brunengraber, H., and Sears, J.E. (2019). Serine and 1-carbon metabolism are required for HIF-mediated protection against retinopathy of prematurity. *JCI Insight* 4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31341109>

Smathers, R.L., and Petersen, D.R. (2011). The human fatty acid-binding protein family: evolutionary divergences and functions. *Human genomics* 5, 170-191. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21504868>

Snyder, C. (1963). Jean Nougaret, the butcher from Provence, and his family. *Arch Ophthalmol* 69, 676-678. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13989730>

Sola-Penna, M., Da Silva, D., Coelho, W.S., Marinho-Carvalho, M.M., and Zancan, P. (2010). Regulation of mammalian muscle type 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for the control of the metabolism. *IUBMB Life* 62, 791-796. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21117169>

Song, Z., Yang, H., Zhou, L., and Yang, F. (2019). Glucose-Sensing Transcription Factor MondoA/ChREBP as Targets for Type 2 Diabetes: Opportunities and Challenges. *Int J Mol Sci* 20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31623194>

Stoltzman, C.A., Peterson, C.W., Breen, K.T., Muoio, D.M., Billin, A.N., and Ayer, D.E. (2008). Glucose sensing by MondoA: Mlx complexes: a role for hexokinases and direct regulation of thioredoxin-interacting protein expression. *P Natl Acad Sci USA* 105, 6912-6917. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18458340>

Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Weinman, S. (2003). *Biochimie trad. de l'américain*, [5e éd.] par Serge Weinman, 5e éd. edn (Paris: Flammarion médecine-sciences).

Sugasawa, K., Deguchi, J., Okami, T., Yamamoto, A., Omori, K., Uyama, M., and Tashiro, Y. (1994). Immunocytochemical analyses of distributions of Na, K-ATPase and GLUT1, insulin and transferrin receptors in the developing retinal pigment epithelial cells. *Cell Struct Funct* 19, 21-28. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8069944>

Sullivan, W.J., Mullen, P.J., Schmid, E.W., Flores, A., Momcilovic, M., Sharpley, M.S., Jelinek, D., Whiteley, A.E., Maxwell, M.B., Wilde, B.R., Banerjee, U., Collier, H.A., Shackelford, D.B., Braas, D., Ayer, D.E., de Aguiar Vallim, T.Q., Lowry, W.E., and Christofk, H.R. (2018). Extracellular Matrix Remodeling Regulates Glucose Metabolism through TXNIP Destabilization. *Cell* 175, 117-132 e121. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30197082>

Sun, L., Zeng, X., Yan, C., Sun, X., Gong, X., Rao, Y., and Yan, N. (2012). Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1-4. *Nature* 490, 361-366. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23075985>

Suzuki, K., Tsunekawa, Y., Hernandez-Benitez, R., Wu, J., Zhu, J., Kim, E.J., Hatanaka, F., Yamamoto, M., Araoka, T., Li, Z., Kurita, M., Hishida, T., Li, M., Aizawa, E., Guo, S., Chen, S., Goebel, A., Soligalla, R.D., Qu, J., Jiang, T., Fu, X., Jafari, M., Esteban, C.R., Berggren, W.T., Lajara, J., Nunez-Delgado, E., Guillen, P., Campistol, J.M., Matsuzaki, F., Liu, G.H., Magistretti, P., Zhang, K., Callaway, E.M., Zhang, K., and Belmonte, J.C. (2016). In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature* 540, 144-149. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27851729>

Swain, P.K., Chen, S., Wang, Q.L., Affatigato, L.M., Coats, C.L., Brady, K.D., Fishman, G.A., Jacobson, S.G., Swaroop, A., Stone, E., Sieving, P.A., and Zack, D.J. (1997). Mutations in the cone-rod homeobox

gene are associated with the cone-rod dystrophy photoreceptor degeneration. *Neuron* 19, 1329-1336. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9427255>

Swarup, A., Samuels, I.S., Bell, B.A., Han, J.Y.S., Du, J., Massenzio, E., Abel, E.D., Boesze-Battaglia, K., Peachey, N.S., and Philp, N.J. (2019). Modulating GLUT1 expression in retinal pigment epithelium decreases glucose levels in the retina: impact on photoreceptors and Muller glial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 316, C121-C133. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30462537>

Takahashi, V.K.L., Takiuti, J.T., Jauregui, R., and Tsang, S.H. (2018). Gene therapy in inherited retinal degenerative diseases, a review. *Ophthalmic Genet* 39, 560-568. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30040511>

Tanito, M., Elliott, M.H., Kotake, Y., and Anderson, R.E. (2005). Protein modifications by 4-hydroxynonenal and 4-hydroxyhexenal in light-exposed rat retina. *Investigative ophthalmology & visual science* 46, 3859-3868. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16186375>

Taylor, E.B. (2017). Functional Properties of the Mitochondrial Carrier System. *Trends in cell biology* 27, 633-644. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28522206>

Thompson, D.A., and Gal, A. (2003). Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium: genes, mutations, and diseases. *Progress in retinal and eye research* 22, 683-703. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12892646>

tom Dieck, S., and Brandstatter, J.H. (2006). Ribbon synapses of the retina. *Cell Tissue Res* 326, 339-346. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16775698>

Tossounian, M.A., Zhang, B., and Gout, I. (2020). The Writers, Readers, and Erasers in Redox Regulation of GAPDH. *Antioxidants (Basel)* 9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33339386>

Trapani, I., and Auricchio, A. (2019). Has retinal gene therapy come of age? From bench to bedside and back to bench. *Human molecular genetics* 28, R108-R118. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31238338>

Trojan, P., Krauss, N., Choe, H.W., Giessl, A., Pulvermuller, A., and Wolfrum, U. (2008). Centrin in retinal photoreceptor cells: regulators in the connecting cilium. *Progress in retinal and eye research* 27, 237-259. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18329314>

Tso, M.O., Li, W.W., Zhang, C., Lam, T.T., Hao, Y., Petters, R.M., and Wong, F. (1997). A pathologic study of degeneration of the rod and cone populations of the rhodopsin Pro347Leu transgenic pigs. *Trans Am Ophthalmol Soc* 95, 467-479; discussion 479-483. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9440185>

Tsubaki, H., Tooyama, I., and Walker, D.G. (2020). Thioredoxin-Interacting Protein (TXNIP) with Focus on Brain and Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* 21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33302545>

Turner, D.L., and Cepko, C.L. (1987). A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 328, 131-136. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3600789>

Urbano, A.M. (2021). Otto Warburg: The journey towards the seminal discovery of tumor cell bioenergetic reprogramming. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1867, 165965. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32949769>

Uren, P.J., Lee, J.T., Doroudchi, M.M., Smith, A.D., and Horsager, A. (2014). A profile of transcriptomic changes in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa. *Molecular vision* 20, 1612-1628. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25489233>

Usukura, J., Khoo, W., Abe, T., Breitman, M.L., and Shinohara, T. (1994). Cone cells fail to develop normally in transgenic mice showing ablation of rod photoreceptor cells. *Cell Tissue Res* 275, 79-90. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8118849>

Vagni, P., Perlini, L.E., Chenais, N.A.L., Marchetti, T., Parrini, M., Contestabile, A., Cancedda, L., and Ghezzi, D. (2019). Gene Editing Preserves Visual Functions in a Mouse Model of Retinal Degeneration. *Front Neurosci* 13, 945. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31551698>

Van Schaftingen, E., Lederer, B., Bartrons, R., and Hers, H.G. (1982). A kinetic study of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. Application to a microassay of fructose 2,6-bisphosphate. *Eur J Biochem* 129, 191-195. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6297885>

Vaupel, P., and Multhoff, G. (2021). Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *J Physiol* 599, 1745-1757. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33347611>

Veraszto, C., Guhmann, M., Jia, H., Rajan, V.B.V., Bezares-Calderon, L.A., Pineiro-Lopez, C., Randel, N., Shahidi, R., Michiels, N.K., Yokoyama, S., Tessmar-Raible, K., and Jekely, G. (2018). Ciliary and rhabdomic photoreceptor-cell circuits form a spectral depth gauge in marine zooplankton. *eLife* 7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29809157>

Vergara, M.N., Gutierrez, C., and Canto-Soler, M.V. (2015). Efficient Gene Transfer in Chick Retinas for Primary Cell Culture Studies: An Ex-ovo Electroporation Approach. *J Vis Exp*, e52002. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26556302>

Viringipurampeer, I.A., Gregory-Evans, C.Y., Metcalfe, A.L., Bashar, E., Moritz, O.L., and Gregory-Evans, K. (2019). Cell Death Pathways in Mutant Rhodopsin Rat Models Identifies Genotype-Specific Targets Controlling Retinal Degeneration. *Molecular neurobiology* 56, 1637-1652. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29911255>

Vithana, E.N., Abu-Safieh, L., Allen, M.J., Carey, A., Papaioannou, M., Chakarova, C., Al-Maghteh, M., Ebenezer, N.D., Willis, C., Moore, A.T., Bird, A.C., Hunt, D.M., and Bhattacharya, S.S. (2001). A human homolog of yeast pre-mRNA splicing gene, PRP31, underlies autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19q13.4 (RP11). *Molecular cell* 8, 375-381. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11545739>

Voaden, M.J., and Morjaria, B. (1980). The synthesis of neuroactive amino acids from radioactive glucose and glutamine in the rat retina: effects of light stimulation. *Journal of neurochemistry* 35, 95-99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6108992>

Volland, S., Hughes, L.C., Kong, C., Burgess, B.L., Linberg, K.A., Luna, G., Zhou, Z.H., Fisher, S.K., and Williams, D.S. (2015). Three-dimensional organization of nascent rod outer segment disk membranes. *P Natl Acad Sci USA* 112, 14870-14875. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26578801>

Wahid, M., Ali, A., Saqib, F., Aleem, A., Bibi, S., Afzal, K., Ali, A., Baig, A., Khan, S.A., and Bin Asad, M.H.H. (2020). Pharmacological exploration of traditional plants for the treatment of neurodegenerative disorders. *Phytother Res* 34, 3089-3112. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32478964>

Wald, G. (1933). Vitamin A in the Retina. *Nature* 132, 316-317. <https://doi.org/10.1038/132316a0>

Wang, N., and Anderson, R.E. (1993). Synthesis of docosahexaenoic acid by retina and retinal pigment epithelium. *Biochemistry* 32, 13703-13709. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7903049>

Wang, S.K., Xue, Y., and Cepko, C.L. (2020). Microglia modulation by TGF-beta1 protects cones in mouse models of retinal degeneration. *The Journal of clinical investigation* 130, 4360-4369. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32352930>

Wang, S.K., Xue, Y., Rana, P., Hong, C.M., and Cepko, C.L. (2019a). Soluble CX3CL1 gene therapy improves cone survival and function in mouse models of retinitis pigmentosa. *P Natl Acad Sci USA* 116, 10140-10149. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31036641>

Wang, X., Liu, X., Ren, Y., Liu, Y., Han, S., Zhao, J., Gou, X., and He, Y. (2019b). PEDF protects human retinal pigment epithelial cells against oxidative stress via upregulation of UCP2 expression. *Mol Med Rep* 19, 59-74. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30431098>

Wang, X.T., Mion, B., Aherne, A., and Engel, P.C. (2011). Molecular recruitment as a basis for negative dominant inheritance? propagation of misfolding in oligomers of IMPDH1, the mutated enzyme in the RP10 form of retinitis pigmentosa. *Biochimica et biophysica acta* 1812, 1472-1476. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21791244>

Warburg, O. (1925). The Metabolism of Carcinoma Cells. *The Journal of Cancer Research* 9, 148-163. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/jcanres/9/1/148.full.pdf>

Weil, D., Blanchard, S., Kaplan, J., Guilford, P., Gibson, F., Walsh, J., Mburu, P., Varela, A., LeVilliers, J., Weston, M.D., and et al. (1995). Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature* 374, 60-61. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7870171>

Weleber, R.G., and Gregory-Evans, K. (2006). Chapter 17 - Retinitis Pigmentosa and Allied Disorders A2 - Ryan, Stephen J. In *Retina (Fourth Edition)*, D.R. Hinton, A.P. Schachat, and C.P. Wilkinson, eds. (Edinburgh: Mosby), pp. 395-498.

Wilde, B.R., Ye, Z., Lim, T.Y., and Ayer, D.E. (2019). Cellular acidosis triggers human MondoA transcriptional activity by driving mitochondrial ATP production. *eLife* 8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30717828>

Wilkinson, C.P., Hinton, D.R., Sadda, S.R., and Wiedemann, P. (2017). *Ryan's Retina E-Book* (Elsevier Health Sciences).

Winkler, B.S. (1981). Glycolytic and oxidative metabolism in relation to retinal function. *J Gen Physiol* 77, 667-692. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6267165>

Winkler, B.S. (1989). Retinal aerobic glycolysis revisited. *Invest Ophth Vis Sci* 30, 1023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2732017>

Winkler, B.S., Arnold, M.J., Brassell, M.A., and Puro, D.G. (2000). Energy metabolism in human retinal Muller cells. *Invest Ophth Vis Sci* 41, 3183-3190. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10967082>

Winkler, B.S., Arnold, M.J., Brassell, M.A., and Sliter, D.R. (1997a). Glucose dependence of glycolysis, hexose monophosphate shunt activity, energy status, and the polyol pathway in retinas isolated from normal (nondiabetic) rats. *Invest Ophth Vis Sci* 38, 62-71. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9008631>

Winkler, B.S., Boulton, M.E., Gottsch, J.D., and Sternberg, P. (1999). Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Molecular vision* 5, 32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10562656>

Winkler, B.S., Dang, L., Malinoski, C., and Easter, S.S., Jr. (1997b). An assessment of rat photoreceptor sensitivity to mitochondrial blockade. *Invest Ophth Vis Sci* 38, 1569-1577. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9224285>

Winkler, B.S., and Giblin, F.J. (1983). Glutathione oxidation in retina: effects on biochemical and electrical activities. *Experimental eye research* 36, 287-297. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6825742>

Winkler, B.S., Sauer, M.W., and Starnes, C.A. (2003). Modulation of the Pasteur effect in retinal cells: implications for understanding compensatory metabolic mechanisms. *Exp Eye Res* 76, 715-723. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12742354>

Winkler, B.S., Starnes, C.A., Twardy, B.S., Brault, D., and Taylor, R.C. (2008). Nuclear magnetic resonance and biochemical measurements of glucose utilization in the cone-dominant ground squirrel retina. *Invest Ophth Vis Sci* 49, 4613-4619. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18566456>

Wong, B.H., Chan, J.P., Cazenave-Gassiot, A., Poh, R.W., Foo, J.C., Galam, D.L., Ghosh, S., Nguyen, L.N., Barathi, V.A., Yeo, S.W., Luu, C.D., Wenk, M.R., and Silver, D.L. (2016). Mfsd2a Is a Transporter for the Essential omega-3 Fatty Acid Docosahexaenoic Acid (DHA) in Eye and Is Important for Photoreceptor Cell Development. *The Journal of biological chemistry* 291, 10501-10514. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27008858>

Wong, F., and Kwok, S.Y. (2016). The Survival of Cone Photoreceptors in Retinitis Pigmentosa. *JAMA ophthalmology* 134, 249-250. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26747298>

Wright, A.F. (1997). A searchlight through the fog. *Nature genetics* 17, 132-134. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9326923>

Wright, C.B., Redmond, T.M., and Nickerson, J.M. (2015). A History of the Classical Visual Cycle. *Prog Mol Biol Transl Sci* 134, 433-448. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26310169>

Wu, K.C., Chen, X.J., Jin, G.H., Wang, X.Y., Yang, D.D., Li, Y.P., Xiang, L., Zhang, B.W., Zhou, G.H., Zhang, C.J., and Jin, Z.B. (2019). Deletion of miR-182 Leads to Retinal Dysfunction in Mice. *Invest Ophth Vis Sci* 60, 1265-1274. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30924851>

Xiong, W., MacColl Garfinkel, A.E., Li, Y., Benowitz, L.I., and Cepko, C.L. (2015). NRF2 promotes neuronal survival in neurodegeneration and acute nerve damage. *The Journal of clinical investigation* 125, 1433-1445. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25798616>

Xiong, Y., Uys, J.D., Tew, K.D., and Townsend, D.M. (2011). S-glutathionylation: from molecular mechanisms to health outcomes. *Antioxid Redox Sign* 15, 233-270. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21235352>

Xu, X.L., Fang, Y., Lee, T.C., Forrest, D., Gregory-Evans, C., Almeida, D., Liu, A., Jhanwar, S.C., Abramson, D.H., and Cobrinik, D. (2009). Retinoblastoma has properties of a cone precursor tumor and depends

upon cone-specific MDM2 signaling. *Cell* 137, 1018-1031. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19524506>

Xue, Y., Wang, S.K., Rana, P., West, E.R., Hong, C.M., Feng, H., Wu, D.M., and Cepko, C.L. (2021). AAV-Txnip prolongs cone survival and vision in mouse models of retinitis pigmentosa. *Elife* 10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33847261>

Yang, A.C., Stevens, M.Y., Chen, M.B., Lee, D.P., Stahli, D., Gate, D., Contrepois, K., Chen, W., Iram, T., Zhang, L., Vest, R.T., Chaney, A., Lehallier, B., Olsson, N., du Bois, H., Hsieh, R., Cropper, H.C., Berdnik, D., Li, L., Wang, E.Y., Traber, G.M., Bertozzi, C.R., Luo, J., Snyder, M.P., Elias, J.E., Quake, S.R., James, M.L., and Wyss-Coray, T. (2020). Physiological blood-brain transport is impaired with age by a shift in transcytosis. *Nature* 583, 425-430. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32612231>

Yang, Y., Mohand-Said, S., Danan, A., Simonutti, M., Fontaine, V., Clerin, E., Picaud, S., Leveillard, T., and Sahel, J.A. (2009). Functional cone rescue by RdCVF protein in a dominant model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther* 17, 787-795. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19277021>

Yang, Z., Camp, N.J., Sun, H., Tong, Z., Gibbs, D., Cameron, D.J., Chen, H., Zhao, Y., Pearson, E., Li, X., Chien, J., Dewan, A., Harmon, J., Bernstein, P.S., Shridhar, V., Zabriskie, N.A., Hoh, J., Howes, K., and Zhang, K. (2006). A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science* 314, 992-993. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17053109>

Yoshihara, E. (2020). TXNIP/TBP-2: A Master Regulator for Glucose Homeostasis. *Antioxidants (Basel)* 9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32824669>

Young, R.W. (1967). The renewal of photoreceptor cell outer segments. *The Journal of cell biology* 33, 61-72. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6033942>

Yu, C., Roubeyx, C., Sennlaub, F., and Saban, D.R. (2020). Microglia versus Monocytes: Distinct Roles in Degenerative Diseases of the Retina. *Trends in neurosciences* 43, 433-449. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32459994>

Yu, D.Y., Cringle, S., Valter, K., Walsh, N., Lee, D., and Stone, J. (2004). Photoreceptor death, trophic factor expression, retinal oxygen status, and photoreceptor function in the P23H rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 2013-2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15161870>

Yu, D.Y., Cringle, S.J., Su, E.N., and Yu, P.K. (2000). Intraretinal oxygen levels before and after photoreceptor loss in the RCS rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 3999-4006. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11053305>

Zafra-Polo, M.C., Gonzalez, M.C., Estornell, E., Sahpaz, S., and Cortes, D. (1996). Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. *Phytochemistry* 42, 253-271. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8688168>

Zangari, J., Petrelli, F., Maillot, B., and Martinou, J.C. (2020). The Multifaceted Pyruvate Metabolism: Role of the Mitochondrial Pyruvate Carrier. *Biomolecules* 10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32708919>

Zeitz, C., Robson, A.G., and Audo, I. (2015). Congenital stationary night blindness: an analysis and update of genotype-phenotype correlations and pathogenic mechanisms. *Progress in retinal and eye research* 45, 58-110. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25307992>

Zhang, C.Y., Baffy, G., Perret, P., Krauss, S., Peroni, O., Grujic, D., Hagen, T., Vidal-Puig, A.J., Boss, O., Kim, Y.B., Zheng, X.X., Wheeler, M.B., Shulman, G.I., Chan, C.B., and Lowell, B.B. (2001a). Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* 105, 745-755. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11440717>

Zhang, K., Kniazeva, M., Han, M., Li, W., Yu, Z., Yang, Z., Li, Y., Metzker, M.L., Allikmets, R., Zack, D.J., Kakuk, L.E., Lagali, P.S., Wong, P.W., MacDonald, I.M., Sieving, P.A., Figueroa, D.J., Austin, C.P., Gould, R.J., Ayyagari, R., and Petrukhin, K. (2001b). A 5-bp deletion in ELOVL4 is associated with two related forms of autosomal dominant macular dystrophy. *Nature genetics* 27, 89-93. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11138005>

Zhang, L., Du, J., Justus, S., Hsu, C.W., Bonet-Ponce, L., Wu, W.H., Tsai, Y.T., Wu, W.P., Jia, Y., Duong, J.K., Mahajan, V.B., Lin, C.S., Wang, S., Hurley, J.B., and Tsang, S.H. (2016). Reprogramming metabolism

by targeting sirtuin 6 attenuates retinal degeneration. *The Journal of clinical investigation* 126, 4659-4673. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27841758>

Zhongjie, F., Kern, T.S., Ann, H., and Smith Lois, E.H. (2021). Fatty acid oxidation and photoreceptor metabolic needs. *Journal of lipid research*, 100035. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33556438>

Zhu, K., Zhao, J., Lubman, D.M., Miller, F.R., and Barder, T.J. (2005). Protein pI shifts due to posttranslational modifications in the separation and characterization of proteins. *Anal Chem* 77, 2745-2755. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15859589>

Zhu, X., Li, A., Brown, B., Weiss, E.R., Osawa, S., and Craft, C.M. (2002). Mouse cone arrestin expression pattern: light induced translocation in cone photoreceptors. *Molecular vision* 8, 462-471. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12486395>

Zipfel, P.F., Lauer, N., and Skerka, C. (2010). The role of complement in AMD. *Adv Exp Med Biol* 703, 9-24. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20711704>

TABLES

TABLES

n°	8 Jours wt/rd1	35 jours wt/rd1	Access Prot	Protéine
1	0.4	733.5	Q8VBV8	Guanylate cyclase activator B
2	1.2	373.4	Q8K0D8	Rhodopsin
3	5.3	311.2	BAC31885	Phosphodiesterase 6B. cGMP. rod receptor. beta polypeptide
4	0.5	272.3	AAH22793	Guanine nucleotide binding protein. Alpha transducing 1
5	1.1	167.3	Q8CCV5	Estrogen related receptor. beta
6	1.7	158.5	Q8BMK3	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 14 (KIR2.4)
7	3.4	142.0	BAC31885	Phosphodiesterase 6B. cGMP. rod receptor. beta polypeptide
8	20.0	114.4	Q9GLP1	Coagulation factor precursor (Activated protein C cofactor)
9	1.0	105.5		EST
10	0.8	75.8	P34057	Recoverin
11	1.1	68.9	P29974	Cyclic nucleotide gated channel. cGMP
12	2.9	66.9	Q8BGR1	Hypothetical protein
13	4.3	49.9		EST
14	1.0	49.4	Q9JM62	Polyposis locus protein 1-like 1 (TB2 protein-like 1)
15	0.9	43.8	P091741	Phosphodiesterase 6G. cGMP-specific. Rod. gamma
16	0.8	43.6	Q9QW08	Phosducin
17	1.1	42.4	P15499	Peripherin (Retinal degeneration slow protein)
18	1.0	39.9	Q8BYK4	Retinol dehydrogenase 12
19	0.8	37.1	Q8K0D8	Rhodopsin
20	1.0	32.9	Q9CTH8	Uridine kinase-like 1
21	1.8	31.5	P29788	Vitronectin
22	0.8	30.7	Q8BKT7	Fms interacting protein
23	4.8	29.8	Q9H9U3	Hypothetical protein FLJ12547
24	1.0	27.6	Q8BIS8	Weakly similar to N-acetylglucosaminyltransferase
25	2.9	26.6	Q9JJH5	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2-6-biphosphatase 2
26	0.0	24.4	P08228	Superoxyde dismutase Cu-Zn
27	13.2	23.4	Q91WV5	Solute carrier family 17 (vesicular glutamate transporter)
28	1.3	22.6	Q8JZT8	Mitochondrial Ca ²⁺ dependent solute protein
29	0.7	22.3		EST
30	0.9	21.8	Q8N4L8	LOC149473
31	1.2	21.6	Q9EPQ2	RA1975
32	1.2	21.4	Q8BIS8	Weakly similar to N-acetylglucosaminyltransferase
33	1.3	12.3	Q8K0D1	Potassium voltage gated channel. Shab-related subfamily
34	1.6	21.2	Q8VI03	GH regulated TBC protein
35	1.0	19.0	Q9H0J1	Hypothetical protein

Table 2 : Liste des 35 premiers gènes répertoriés dans le cluster ‘Africain’. Le gène *Pfkfb2* qui code pour une enzyme du métabolisme apparaît en position 25 sur 499 gènes et apparaît à la suite des gènes des photorécepteurs qui portent des mutations de la RP.

<i>Nom</i>	<i>Fournisseur</i>	<i>Référence</i>	<i>Hôte</i>	<i>Espèce</i>	<i>Dilution</i>
β-Actine	Sigma	A1978	Souris monoclonal	H ; S ; R ; P ; B	Western blotting au 1/5000 ^{ème}
Arrestin	Cheryl Craft	mCAR	Souris monoclonal	S	FACS au 1/2000 ^{ème}
GFP	Roche	11814460001	Souris monoclonal	/	Western blotting au 1/1000 ^{ème}
IgG biotinylé	Vector	BA-1100	Cheval	L	Immunohistochimie au 1/500 ^{ème}
IgG1 Isotype Control	Cell Signaling	G3A1	Souris monoclonal	S	FACS au 1/200 ^{ème}
MONDOA	Sigma Aldrich	HPA023084	Lapin polyclonal	H	Western blotting au 1/100 ^{ème}
MONDOA	Santa Cruz Biotechnology	SC-13397	Lapin polyclonal	H; S; R	Western blotting au 1/100 ^{ème}
MONDOA	LifeSpan Biosciences	LS-C289892	Lapin polyclonal	H	Western blotting au 1/2000 ^{ème}
MONDOA	Proteintech	13614-1-AP	Lapin polyclonal	S	Western blotting au 1/500 ^{ème}
MONDOA	Biotem	Lapin # 00999 (6515-2 et 6515-4)	Serum Immun	Pou	Western blotting au 1/5000 ^{ème}
MONDOA	Biotem	Lapin # 01004 (6515-2 et 6515-4)	Serum Immun	Pou	Western blotting au 1/5000 ^{ème}
MONDOA	Biotem	Lapin # 01007 (6515-2 et 6515-4)	Serum Immun	Pou	Western blotting au 1/5000 ^{ème}
MONDOA	biotem	Lapin # 01007 (6515-2 et 6515-4)	Serum Immun	Pou	Western blotting au 1/5000 ^{ème}
PFKFB2	Assaybiotech	B0761	Lapin polyclonal	H	Western blotting au 1/500 ^{ème} Immunohistochimie au 1/50 ^{ème}
PFKFB2	Bethyl	A304-286A	Lapin polyclonal	H ; S	Western blotting au 1/1000 ^{ème}
Phospho PFKFB2 Ser ⁴⁸³	Cell Signaling	D4R1W	Lapin polyclonal	H ; S ; R	Western blotting au 1/1000 ^{ème}
PI3K p85α	Santa Cruz Biotechnology	SC-12929	Lapin polyclonal	H; S	Western blotting au 1/500 ^{ème}
PNA	Invitrogen	L32459	Peanut	/	Immunohistochimie au 1/50 ^{ème}
Rabbit Alexa 488	Invitrogen	A21206	Âne	H; S; R; B; Pou; Ch;	FACS au 1/200 ^{ème}
Récepteur Insuline α	Novus biologicals	NBP2-67726	Lapin polyclonal	H; S; R	Immunohistochimie au 1/50 ^{ème}
Rhodopsin clone 4D2	Abcam	ab98887	Souris Monoclonal	H ; S ; R ; B ; P ; X	FACS au 1/200 ^{ème}
Rhodopsin	Millipore	MB5316	Souris Monoclonal	H ; S ; R	Western blotting au 1/150 ^{ème}
Sérum non immun (NMS)	Millipore	NS03L	Souris	/	FACS au 1/6000 ^{ème}
Streptavidine Alexa 488	Invitrogen	S32354	/	/	Immunohistochimie au 1/500 ^{ème}
TIM23	BD Transduction Laboratories	611222	Souris	H; R	Western blotting au 1/5000 ^{ème}
TATA binding protein (TBP)	Novus biologicals	NB500-700	Souris	H; S; R	Western blotting au 1/1000 ^{ème}

Table 3 : Liste des anticorps utilisés dans les résultats. H ; Humain, S : souris, R : rat, B : bovin, P : porc, X : Xenope, Pou : poulet, Ch : chèvre, L : lapin.

<i>Nom</i>	<i>Séquence</i>	<i>Espèce</i>
<i>Actine F</i>	GTGGCATCCATGAAACTACAT	Souris
<i>Actine R</i>	GGCATAGAGGTCTTTACGG	Souris
<i>Gnat2</i> Cinétique QPCR F	CAGGAAGTTGTGGAAGGA	Souris
<i>Gnat2</i> Cinétique QPCR R	GTAGTAAGATGCCGAGTCA	Souris
<i>MONDOA F</i>	CGGGCCACTTCATGGTGTC	Poulet
<i>MONDOA R</i>	GCTGTTCTGAGGAGACTGTGG	Poulet
<i>MONDOA GRACE F</i>	CGGGCCACTTCATGGTGTC	Poulet
<i>MONDOA GRACE R</i>	TCCATAGGGACAGGGGTTTCT	Poulet
<i>MONDOA bHLH F</i>	TGCCATGCCTCAGTCTAATGTT	Poulet
<i>MONDOA bHLH R</i>	AGTGGCAAGTTTTTCCTGAGCA	Poulet
<i>Pfkfb2 v1</i> PCR F	AACCTGACTTATTGGGGGCA	Souris
<i>Pfkfb2 v1</i> PCR R	TCATGTTCCAGAGTGGCCTG	Souris
<i>Pfkfb2 v2</i> PCR F	ATTCAAGACTCCTCCTTCCACG	Souris
<i>Pfkfb2 v2</i> PCR R	GATTTGAGGCGTGGGGTTTA	Souris
<i>Pfkfb2 v5</i> PCR F	TTCCAGGCAACAATGCCAC	Souris
<i>Pfkfb2 v5</i> PCR R	GCAGTCTTCTGGGGAAAATGT	Souris
<i>Pfkfb2 v1</i> Cinétique QPCR F	CTTTGCCGGCTGTGAAATGG	Souris
<i>Pfkfb2 v1</i> Cinétique QPCR R	GTCACGGGCTACAGGAAAGT	Souris
<i>Pfkfb2 v5</i> Cinétique QPCR F	CTTCATTGGTCCAGCGTGC	Souris
<i>Pfkfb2 v5</i> Cinétique QPCR R	GCGTGGGGTTTATAGCTGCT	Souris
<i>Pfkfb2</i> Kinase domaine F	AGCCCCGGGGTAAGACTTATG	Souris
<i>Pfkfb2</i> Kinase domaine R	ATCTTCCAGTGCCACCAGAG	Souris
<i>Rho</i> Cinétique QPCR F	ATGTTCTGCTCATCGTGCT	Souris
<i>Rho</i> Cinétique QPCR R	ATGTAGTTGAGGGGTGTG	Souris
<i>VISININE F</i>	CATGTACGACCTGGATGGTATGGG	Poulet
<i>VISININE R</i>	ACTGAAGATCTTGCTACCCGAT	Poulet

Table 4 : Liste des amorces utilisés dans les résultats

ANNEXES

ANNEXES