



**HAL**  
open science

# Modélisation d'une forme de rétinite pigmentaire et validation d'une approche de thérapie génique, à l'aide de cellules rétiniennees dérivées de cellules iPS humaines

Amélie Rodrigues

## ► To cite this version:

Amélie Rodrigues. Modélisation d'une forme de rétinite pigmentaire et validation d'une approche de thérapie génique, à l'aide de cellules rétiniennees dérivées de cellules iPS humaines. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS520 . tel-03880190

**HAL Id: tel-03880190**

**<https://theses.hal.science/tel-03880190v1>**

Submitted on 1 Dec 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

Ecole doctorale Cerveau, Cognition, Comportement (ED158)

*Institut de la Vision*

## **Modélisation d'une forme de rétinite pigmentaire et validation d'une approche de thérapie génique, à l'aide de cellules rétiniennes dérivées de cellules iPS humaines**

**Par Amélie RODRIGUES**

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par Olivier GOUREAU

Présentée et soutenue publiquement le 30 novembre 2021

Devant un jury composé de :

Pr. Onnik AGBULUT, Président du jury

Dr. Vasiliki KALATZIS, Rapporteur

Dr. Muriel PERRON, Rapporteur

Pr. Christelle MONVILLE, Examineur

Dr. Stéphane NEDELEC, Examineur

Dr. Olivier GOUREAU, Directeur de thèse



*« L'obstination est le chemin de la réussite. »*

Charlie Chaplin



## Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci à mes deux rapporteurs Dr Vasiliki Kalatzis et Dr Muriel Perron d'avoir accepté de découvrir ou redécouvrir mon projet, ainsi que pour le temps consacré à la lecture et à la correction de mon manuscrit. Je remercie le Pr Christelle Monville et le Dr Stéphane Nedelec d'avoir accepté de participer à l'expertise de mon travail en tant qu'examineurs. Je remercie également le Pr Onnik Agbulut d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je remercie très sincèrement mon directeur de thèse Olivier Goureau de m'avoir accueillie dans son équipe et de m'avoir donné l'opportunité de défendre ce projet ambitieux. Je suis très reconnaissante de la confiance que tu m'as accordée en me permettant d'organiser mes expériences avec autonomie et en m'accordant la liberté de tester mes idées. Merci pour tes conseils, ton aide et tous les outils que tu as mis à ma disposition pendant ces 4 ans (et demi). J'ai été ravie d'évoluer et de m'épanouir au sein de ton équipe et à tes côtés.

Un grand merci à tous les membres de mon équipe, pour ces moments partagés. Gaël Orioux, pour sa pédagogie et sa bonne humeur, merci pour ton accompagnement et tes conseils avisés. Merci à Sacha Reichman pour son optimisme à toute épreuve, ses nombreux moments de rire et pour avoir suivi l'évolution de mon projet avec intérêt et bienveillance. Merci à Giuliana Gagliardi et Oriane Rabesandratana pour leur partage d'expérience. Merci à Ildem Sali pour ses mots d'encouragement, et à Marilou Cléménçon. Merci à Benoit Bouloudi pour son travail, ce fut un plaisir de t'encadrer. Un merci tout particulier à Amélie Slembrouck mon binôme parfait et Céline Nanteau pour leur présence quotidienne, merci pour votre disponibilité, votre patience infaillible et votre aide si précieuse, pour tout ce que vous m'avez partagé et transmis scientifiquement et humainement, pour tous ces moments partagés et pour votre soutien inestimable. Et à toi Sandy Gozlan, mon pilier (*in vitro* comme *in vivo*), les mots manqueraient si je devais t'exprimer mes remerciements ou résumer notre rencontre.

Je tiens à remercier grandement Jérôme Roger pour ses longues heures si intenses de RNAseq à ses côtés. Merci pour ton aide, ta disponibilité et tes conseils.

Je remercie l'équipe de Christelle Monville de m'avoir accueillie à I-STEM, en particulier Karim Ben M'Barek pour nos échanges et toute ta bienveillance. Merci Michel Cailleret de m'avoir partagé avec une immense gentillesse ton expertise pointue sur CRISPR.

Merci à Isabelle Audo d'avoir contribué à la naissance de ce projet et pour ses nombreux encouragements, je remercie également les membres de l'équipe AZ pour votre aide en particulier Christel Condroyer, Christelle Michiels, et à toi Camille Letellier pour nos nombreux échanges, nos rires, ton énorme soutien et ton amitié.

Je remercie le Pr José-Alain Sahel de nous avoir permis de collaborer avec Leah Byrne sur une partie qui me tenait particulièrement à cœur. Leah thank you for this fulfilling collaboration despite the many miles that threatened our AAV viruses. Je remercie également Deniz Dalkara pour nos échanges et le soutien technique qu'elle a pu apporter.

Merci à Emeline Nandrot pour son expertise en phagocytose, et à l'ensemble de son équipe en particulier Elora Vanoni et Quentin Rieu pour leur disponibilité, leur aide et toute leur sympathie.

Je remercie l'ensemble des personnes à l'institut que j'ai eu la chance de rencontrer, qui ont rendu mon travail possible et mon quotidien plus agréable.

En particulier Yvrick Zagar, merci de m'avoir partagé ton expertise pour performer au mieux mes Western-Blot, merci pour ces moments si agréables et enrichissants en ta compagnie.

J'ai été ravie de partager les paillasse, l'espace et bien plus avec l'ensemble de l'équipe de Jean Livet, en particulier Mickaël Le et Marion Lerat, mes soutiens de la première heure et amis. Je pense aussi à Marion Rosello, amie et épaule avant même le labo. Je garde en mémoire tous les magnifiques moments passés avec vous en compagnie de Fiona Roche et Shahad Albadri.

Un énorme merci à tout les utilisateurs du L2 qui font de cette petite grotte coupée du reste de l'Institut où on passe de nombreuses heures, un endroit chouette et chaleureux.

Un clin d'œil tout particulier à mes « room-mates », pour tous les petits bouts de quotidiens partagés : les rushs, les rires, les gâteaux, les pleurs, les confidences et surtout les sessions danses et karokés. Vous me manquez Johann et Sarah.

Et à toi Coralie Fassier, un merci très sincère pour ton oreille attentive, le temps que tu m'as accordé, tes conseils emplies de bienveillance et tes encouragements sans compter.

Merci à mes amis d'avoir toujours été là.

À toi ma Clémentine, 7 ans d'amitié, 4 ans de thèse, from little étudiantes to docteurs.

Je remercie ma famille pour son soutien indéfectible et son amour inconditionnel.

À mes deux mousquetaires,  $1+1 = 3$  ♥



# Table des matières

<b>Introduction</b> .....	11
I. L'Œil et la vision.....	11
I.1. Généralités .....	11
I.2. La rétine .....	12
La rétine neurale.....	13
L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR).....	18
I.3. La phototransduction.....	23
II. Les rétinites pigmentaires .....	26
II.1. Manifestations cliniques et diagnostique.....	27
II.2. Classification et aspects génétiques.....	34
Les rétinites pigmentaires syndromiques .....	36
Les rétinites pigmentaires non syndromiques .....	37
II.3. Gènes d'intérêt de l'étude.....	40
<i>PRPF31</i> .....	40
<i>RHODOPSINE</i> .....	46
II.4. Approches thérapeutiques actuelles.....	50
III. La technologie des cellules iPS .....	55
III.1. Cellules souches, propriétés et classification .....	55
III.2. Reprogrammation cellulaire .....	58
III.3. Protocoles de différenciation des cellules iPS humaines en cellules rétiniennes .....	61
Différenciation en photorécepteurs .....	66
Différenciation en cellules de l'EPR.....	69
III.4. Intérêt clinique des cellules rétiniennes dérivées de cellules iPS humaines ...	71
IV. La thérapie génique .....	77
IV.1. Edition du génome par CRISPR/Cas9 .....	77
IV.2. Les vecteurs viraux .....	82
IV.3. Applications à la rétine.....	86
<b>Objectifs</b> .....	90

<b>Résultats</b> .....	93
1. Génération d’organoïdes rétiniens humains pseudo-laminés préservant la structure des photorécepteurs matures afin de modéliser au mieux les dégénérescences rétiniennes de type RP. ....	93
2. Validation de l’approche de modélisation, basée sur l’utilisation d’organoïdes dérivés de cellules iPS de patients atteints de RP, à partir d’une mutation bien caractérisée dans le gène RHODOPSINE. ....	115
3. Modélisation d’une forme de RP, liée à une mutation du gène PRPF31, à partir de cellules iPS humaines et développement d’une stratégie de thérapie génique.....	127
<b>Discussion et perspectives</b> .....	201
1. Génération d’organoïdes rétiniens humains pseudo-laminés structurellement plus proches de la rétine humaine in vivo. ....	201
2. Utilisation des cellules rétiniennes dérivées des iPS humaines pour la compréhension des mécanismes pathologiques et l’élaboration de stratégies innovantes. ....	206
Validation de l’utilisation des organoïdes pseudo-laminés comme outil de modélisation pathologique pour les RP.....	206
Modélisation d’une forme de RP liée au gène PRPF31 et thérapie d’augmentation génique. ....	208
<b>Bibliographie</b> .....	217

## Table des illustrations

<b>Figure 1.</b> Structure anatomique de l'œil humain. ....	12
<b>Figure 2.</b> Structure de la rétine. ....	13
<b>Figure 3.</b> Structure des photorécepteurs : bâtonnet et cône. ....	16
<b>Figure 4.</b> Répartition des cônes et des bâtonnets dans la rétine humaine. ....	18
<b>Figure 5.</b> Représentation de l'ensemble des fonctions assurées par l'épithélium pigmentaire rétinien. ....	19
<b>Figure 6.</b> Structure de l'épithélium pigmentaire rétinien. ....	21
<b>Figure 7.</b> Le processus de phagocytose des segments externes des photorécepteurs par l'épithélium pigmentaire de la rétine. ....	22
<b>Figure 8.</b> La phototransduction. ....	24
<b>Figure 9.</b> Le cycle visuel. ....	25
<b>Figure 10.</b> Diversité génétique des dégénérescences rétiniennes. ....	27
<b>Figure 11.</b> Perception visuelle des patients atteints de Rétinites Pigmentaires. ....	28
<b>Figure 12.</b> Cinétique de la dégénérescence des photorécepteurs dans le cadre de la Rétinite Pigmentaire. ....	29
<b>Figure 13.</b> Les bâtonnets favorisent la survie des cônes. ....	30
<b>Figure 14.</b> Fonds d'œil de patients atteints de Rétinites Pigmentaires, à différents stades de la pathologie. ....	31
<b>Figure 15.</b> Réponse à l'ERG de patient atteint de Rétinites Pigmentaires. ....	33
<b>Figure 16.</b> Classification des dystrophies rétiniennes héréditaires affectant les photorécepteurs. ....	34
<b>Figure 17.</b> Classification des Rétinites Pigmentaires et principaux gènes impliqués. ....	35
<b>Figure 18.</b> Répartition des gènes responsables de Rétinites Pigmentaires, classés selon le mode de transmission de la pathologie. ....	39
<b>Figure 19.</b> Rôle de PRPF31 dans l'épissage des ARNm. ....	41
<b>Figure 20.</b> Modulation de l'expression de PRPF31 par CNOT3. ....	43
<b>Figure 21.</b> Représentation du modèle d'haploinsuffisance proposé pour PRPF31. ....	45
<b>Figure 22.</b> Structure de la Rhodopsine et les principales mutations connues associées à une Rétinite Pigmentaire. ....	46
<b>Figure 23.</b> Les principales stratégies thérapeutiques envisagées pour traiter les dystrophies rétiniennes, en fonction du stade de dégénérescence des photorécepteurs. ....	54

<b>Figure 24.</b> Restriction du potentiel de différenciation des cellules souches au cours du développement. ....	56
<b>Figure 25.</b> Altérations génomiques et épigénétiques potentielles liées à la reprogrammation et la culture des cellules souches pluripotentes. ....	60
<b>Figure 26.</b> Développement embryonnaire de l’oeil. ....	63
<b>Figure 27.</b> Spécification de la rétine neurale et de l’épithélium pigmentaire rétinien. ....	64
<b>Figure 28.</b> Cinétique d’apparition des différents types cellulaires au cours de la rétino-genèse. ....	65
<b>Figure 29.</b> Représentation schématique des étapes clés de la différenciation d’organoïdes rétiniens à partir de cellules souches pluripotentes humaines. ....	68
<b>Figure 30.</b> Les différentes applications des cellules iPS humaines. ....	72
<b>Figure 31.</b> Le complexe d’édition du génome CRISPR-Cas9. ....	80
<b>Figure 32.</b> Résumé des principales caractéristiques des vecteurs viraux les plus utilisés dans le cadre des thérapies géniques liées à l’œil. ....	83
<b>Figure 33.</b> Tropisme des différents sérotypes d’AAV. ....	86
<b>Figure 34.</b> Voies d’injection des produits de thérapie génique dans l’œil. ....	87
<b>Figure 35.</b> Pédigrée du patient sélectionné atteint d’une RP causée par une mutation dans le gène RHO. ....	116
<b>Figure 36.</b> Représentation schématique du protocole de différenciation des cellules iPS humaines en organoïdes rétiniens pseudo-laminés. ....	117
<b>Figure 37.</b> Caractérisation des photorécepteurs. ....	118
<b>Figure 38.</b> Caractérisation des photorécepteurs matures. ....	120
<b>Figure 39.</b> Caractérisation des bâtonnets. ....	122
<b>Figure 40.</b> Caractérisation des cônes. ....	124
<b>Tableau 1.</b> Modèles de rétino-pathies pigmentaires établis à partir de cellules iPS de patients. ....	76
<b>Tableau 2.</b> Présentation des différentes endonucléases Cas9 et leur motif PAM associé. ....	79

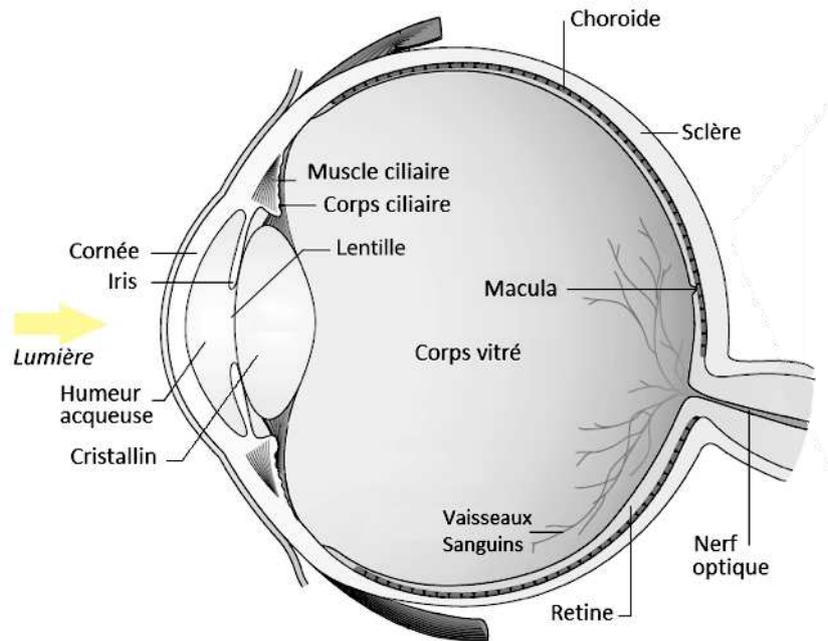


# Introduction

## I. L'Œil et la vision

### *I.1. Généralités*

La vision est l'un de nos sens les plus importants, elle nous permet de nous mouvoir dans l'espace, de distinguer les individus et les objets, d'interagir avec notre environnement, de percevoir le monde autour de nous. Ce processus complexe est permis grâce au dialogue entre le cerveau et l'organe sensoriel de la vue, l'œil (**Figure 1**). Les photons constituent les stimuli lumineux qui sont détectés par notre œil, captés par la rétine et transformés en signaux électrochimiques, qui sont transmis au cerveau pour être interprétés. La lumière pénètre dans l'œil en traversant la couche la plus superficielle, la cornée, couche claire et courbée qui protège l'œil des dommages physiques, rayons UV et agressions pathogènes. La quantité de lumière pénétrant dans l'œil est ensuite modulée par la dilatation ou la constriction de la pupille, ouverture centrale de l'iris, sous l'action de deux muscles respectivement, le sphincter pupillaire et le dilatateur pupillaire. L'iris agit ainsi comme un diaphragme et donne la couleur à l'œil. A la manière d'une lentille biconvexe, le cristallin situé en arrière de la pupille, est capable d'adapter sa courbure et ainsi la forme de ses structures réfractives sous l'action du muscle ciliaire, pour concentrer la lumière sur la rétine. C'est le phénomène d'accommodation qui permet la mise au point d'une image nette quelle que soit la distance de l'objet par rapport à l'œil. La lumière passe ensuite par l'humeur vitrée, une substance visqueuse transparente qui participe au maintien de la pression intraoculaire. Enfin, les photons atteignent la rétine, partie neurosensorielle de l'œil qui assure la transformation du signal lumineux mais aussi la transmission de l'information au cortex visuel.

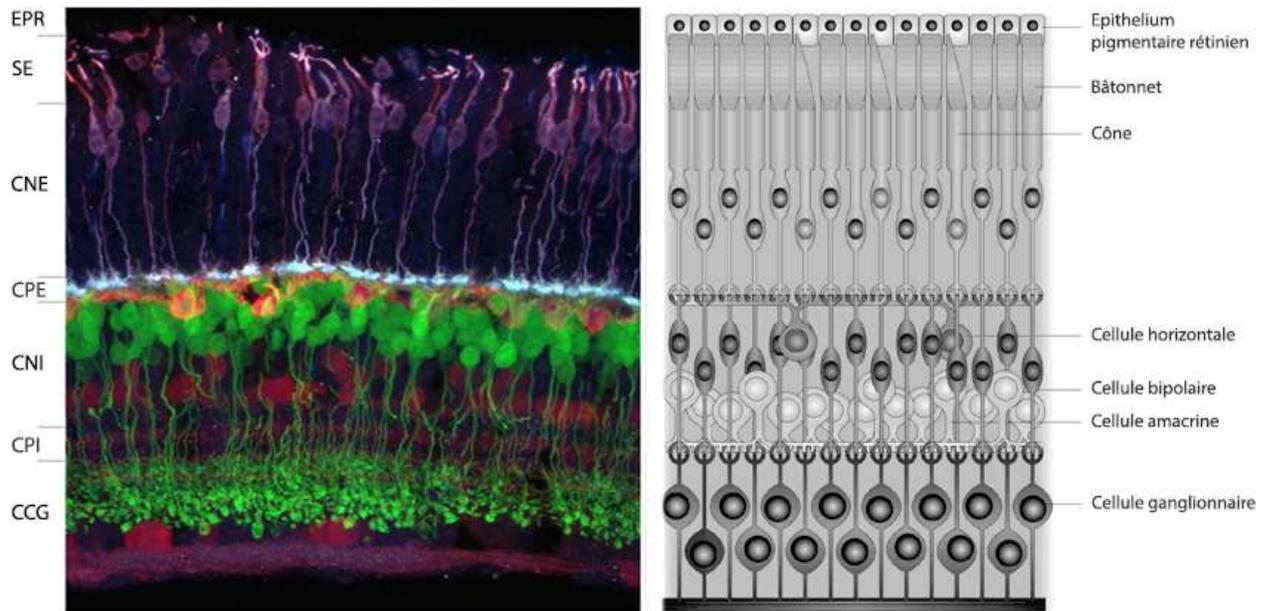


**Figure 1. Structure anatomique de l'œil humain.**

Adaptée de Wright et al., 2010.

## ***1.2. La rétine***

La rétine est la structure photosensible de l'œil, elle appartient au système nerveux central et est directement reliée au cerveau par le nerf optique. Chez les vertébrés, deux parties distinctes la composent et s'organisent de manière laminaire : la rétine neurale qui contient six types de neurones spécialisés et un type de cellule gliale, et l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) (**Figure 2**).



**Figure 2. Structure de la rétine.**

(A gauche) Section transversale d'une rétine de souris adulte immunomarquée illustrant l'organisation stratifiée des corps cellulaires et des terminaisons. Extrait Morgan et Wong, 2018. **EPR** épithélium pigmentaire rétinien ; **SE** couche des segments externes des photorécepteurs ; **CNE** couche nucléaire externe ; **CPE** couche plexiforme externe ; **CNI** couche nucléaire interne ; **CPI** couche plexiforme interne ; **CCG** couche des cellules ganglionnaires. (A droite) Représentation schématique de la rétine détaillant les différents types cellulaires présents. Adapté de Livsey et Cepko, 2001.

### La rétine neurale

L'organisation des cellules de la rétine neurale repose sur une succession de trois couches nucléaires, contenant les corps cellulaires des neurones et cellules gliales, séparées par des couches plexiformes, sièges des connexions synaptiques (**Figure 2**). Les trois couches nucléaires sont, de la plus profonde à la plus superficielle, la couche de cellules ganglionnaires (CCG), la couche nucléaire interne (CNI) et la couche nucléaire externe (CNE) séparées respectivement par les couches plexiformes interne (CPI) et externe (CPE).

La CCG est la couche nucléaire la plus interne au globe, elle contient les corps cellulaires et axones des cellules ganglionnaires, les corps cellulaires des cellules amacrines déplacées et, chez certaines espèces, les astrocytes. Les prolongements des cellules ganglionnaires se rejoignent au niveau de la papille pour former le nerf optique, lien direct entre la rétine et le cerveau, composé chez l'Homme d'environ 1 million d'axones (Jonas et al., 1992). Les cellules

ganglionnaires captent, via leur réseau dendritique, les signaux électriques transmis par les cellules bipolaires et les cellules amacrines, et ont pour rôle de transmettre les informations visuelles aux structures cérébrales centrales pour leur traitement par le cortex visuel. Les principales zones de projection dans le cerveau sont le noyau géniculé latéral, qui constitue l'aire visuelle du thalamus, et le colliculus supérieur.

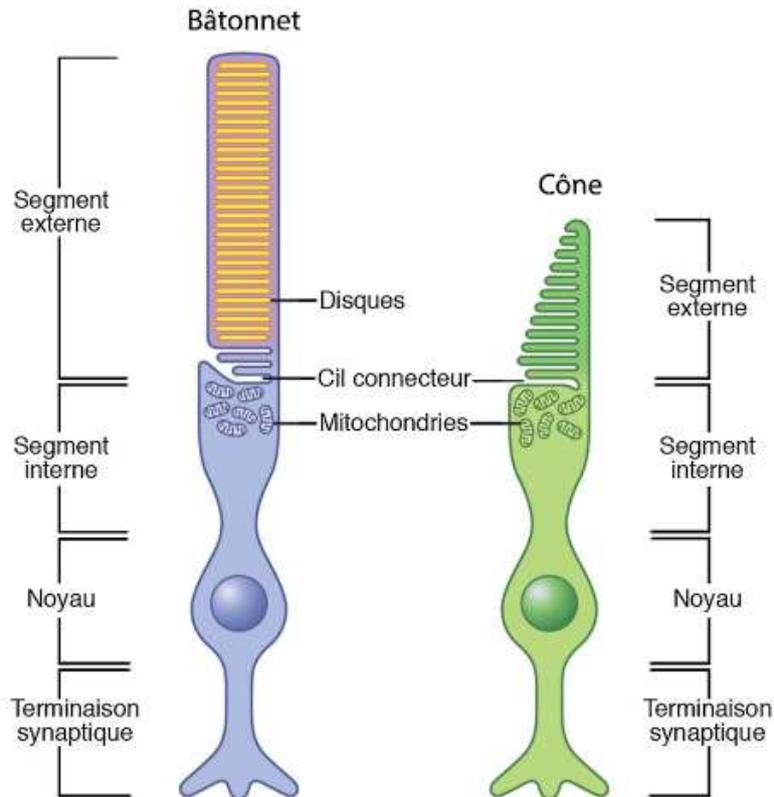
C'est au sein de la CPI, siège des synapses, que les connexions entre les cellules ganglionnaires, amacrines et bipolaires se font (Matsuoka et al., 2011).

La seconde couche nucléaire, appelée couche nucléaire interne (CNI), est formée principalement par les corps cellulaires des cellules bipolaires, amacrines, horizontales et des cellules gliales de Müller. Les cellules bipolaires transmettent le signal électrique des photorécepteurs aux cellules ganglionnaires. Il existe une grande diversité parmi les cellules bipolaires, distinguées selon leur morphologie, leur connexion synaptique aux photorécepteurs (soit à cônes, soit à bâtonnets), mais aussi en fonction de leurs propriétés de réponse à la lumière. Deux grandes catégories de cellules bipolaires sont ainsi décrites : les cellules bipolaires de type « ON » qui répondent à la lumière par dépolarisation, et de type « OFF » répondant à la lumière par hyperpolarisation (Schiller et al., 2002). En collectant et modulant les signaux provenant des cellules bipolaires et ganglionnaires, les cellules amacrines jouent un rôle d'interneurones (Masland, 2012 et al. ; Wässle et al., 2004). La majorité des cellules amacrines ont leurs noyaux localisés dans la CNI, cependant une certaine proportion de cellules amacrines dites « déplacées » ont leurs noyaux localisés dans la CCG. Il existe plus de 40 types différents de cellules amacrines déterminés en fonction de leur localisation au sein de la CNI, de leur morphologie, ou du type de neurotransmetteurs qu'elles secrètent (GABA et glycine principalement). La très grande diversité des cellules amacrines reflète la diversité de leurs fonctions comprenant notamment l'adaptation au niveau de luminosité, l'interconnexion entre les circuits à bâtonnets et à cônes, ou encore la participation au codage des mouvements grâce aux cellules amacrines dites « starburst » (Famiglietti, 1983). Tout comme les cellules amacrines, les cellules horizontales sont des interneurones ayant pour rôle de moduler le signal électrique entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires. Elles permettent la communication latérale, mais aussi la transmission dite « verticale » entre ces deux types neuronaux. Deux types majeurs de cellules horizontales ont été décrits suivant le type de connexions établies avec les photorécepteurs. Les cellules horizontales de type H1 présentant des connexions avec les bâtonnets et les cônes, et les cellules de type H2 connectées uniquement aux photorécepteurs de type cône (Cueva et al., 2002 ; Jellali et al., 2002). C'est aussi au sein de la CNI, que se localisent les noyaux des cellules gliales de Müller, principale population

gliale de la rétine. Leur morphologie est hautement conservée chez les vertébrés, avec une envergure totale s'étendant sur toute l'épaisseur de la rétine. Les cellules gliales de Müller possèdent deux prolongements caractéristiques : un prolongement apical qui s'étend jusqu'au segment interne des photorécepteurs et contribuant à la formation de la membrane limitante externe entre la CNE et l'espace sous-rétinien, et un prolongement basal atteignant la surface de la rétine et faisant partie intégrante de la membrane limitante interne à l'interface de l'humeur vitrée. Par ailleurs, leurs prolongements entourent les vaisseaux sanguins participant ainsi à la formation de la barrière hémato-rétinienne (Newman et Reichenbach, 1996). D'un point de vue fonctionnel, ces cellules assurent le maintien de l'homéostasie rétinienne, et ont un rôle de support métabolique en transportant l'eau et les ions via un réseau glial établi dans toutes les couches de la rétine, assurant le contact entre les neurones et les vaisseaux sanguins (Reichenbach et Bringmann, 2013).

La CPE est formée par les synapses entre les cellules bipolaires, horizontales et les photorécepteurs. Elle délimite la CNI des couches les plus distales de la rétine neurale, la CNE contenant les corps cellulaires des photorécepteurs, et la couche la plus externe formée par les segments externes des photorécepteurs directement apposés à l'épithélium pigmentaire rétinien.

Les photorécepteurs sont les principales cellules photosensibles de la rétine et constituent le premier relais dans la cascade de transmission de l'information visuelle dans la rétine. Leur rôle est de capter un signal lumineux et de le transformer en signal électrique, ce mécanisme porte le nom de phototransduction. Le signal électrique généré est transmis par la suite, aux cellules bipolaires, horizontales puis amacrines, qui réalisent le relais entre les photorécepteurs et les cellules ganglionnaires. Les photorécepteurs ont une morphologie très caractéristique constituée de quatre éléments essentiels : 1) la terminaison synaptique qui permet d'établir les contacts avec les cellules bipolaires et horizontales, 2) le corps cellulaire contenant quasi-exclusivement le noyau, 3) le segment interne qui possède toute la machinerie cellulaire dont de nombreux ribosomes et mitochondries, 4) le segment externe, rattaché au segment interne par un cil connecteur, contenant les disques ou replis membranaires dans lesquels sont imbriqués les pigments visuels initiateurs de la phototransduction (**Figure 3**). Il existe deux types de photorécepteurs, les cônes et les bâtonnets, dont les noms font référence à l'architecture de leur segment externe. Ils se distinguent aussi par le type de photopigment qu'ils renferment, et la morphologie de leur terminaison synaptique (Mustafi et al., 2009).



**Figure 3. Structure des photorécepteurs : bâtonnet et cône.**

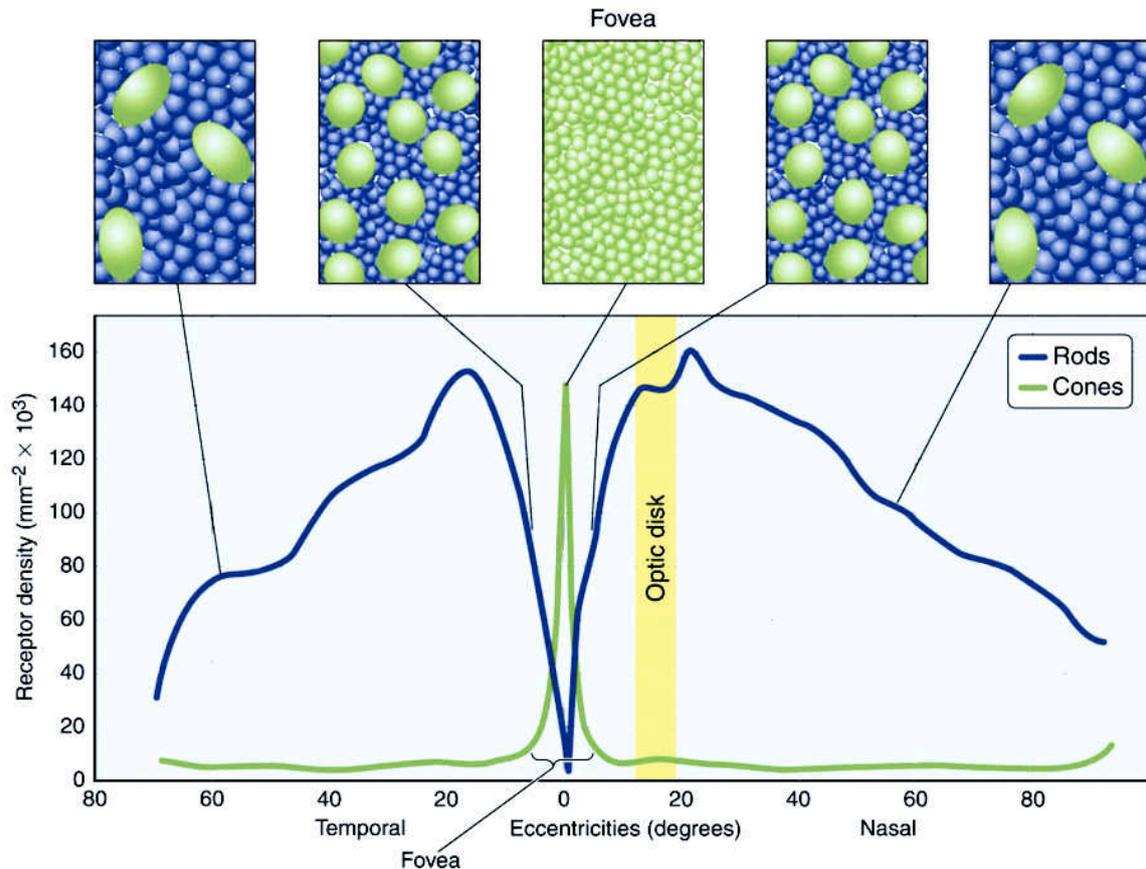
Représentation schématique présentant les principales caractéristiques morphologiques des photorécepteurs : le segment externe où sont localisés les disques, le segment interne contenant les organites tel que les mitochondries, le noyau, et la terminaison synaptique. Les bâtonnets se distinguent par un segment externe plus long. Extrait de Salesse, 2017.

Les bâtonnets sont beaucoup plus sensibles à la lumière que les cônes, ils sont capables de détecter une information lumineuse de faible intensité et permettent ainsi la vision nocturne ou scotopique. Les segments externes des bâtonnets contiennent un pigment visuel spécifique : la rhodopsine, alliance d'une partie protéique nommée opsine et d'un chromophore le 11 *cis*-rétinal, molécule photosensible dérivée de la vitamine A. Ces pigments sont capables de réagir à un photon unique et sont saturés en lumière photopique, expliquant leur très grande sensibilité à la lumière. Leur longueur d'onde d'absorbance maximale est située à 498 nm (Bowmaker et Dartnall, 1980).

Les photorécepteurs de type cône sont responsables de la vision diurne, aussi appelée photopique. Leurs segments externes, beaucoup plus courts que ceux des bâtonnets et de forme conique, peuvent présenter différents types d'opsines. Il existe ainsi trois types de

photorécepteurs à cône chez l'Homme, classés selon leur sensibilité aux différentes longueurs d'ondes au sein du spectre visible, permettant d'assurer une vision des couleurs dite trichromatique : les cônes à opsine L (long), les cônes à opsine M (medium) et les cônes à opsine S (short). Les cônes de type L sont sensibles au rouge, ceux de type M au vert et ceux de type S au bleu, avec des absorbances maximales respectives à 565, 535 et 420 nm. (Bowmaker et Dartnall, 1980 ; Hofer et al., 2005).

La densité relative des bâtonnets par rapport aux cônes reflète le mode de vie diurne et/ou nocturne des différentes espèces animales, les rétines des animaux vivant majoritairement le jour étant moins riches en bâtonnets que celles des animaux actifs principalement la nuit (60% pour les oiseaux, contre 96% pour les rongeurs). L'Homme, et les autres primates, sont une exception à cette règle, leur rétine étant composée à 85% de bâtonnets malgré une activité majoritairement diurne. Cette spécificité s'explique par l'existence, dans la région centrale de la rétine, d'une zone très particulière nommée la macula où 75% de la lumière captée par l'œil converge. Cette région, dépourvue de vaisseaux sanguins et reposant sur l'absence de la CCG et de la CNI, permet au signal lumineux d'atteindre directement les photorécepteurs. De plus, la macula se caractérise par la présence d'un cône pour un bâtonnet, en comparaison la rétine périphérique présente seulement 1 cône pour 13 bâtonnets. Au centre de la macula se situe la fovéa, c'est le point d'acuité maximale de l'œil, elle donne naissance à la vision la plus précise en éclairage diurne. Elle est dépourvue de bâtonnet, et exclusivement composée de cônes L et M en son centre, tandis que les cônes de type S se trouvent essentiellement dans la région parafovéale (Yuodelis et Hendrickson, 1986 ; Wikler et Rakic, 1990) (**Figure 4**).

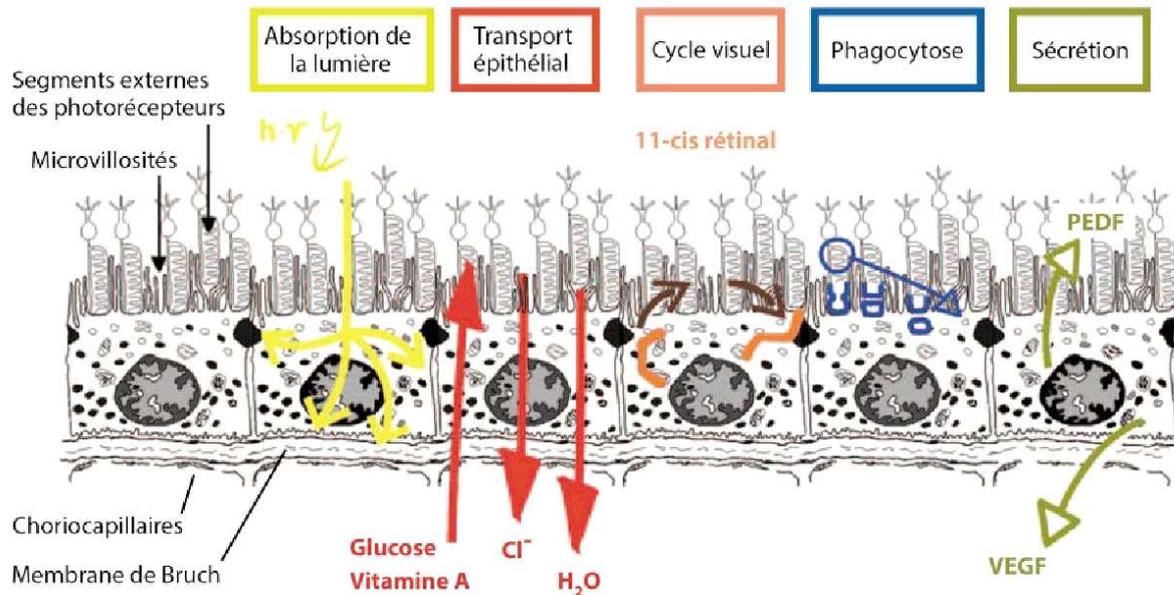


**Figure 4. Répartition des cônes et des bâtonnets dans la rétine humaine.**

Les bâtonnets sont les photorécepteurs les plus nombreux dans l'ensemble de la rétine humaine, à l'exception d'une région très particulière, nommée fovéa. Elle est constituée d'une seule et unique couche cellulaire composée exclusivement de cônes, et permet la vision de précision. Extrait de Mustafi et al., 2009.

### L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR)

L'EPR constitue une couche cellulaire monostratifiée apposée entre la couche la plus externe de la rétine neurosensorielle et la membrane de Bruch reposant sur la choroïde, partie richement vascularisée de l'œil. Il forme un tapis jointif de cellules épithéliales pigmentées, polarisées et de forme hexagonale reconnaissable à son aspect typique en « nid d'abeille ». Les caractéristiques morphologiques des cellules de l'EPR répondent à l'importance et la grande diversité de ses fonctions (Figure 5).



**Figure 5. Représentation de l'ensemble des fonctions assurées par l'épithélium pigmentaire rétinien.**

Adapté de Strauss, 2005

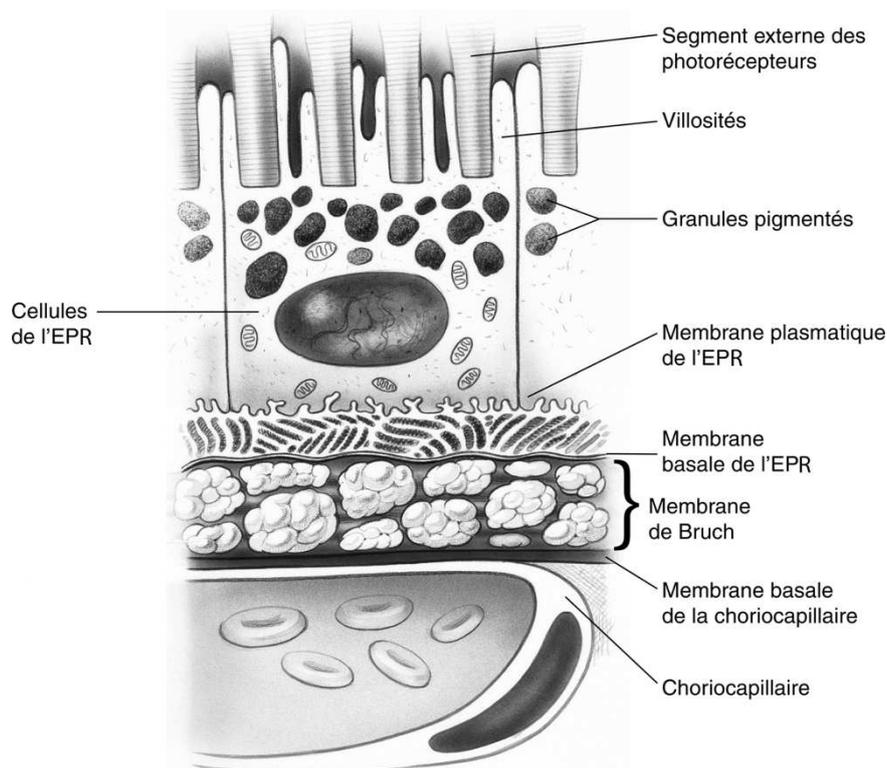
L'étanchéité de l'EPR est assurée par la présence de jonctions serrées, situées au niveau apico-latéral de chaque cellule, qui établissent une polarité apico-basale limitant la libre circulation des protéines membranaires entre ces deux pôles.

La membrane baso-latérale, ancrée par l'intermédiaire d'un ensemble d'intégrines à la membrane de Bruch, entretient des échanges cruciaux avec les capillaires de la choroïde sous-jacente (Zarbin et al., 2003). En formant une barrière parfaitement étanche séparant la rétine neurale externe dépourvue de vaisseaux sanguins et la choroïde richement vascularisée, l'EPR doit assurer le transport entre le sang et les photorécepteurs. Ce transport permet la nutrition de ces cellules spécialisées, ainsi que l'évacuation de l'eau et des métabolites de la rétine neurale pour maintenir l'homéostasie ionique dans l'espace sous-rétinien. De la choroïde vers la rétine, l'EPR permet le transport de nombreux éléments nutritifs en les absorbant du côté basolatéral proche du compartiment sanguin, et en les restituant du côté apical vers les photorécepteurs très gros consommateurs en énergie. Pour maintenir leur niveau d'activité, les photorécepteurs ont besoin d'un apport conséquent en glucose, assuré par l'intermédiaire des transporteurs de glucose (GLUT1 et GLUT3) largement exprimés sur les membranes basolatérales et basales de l'EPR (Ban et Rizzolo, 2000). L'EPR assure aussi l'apport de nombreux métabolites

nécessaires au maintien et la fonctionnalité de la rétine. L'un des plus importants apporté par le sang est la vitamine A (all-trans rétinol), acteur initiateur de la phototransduction. L'EPR assure aussi l'élimination vers le sang des produits métaboliques relargués par les photorécepteurs dans l'espace sous-rétinien, tel que l'acide lactique produit en grande quantité par les segments externes des photorécepteurs (Philp et al., 2003). De plus, en lien avec une très forte densité cellulaire, la rétine présente une activité métabolique conséquente, qui associée aux mouvements aqueux du corps vitré pour maintenir une pression constante, engendrent une production et une accumulation d'eau. Au sein de la rétine neurale, les cellules gliales de Müller évacuent l'eau vers l'espace sous-rétinien, où l'EPR prend la relève pour extérioriser l'eau et permettre une bonne adhésion entre la neuro-rétine et l'EPR. L'eau traverse ainsi les cellules de l'EPR de part en part via des canaux spécifiques comme l'Aquaporine-1 (Hamann et al., 1998). Ce transport aqueux est couplé au transport actif des ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$  qui participent à l'établissement d'une différence de potentiel transépithéliale (**Figure 5**).

En formant une véritable cloison étanche entre les vaisseaux sanguins de la choroïde et l'œil interne, dite barrière hémato-rétinienne, l'EPR participe grandement au privilège immun de l'œil.

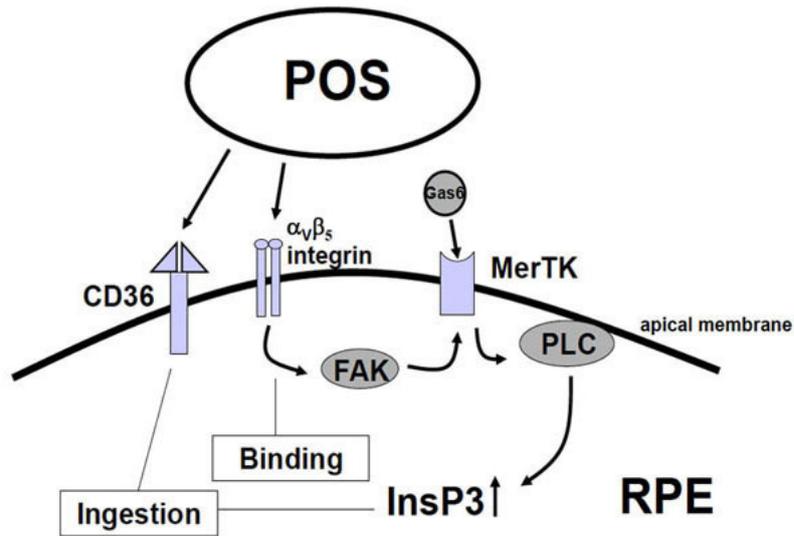
La membrane apicale se caractérise elle par la présence de nombreux prolongements formant les microvillosités et dans lesquelles s'imbriquent directement les segments externes des photorécepteurs (**Figure 6**). Ce contact étroit permet d'établir des échanges nutritionnels entre l'EPR et les photorécepteurs, mais aussi d'assurer un processus indispensable au maintien de la viabilité des photorécepteurs, la phagocytose des segments externes (Hollyfield, 1999 ; Ishikawa et al., 2015).



**Figure 6. Structure de l'épithélium pigmentaire rétinien.**

Les cellules de l'EPR sont riches en pigments de mélanine contenus au sein de granules pigmentés. Leur pôle apical se caractérise par la présence de microvillosités, dans lesquelles sont enchâssés les segments externes des photorécepteurs. Leur pôle basal repose sur la membrane de Bruch, à l'interface des capillaires de la choroïde sous-jacents. Illustration de Christine Galapp.

Les segments externes des photorécepteurs, soumis à des dommages photo-oxydatifs constants, nécessitent un renouvellement permanent pour préserver l'acuité visuelle. Ce processus nécessite l'élimination des débris des segments externes, réalisée par les cellules de l'EPR via un mécanisme de phagocytose, tandis que les photorécepteurs régénèrent leur segment externe à partir de la base. Le rythme circadien associé à la coordination entre les photorécepteurs et les cellules de l'EPR permettent de maintenir les segments externes à une longueur constante. La phagocytose est un mécanisme diurne déclenché par l'arrivée de la lumière (Young, 1976 ; 1978). Trois récepteurs impliqués dans la régulation de la phagocytose par l'EPR ont été identifiés : l'antigène de surface CD36, le récepteur-tyrosine kinase MerTK (c-Mer Proto- Oncogene Tyrosine Kinase) et l'intégrine  $\alpha V\beta 5$  (Figure 7).



**Figure 7. Le processus de phagocytose des segments externes des photorécepteurs par l'épithélium pigmentaire de la rétine.**

La liaison des segments externes à l'EPR se fait via l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  et déclenche une cascade de signalisation au cours de laquelle FAK (Focal Adhesion Kinase) phosphoryle le récepteur à activité tyrosine kinase MERTK (Myeloid-epithelial-reproductive Tyrosine Kinase). Une fois activé celui-ci interagit avec la protéine Gas6 (Growth Arrest Specific protein 6) et induit la production d'InsP3 (inositol 1,4,5-triphosphate). Le récepteur CD36 est ainsi activé et adresse un signal d'internalisation, les segments externes sont ingérés par l'intermédiaire des phagosomes puis conduits aux lysosomes afin d'être digérés. **POS** segment externe des photorécepteurs ; **RPE** cellule de l'épithélium pigmentaire rétinien. Extrait de Strauss, 2005.

C'est aussi dans la partie apicale que se localise la majorité des pigments de mélanine, contenus dans les mélanosomes, qui à la manière d'une barrière protectrice protègent les cellules de la macula soumises à une forte énergie photo-oxydative lors de l'entrée de la lumière dans l'œil. L'EPR va ainsi permettre l'absorption des photons libre non-absorbés par les pigments visuels, limitant la diffusion de l'énergie lumineuse reçue (Boulton et Dayhaw-barker, 2001).

L'EPR assure aussi l'intégrité des structures avoisinantes en sécrétant une grande variété de facteurs et de molécules de signalisation, différentes interleukines mais aussi des facteurs de croissance. Certains de ces facteurs sont produits de manière constante, tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) sécrété spécifiquement au pôle basolatéral et agissant dans la stabilisation de la matrice extracellulaire et de l'endothélium, et le PEDF (Pigment Epithelium-Derived Factor), un facteur neurotrophique libéré du côté apical jouant un rôle neuroprotecteur mais également anti-angiogénique afin de prévenir une prolifération éventuelle des vaisseaux sanguins (Witmer et al. 2003 ; Dawson et al. 1999) (**Figure 5**).

L'ensemble des fonctions décrites ci-dessus souligne l'importance et la place centrale de l'EPR dans le maintien de l'intégrité et du bon fonctionnement de l'ensemble de la rétine, mais son implication cruciale dans le mécanisme de phototransduction réaffirme son rôle essentiel pour la vision.

### ***1.3. La phototransduction***

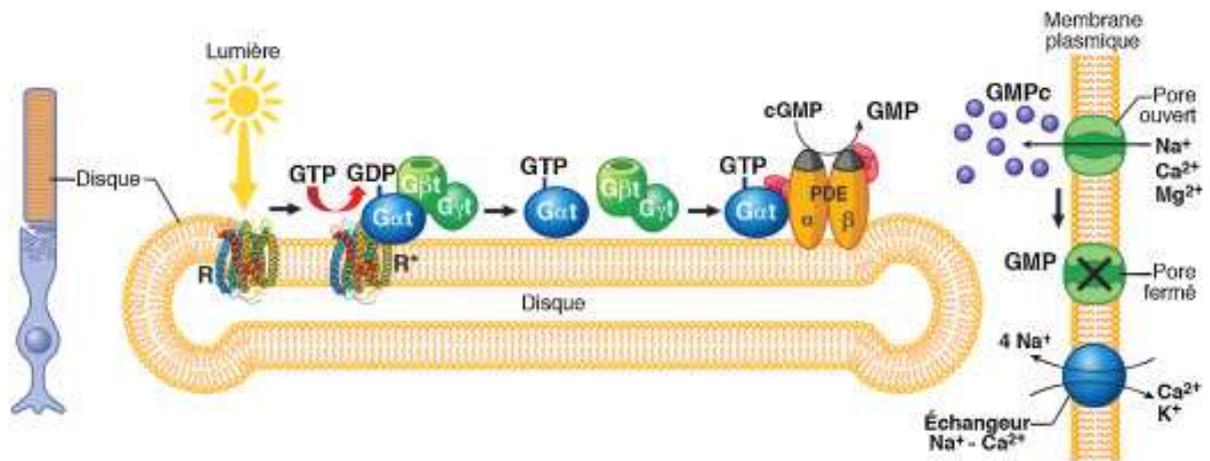
La phototransduction est la cascade biochimique qui permet de convertir l'énergie lumineuse (photon) en un signal électrique (variation de potentiel). Elle a lieu dans les segments externes des photorécepteurs, les bases moléculaires sont les mêmes pour les cônes et les bâtonnets, seule la longueur d'onde d'excitation varie.

A l'obscurité, les photorécepteurs sont dans un état de dépolarisation constant. Cette dépolarisation résulte d'un influx continu de sodium et de calcium au travers de canaux ioniques fixant le GMP cyclique (GMPc) au niveau du segment externe.

En présence de lumière, la phototransduction débute et se décompose en trois phases

**(Figure 8) :**

- 1) Activation du photopigment par la lumière : la cascade de phototransduction est initiée par l'absorption d'un ou plusieurs photons. Les pigments visuels se composent de deux parties, une protéique localisée dans les disques membranaires, et un chromophore, isomère particulier d'un dérivé de la vitamine A, sensible à la lumière. L'absorption de la lumière par le chromophore mène à son isomérisation passant d'une configuration 11-*cis*-retinal à tout-*trans*-retinal, entraînant un changement de conformation de l'opsine qui devient « catalytiquement active ».
- 2) Diminution de la concentration intracellulaire de GMPc : la transducine, une protéine G, va ainsi se lier à l'opsine activée (ou méta-rhodopsin pour les bâtonnets) permettant ainsi la libération de sa sous-unité  $\alpha$ , qui va activer la phosphodiesterase (PDE), une enzyme capable d'hydrolyser le GMPc en GMP.
- 3) Fermeture des canaux CNG : la diminution rapide de la concentration intracellulaire en GMPc conduit à la fermeture des canaux ioniques dépendants du GMPc présents sur la membrane plasmique du segment externe. Le flux entrant de cations absent au niveau du segment externe entraîne l'accumulation de charges positives à l'extérieur du photorécepteur, et donc son hyperpolarisation.

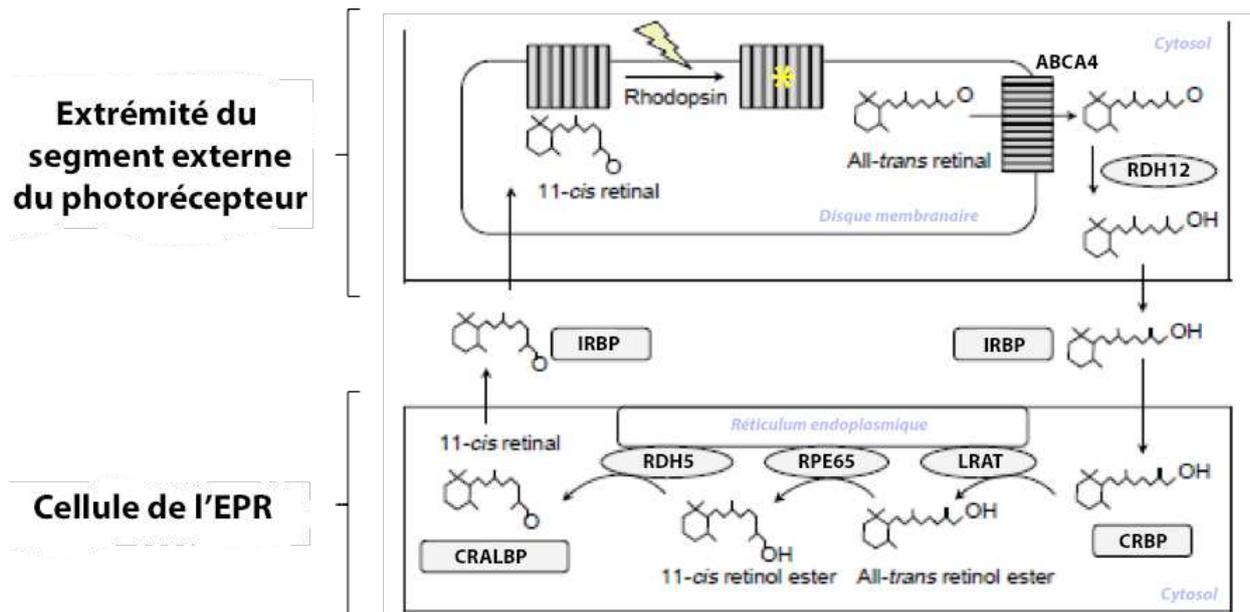


**Figure 8. La phototransduction.**

Représentation schématique des principales étapes de la phototransduction : 1) activation de la Rhodopsine en Metarhodopsine suite à une stimulation lumineuse, 2) liaison de la metharhodopsine à la transducine, activant la sous-unité  $\alpha$  de celle-ci, 3) activation de la PDE (Phosphodiésterase) par la sous unité  $\alpha$  de la transducine, 4) la PDE hydrolyse le cGMP en GMP, entraînant la fermeture des canaux cGMP-dépendant et l'hyperpolarisation du photorécepteur. Extrait de Salesse, 2017.

Le retour à l'état initial se fait grâce à la guanylate cyclase, dont l'activation fait suite à la baisse de calcium. Cette enzyme, en hydrolysant le GTP en GMPc, induit la réouverture des canaux ioniques sensibles à ce second messager (Arshavsky, 2002 ; Fu, 2010). Ces mécanismes de récupération et d'inactivation des processus opérés en réponse à la lumière sont essentiels pour garantir une réponse sensible et rapide. L'activation du chromophore fait exception, le tout-*trans*-retinol ne pouvant pas être régénéré sous sa forme isomérique *cis* en raison de l'absence de cis-trans isomérases au sein des photorécepteurs. Ainsi, le tout-*trans*-retinal est transféré de l'espace interdiscal à l'espace cytoplasmique du segment externe par le transporteur ABCA4 (ATP-binding cassette, subfamily A, member 4), où il est réduit en tout-*trans*-rétinol par la rétinol déshydrogénase 12 (RDH12). Le tout-*trans*-rétinol va ensuite se lier à la protéine IRBP (Interstitial Retinal Binding Brotein), qui l'achemine jusqu'aux cellules de l'EPR où il est transformé en 11-*cis*-retinal à l'issus de différentes actions successives réalisées par un complexe enzymatique composé de l'enzyme LRAT (Lecithin Retinol Acyltransferase), l'isomérohydrolase rétinol (RPE65), et la rétinol-déshydrogénase 5 (RDH5). Le rétinol à l'état 11-*cis* va ensuite se lier à la protéine CRALBP (Cellular Retinaldehyde Binding Protein) permettant son transfert dans les photorécepteurs, où il sera acheminé par la protéine IRBP dans

les disques membranaires au contact des protéines opsin (Mata et al., 2002 ; Arshavsky, 2002 ; Saari, 2012) (**Figure 9**).



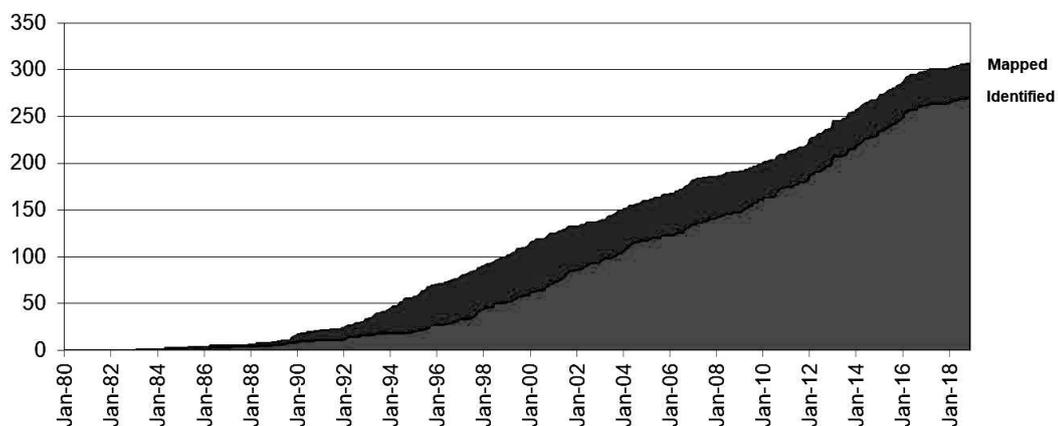
**Figure 9. Le cycle visuel.**

Représentation schématique des principales étapes du cycle visuel : 1) le rétinol de la Rhodopsine passe de l'état 11-*cis* à l'état tout-*trans* après avoir absorbé un photon au niveau des segments externes lors de la phototransduction, 2) le tout-*trans*-rétinal est exporté du segment externe vers l'EPR afin d'être ré-isomérisé en 11-*cis* rétinol, 3) le 11-*cis* rétinol est de nouveau transféré au niveau des disques des photorécepteurs. Ces différentes étapes sont réalisées par l'intermédiaire de différents enzymes et transporteurs. **ABCA4** ATP-binding cassette subfamily A member 4 ; **RDH12** retinol dehydrogenase 12 ; **IRBP** Interstitial Retinal Binding Protein ; **CRBP** Cellular Retinol Binding Protein ; **LRAT** Lecithin Retinol Acyltransferase ; **RPE65** RPE 65 isomerase ; **RDH5** retinol dehydrogenase 5 ; **CRALBP** Cellular Retinaldehyde Binding Protein. Adapté de Bessant et al., 2001.

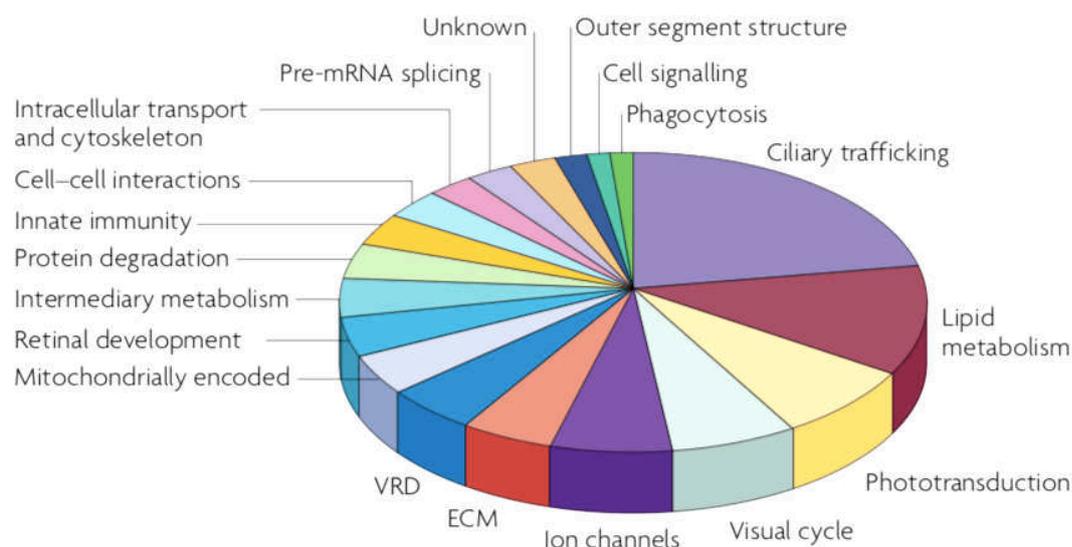
## II. Les rétinites pigmentaires

La vision est l'un de nos sens les plus précieux et sa perte est un handicap redouté. Les maladies dégénératives rétinienne peuvent avoir un impact énorme sur la qualité de vie.

La cécité peut être liée à des défauts localisés en dehors de la rétine, c'est le cas notamment de la cataracte, résultat de l'opacification du cristallin et première cause de perte de la vue dans le monde. Les maladies de la rétine, liées à des altérations ou à la perte de cellules rétinienne, constituent néanmoins une cause majeure et prédominante de malvoyance sévère et de cécité, le glaucome ou dégénérescence des cellules ganglionnaires représentant la deuxième cause de perte de la vision dans le monde (Kingman et al., 2004 ; Steinmetz et al., 2021). Dans les pays industrialisés, la cause la plus fréquente de cécité est la perte progressive des photorécepteurs et en particulier ceux localisés au niveau de la macula, c'est la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Elle est la première cause de cécité chez les personnes âgées de plus de 50 ans et touche plus de 30 % des personnes âgées de plus de 75 ans. C'est une maladie multifactorielle causée par des facteurs environnementaux et influencée par de nombreux gènes (Guillonnet al., 2017). Les formes héréditaires de dégénérescences rétinienne sont également des causes courantes de perte de la vision, avec une prévalence de 1 sur 3000 personnes. Des progrès importants ont été réalisés dans la découverte des locus et des gènes impliqués dans ces maladies, aujourd'hui une liste contenant plus de 250 gènes identifiés a été établi (Wright et al., 2010) (**Figure 10**).



**Mapped and Identified Retinal Disease Genes**



**Figure 10. Diversité génétique des dégénérescences réiniennes.**

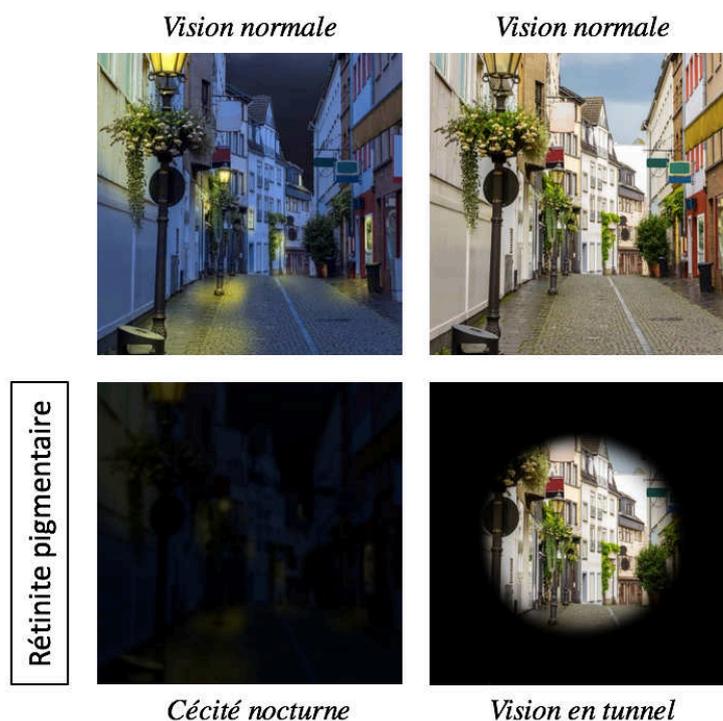
(En haut) Graphique représentant le nombre croissant de nouveaux gènes identifiés à l'origine de maladies dégénératives de la rétine, au cours des 40 dernières années. Extrait du Retinal Information Network. (En bas) Classification fonctionnelle des gènes impliqués dans les dégénérescences des photorécepteurs. Extrait de Wright et al., 2010.

La dégénérescence rétinienne héréditaire la plus fréquente, mais qui demeure une maladie rare, est la rétinite pigmentaire (RP). Elle représente 40 % des cas de dégénérescence rétinienne héréditaire avec une prévalence de 1 sur 3500 personnes. Bien que considérée comme une maladie rare en raison du petit nombre de patients observé pour chaque gène, elle est l'une des causes les plus courantes de déficience visuelle dans tous les groupes d'âge, et la plus répandue parmi la population active dans les pays développés (Verbakel et al., 2018). L'hétérogénéité très importante en termes de sévérité, de vitesse d'évolution, d'âge d'apparition et de mutation génique, en fait une maladie particulièrement complexe à étudier.

### ***II.1. Manifestations cliniques et diagnostique***

Les RP constituent un groupe de maladies héréditaires associées à des troubles dégénératifs de la rétine, d'abord caractérisées par une perte de vision scotopique associée à un rétrécissement du champ visuel périphérique moyen, et généralement suivi d'une perte de la vision centrale conduisant à la cécité complète (**Figure 11**). Les deux premiers symptômes sont dus à la mort des bâtonnets et constituent les premières manifestations de la maladie, qui sont

souvent à peine perceptibles par les personnes affectées. Leur apparition est extrêmement variable, les patients peuvent être affectés à tout âge, avec néanmoins une fréquence d'apparition plus élevée entre l'âge de 10 et 30 ans. L'évolution de la maladie conduit plus ou moins rapidement à la constriction du champ visuel, qui se produit lorsque la majorité des bâtonnets a dégénéré. L'acuité visuelle centrale est souvent préservée jusqu'aux stades avancés de la maladie, bien que les cônes soient également partiellement endommagés. La cécité totale apparaît à un stade plus tardif de la maladie, lorsque la macula est également atteinte (œdème maculaire ou atrophie fovéo-maculaire) (Dial et al., 2018).

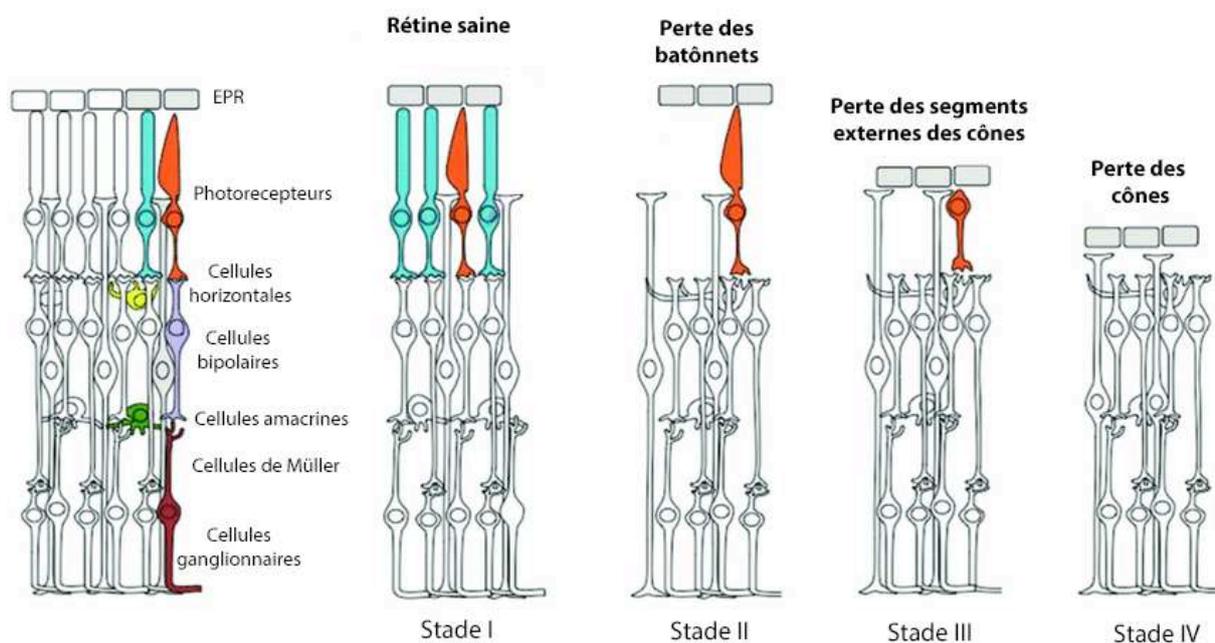


**Figure 11. Perception visuelle des patients atteints de Rétinites Pigmentaires.**

Les premiers symptômes de la maladie affectent la vision scotopique des patients, qui présentent une cécité nocturne en lien avec la dégénérescence des photorécepteurs de type bâtonnet. À des stades plus avancés, la mort des bâtonnets entraînent la perte secondaire des cônes qui se traduit par une constriction du champ visuel ou vision en tunnel, puis une cécité totale.

La dégénérescence rétinienne observée dans les RP se traduit chronologiquement par une altération des photorécepteurs qui évolue de la rétine périphérique vers la rétine centrale avec la perte des bâtonnets dans un premier temps, suivie ensuite par la mort des cônes. Le premier événement observé est le raccourcissement des segments externes des bâtonnets, souvent

associé à un dysfonctionnement du cil connecteur et des neurites de la terminaison synaptique, avant la mort de la cellule. Les cônes suivent alors le même processus fatal, avec une dégénérescence progressive aboutissant à la mort cellulaire. L'espace sous-rétinien disparaît, en raison de la migration des cellules de l'EPR vers les couches internes de la rétine, le réseau vasculaire localisé dans la choroïde et chargé de fournir de l'oxygène et des nutriments par le biais de l'EPR dégénère, et les cellules de Müller entrent en réponse dans une phase de gliose active (Milam et al., 1998). L'aboutissement de tous ces phénomènes conduit à la dégénérescence de la couche rétinienne externe, à l'origine de la perte de la vision (**Figure 12**).

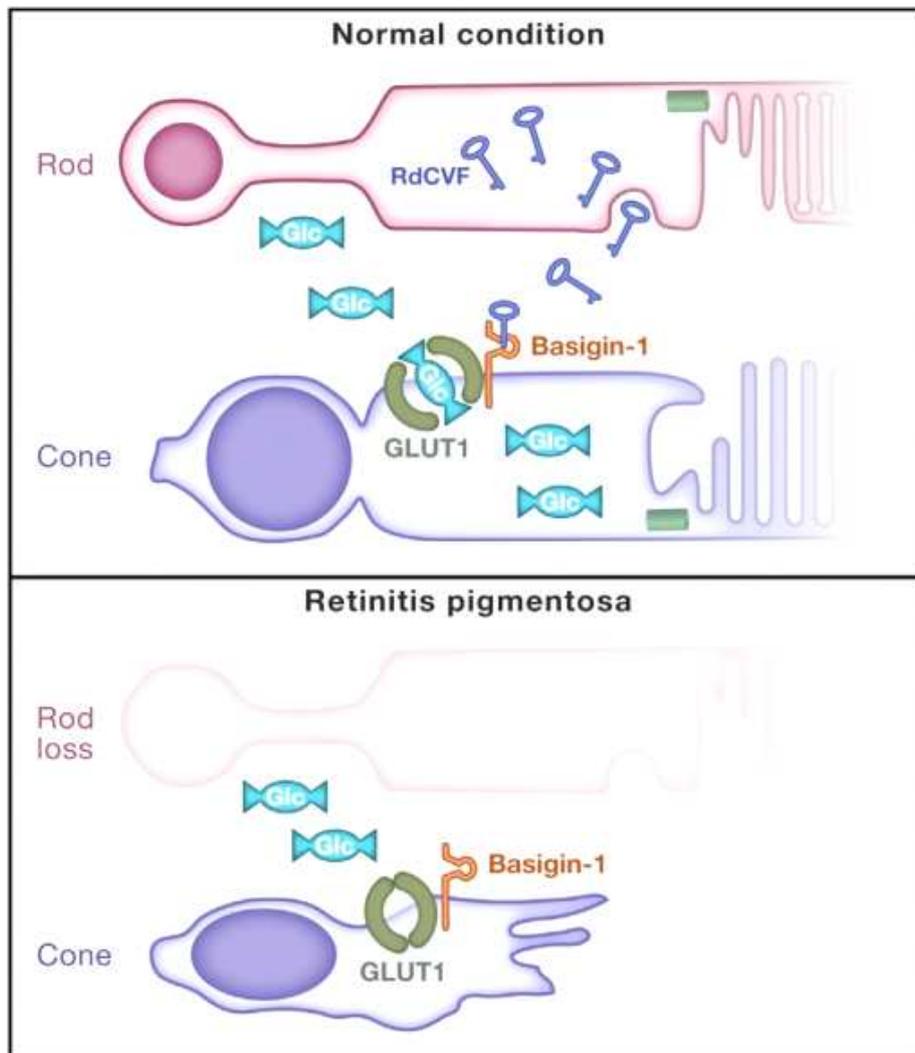


**Figure 12. Cinétique de la dégénérescence des photorécepteurs dans le cadre de la Rétinite Pigmentaire.**

La rétine saine est composée de six types cellulaires organisés de manière laminée. Dans les rétinites pigmentaire, les mutations mènent dans un premier temps à la dégénérescence des bâtonnets (STADE I), suivie par la dégénérescence progressive des cônes (STADE II et III). Au dernier stade (STADE IV), la perte des cellules photoréceptrices mène à une avancé des cellules de l'EPR vers la rétine interne. Adapté de Dalkara et al., 2016.

L'existence d'une cinétique clinique commune, menant systématiquement à la mort des cônes suite à une dégénérescence avancée des bâtonnets, a donné lieu à différentes explications (Campochiaro et al., 2018). La première repose sur la nocivité des bâtonnets mourants, liée à la sécrétion de substances toxiques par ces derniers. La deuxième prend en compte la réduction

du support trophique apporté par les bâtonnets aux cônes. En jeu, le facteur trophique RdCVF (Rod-derived Cone Viability Factor) qui, libéré par les bâtonnets, favorise la survie des cônes et l'intégrité des segments externes. En se liant à son récepteur membranaire Basigin-1, exprimé à la surface des cônes, RdCVF permet de stimuler l'entrée du glucose et la glycolyse aérobie dans les cônes (Léveillard et Sahel, 2010 ; Aït-Ali, et al. 2015) (**Figure 13**). La perte du soutien trophique rend aussi les cônes plus vulnérables aux stress oxydatif et métabolique, ainsi lorsque les bâtonnets meurent, l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène entraîne la perte des cônes (Elachouri et al., 2015).

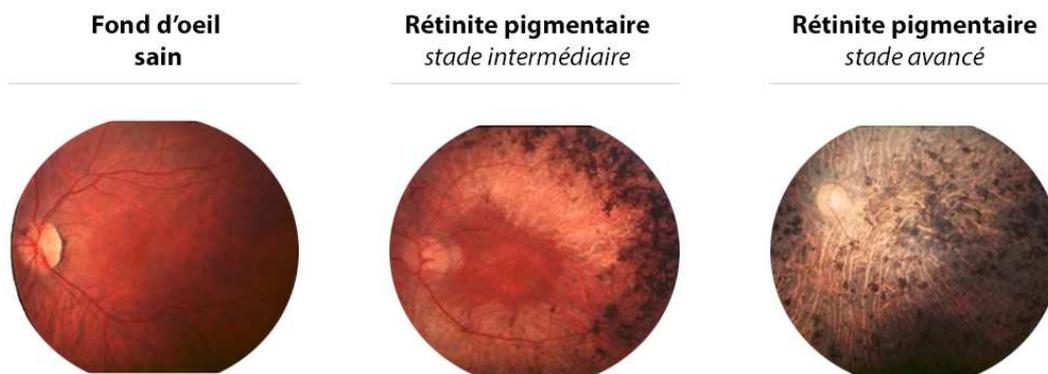


**Figure 13. Les bâtonnets favorisent la survie des cônes.**

Dans les rétines saines, les bâtonnets sécrètent le RdCVF (Rod-derived Cone Viability Factor), facteur nécessaire à la survie des cônes. Le RdCVF se lie au Basigin-1, qui via l'intermédiaire du transporteur de glucose GLUT1, régule l'absorption de glucose par les cônes. Lorsque les bâtonnets sont perdus, l'absence de RdCVF restreint la glycolyse des cônes, entraînant leur dégénérescence. Extrait de Krol et Roska, 2015.

Le diagnostic clinique des RP repose principalement sur l'examen du fond de l'œil et des tests fonctionnels de la rétine.

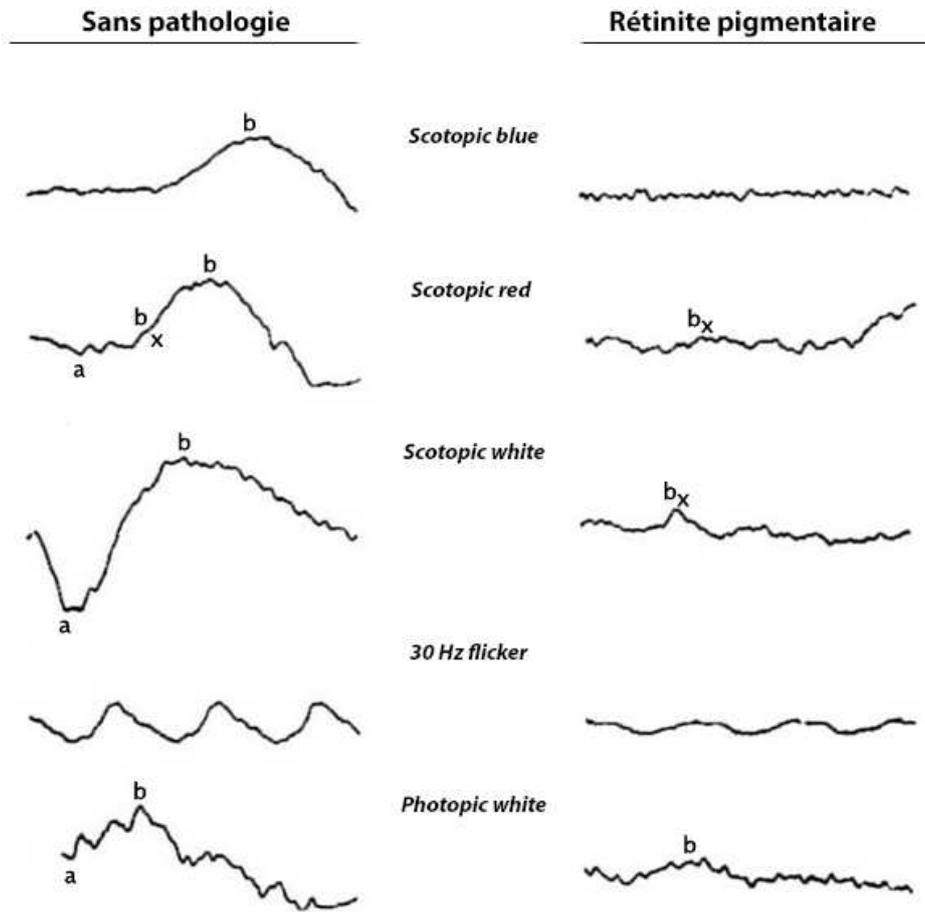
Certains changements, tels que le rétrécissement artériel, l'atténuation des vaisseaux rétiniens, la pâleur cireuse du nerf optique, les cataractes subcapsulaires postérieures, ou la présence de points blancs profonds dans la rétine, sont souvent observés mais ne sont pas spécifiques aux RP. La modification la plus célèbre et typique, à l'origine du nom de la maladie, est la perte de pigment de l'EPR formant des amas intrarétiniens de mélanine qui apparaissent comme des taches noires sur la rétine (Verkabel et al., 2018) (**Figure 14**). La tomographie en cohérence optique (OCT) peut également être utilisée afin de mesurer l'épaisseur rétinienne et ainsi suivre le cours de la dégénérescence. C'est une technique d'imagerie médicale tridimensionnelle non invasive, qui utilise une onde lumineuse située dans l'infrarouge proche permettant de pénétrer profondément dans les tissus. Les images sont capturées avec une résolution micrométrique, permettant d'identifier chaque couche de la rétine, et ainsi de mettre en évidence chez les patients atteints de RP, la réduction de l'épaisseur de la CNI et de la couche la plus externe composée des segments externes des photorécepteurs (Liu et al., 2016).



**Figure 14. Fonds d'œil de patients atteints de Rétinites Pigmentaires, à différents stades de la pathologie.**

Au stade intermédiaire, des dépôts pigmentaires et une atteinte de la vascularisation sont visibles sur les fonds d'œil de patients atteints de RP, en dehors de la macula. La macula est atteinte aux stades plus avancés de la maladie, le fond d'œil présente alors un aspect cireux et un disque optique pâle, signe de l'atrophie vasculaire. Adapté de Hamel et al., 2006.

Outre ces aspects purement descriptifs, les critères fonctionnels participent également au diagnostic des RP. Des tests du champ visuel sont utilisés pour déterminer la présence de scotomes, lacunes ou taches aveugles dans le champ visuel, correspondant à des régions où les photorécepteurs ont dégénéré. Les électrorétinogrammes (ERG) sont également essentiels et très informatifs concernant l'état fonctionnel des photorécepteurs et le stade de la dégénérescence. Cet examen permet d'analyser la réponse électrique de la rétine à une stimulation lumineuse, et de distinguer, au moyen de lumières d'intensités et de couleurs différentes, l'activité des cônes et celle des bâtonnets. Ainsi, les cônes seront plutôt stimulés par les fortes intensités et la couleur rouge, tandis que les bâtonnets seront activés par les faibles intensités et la couleur bleu. Après adaptation à l'obscurité, les potentiels électriques en réponse à la lumière sont enregistrés par des électrodes placées en contact avec la cornée. Les signaux électriques recueillis sont représentatifs de l'état général de la rétine (ERG flash), ou d'une région particulière de celle-ci (ERG multifocal). Les patients atteints de RP présentent typiquement des réponses retardées et d'amplitudes réduites pour les bâtonnets et les cônes. Dans les stades les plus avancés de la maladie, les réponses à l'ERG deviennent souvent trop faibles pour être enregistrables (Verkabel et al., 2018) (**Figure 15**).



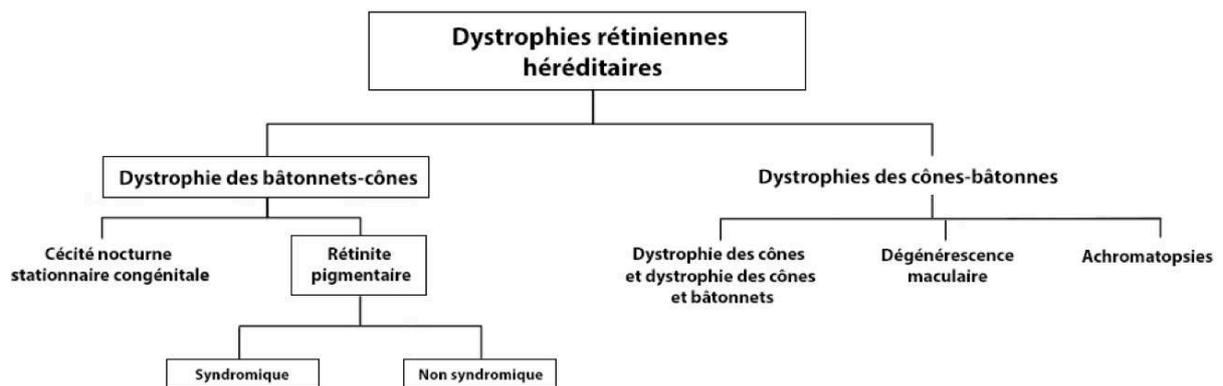
**Figure 15. Réponse à l'ERG de patient atteint de Rétinites Pigmentaires.**

Les enregistrements scotopique bleu et scotopique rouge correspondent aux réponses médiées par les bâtonnets. Le flash bleu est suffisamment faible pour qu'aucune onde a ne puisse être discernée en absence de pathologie, ne laissant que l'onde b plus lente caractéristique des bâtonnets. Le flash rouge est suffisamment puissant pour que les oscillations photopiques et la composante bx puissent être observées juste après l'onde a. La stimulation scotopique blanche, flash blanc puissant dans l'obscurité, est celle produisant la plus grande amplitude de réponse à l'ERG. Chez le patient elle n'entraîne ni d'onde a, ni b, mais l'apparition anormale de la composante bx. Le scintillement de 30 Hz illustre la réponse des cônes en récupération rapide, et la réponse photopique (photopic white) est représentative d'une réponse normale des bâtonnets plus sensibles, blanchis par l'éclairage de fond. **a** onde a ; **b** onde b ; **bx** composante bx. Adapté de Creel, 2019.

## II.2. Classification et aspects génétiques

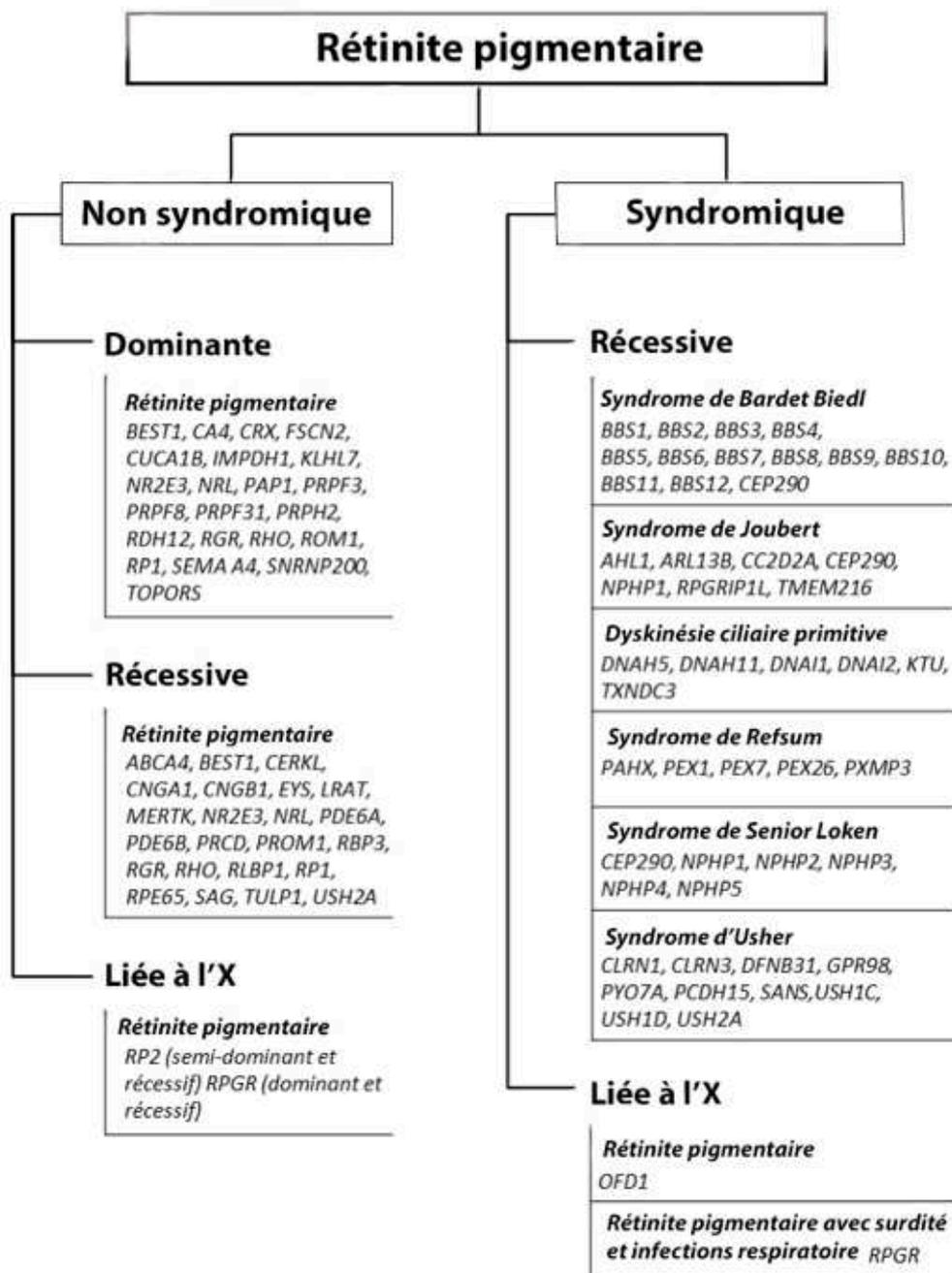
Les RP appartiennent aux dystrophies de type bâtonnets-cônes et s'inscrivent plus largement au sein des dystrophies rétiniennes héréditaires (**Figure 16**).

Elles sont distinguées selon l'étendue du spectre de leur(s) manifestation(s), non syndromiques lorsque les symptômes sont limités à la vision, syndromiques lorsqu'elles affectent d'autres systèmes sensoriels ou non (**Figure 17**).



**Figure 16. Classification des dystrophies rétiniennes héréditaires affectant les photorécepteurs.**

Adapté de Berger et al., 2010.



**Figure 17. Classification des Rétinites Pigmentaires et principaux gènes impliqués.**

Adapté de Berger et al., 2010

### Les rétinites pigmentaires syndromiques

Environ 20 à 30 % des patients atteints de RP présentent une RP syndromique, regroupant plus de 30 syndromes non-oculaires associés différents, parmi lesquels deux principaux en terme de nombre de patients atteints et de gènes identifiés (Daiger et al., 2013 et Verbakel et al., 2018) :

- Le syndrome de Bardet-Biedl, qui représente 5-6% des cas de RP, se caractérise par l'association d'autres symptômes tels qu'une obésité, une polydactylie post-axiale, une atteinte de la fonction rénale, un hypogénitalisme et un déficit intellectuel plus ou moins sévère (Chennen et al., 2014). Ces différentes atteintes sans corrélation apparente ont été expliquées par un dysfonctionnement du métabolisme ciliaire partagé par l'ensembles des systèmes affectés. L'association de ces atteintes définit une nouvelle famille de maladie, les ciliopathies. D'autres ciliopathies avec atteinte rétinienne sont connues bien que moins fréquentes, avec à titre d'exemple le syndrome de Joubert qui correspond à une atteinte plus générale du système nerveux central avec une malformation congénitale du tronc cérébral ; pouvant être associés à des troubles respiratoires, un nystagmus, une hypotonie, une ataxie et un retard du développement moteur (Romani et al., 2013). De même que le syndrome de Bardet-Biedl, ces syndromes sont des maladies très hétérogènes sur le plan génétique (7 gènes rapportées codent pour des protéines du cil primaire) (Fliegau et al., 2006).
- Le syndrome d'Usher, qui représente 14% des cas de RP avec une prévalence de 1 sur 30 000 personnes, est la cause la plus fréquente de surdité-cécité héréditaire (Hamel et al., 2006). La surdité neurosensorielle associée à la RP peut être profonde et présente dès la naissance avec des troubles vestibulaires (syndrome d'Usher type 1), ou d'une intensité modérée à faible et non-progressive (type 2). La forme de type 3, très rare, associe une surdité progressive ainsi qu'une ataxie vestibulaire, dont le degré d'atteinte peut varier. Les types 1 et 2 du syndrome d'Usher sont les formes les plus fréquemment observées, puisqu'elles représentent à elles deux environ 90 à 95% des cas. Au moins 12 loci chromosomiques ont été identifiés jusqu'à présent et assignés aux trois formes cliniques majeures (Saihan et al., 2009).

Et de nombreux autres syndromes plus rares, qui relèvent souvent de défauts métaboliques. La maladie de Refsum peut-être citée en exemple, elle se caractérise par l'accumulation d'acide phytanique dans le plasma et les tissus, conséquence d'un trouble du métabolisme des lipides.

Elle associe à la RP une anosmie systématique, qui peut s'ajouter à une neuropathie, une surdité et une ichtyose (Wanders et al., 2006).

### Les rétinites pigmentaires non syndromiques

Les formes de RP non syndromiques, dont les symptômes se restreignent à une perte de la vision, sont les plus fréquentes avec une prévalence estimée à 1 sur 4000 naissances, soit plus d'un million de personnes à travers le monde (Daiger et al., 2013). Leur diversité génétique se traduit par l'existence de plus de 3100 mutations et environ 70 gènes ou locis différents actuellement connus comme causales, mais aussi la variété du mode de transmission héréditaire possible (Guadagni et al., 2015 ; Dias et al., 2018). Les trois modes de transmission mendélienne sont représentés : entre 15 et 20% des cas de RP sont issus de transmission autosomique dominante, entre 20 et 30% de transmission autosomique récessive, et 6 à 10% liée au chromosome X (**Figure 18**). De très rares cas de transmission mitochondriale ont été rapportés et sont généralement associés à des formes de RP atypiques et syndromiques (Hartong et al., 2006).

Les différents gènes associés aux RP peuvent être catégorisés en six grandes classes selon le rôle biologique de la protéine codante : la phototransduction, le métabolisme rétinien, le développement et la différenciation cellulaire rétinienne, la structure cellulaire et l'épissage des ARN pré-messagers (Berger et al., 2010).

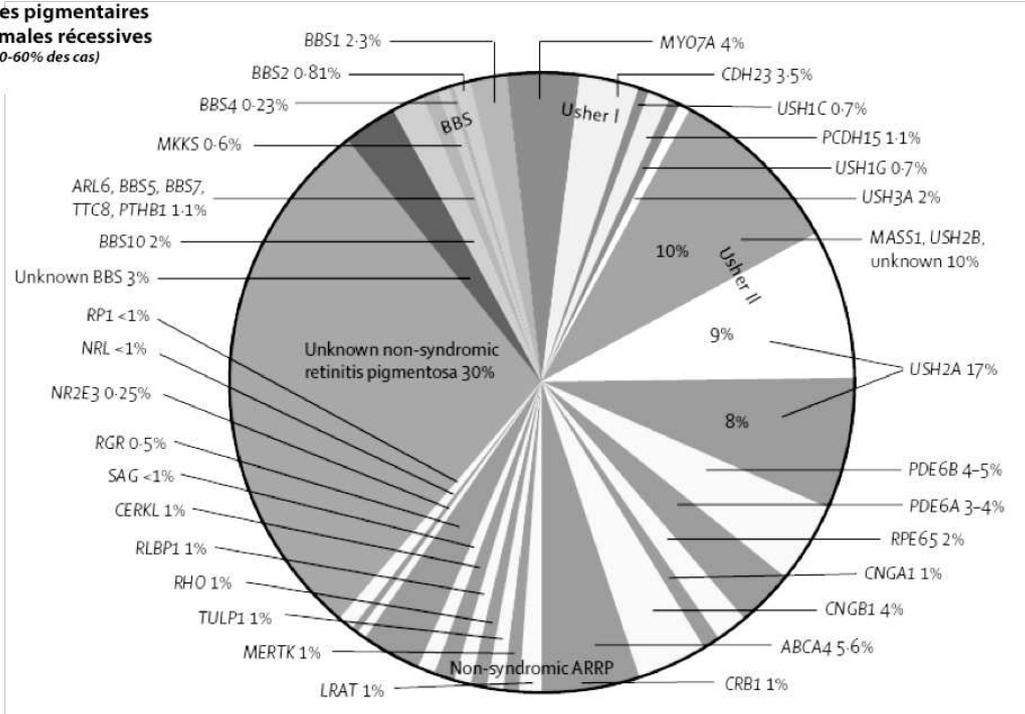
Au sein de la cascade de phototransduction, de nombreux gènes codant notamment pour des canaux ioniques ou des enzymes, et de nombreuses mutations ont été identifiés comme responsables de RP. Parmi eux, CRALBP, mais aussi LRAT et RPE65 dont les mutations mènent à des formes très sévères de RPs, une maladie nommée amaurose congénitale de Leber (Chacon-Camacho et al., 2015). Cette classe inclut également le gène codant la RHODOPSINE (RHO), c'est le gène le plus fréquemment retrouvé muté, il représente plus de 20% des cas de RP autosomique dominante. Plus de cent mutations ponctuelles de RHO ont été décrites, chacune étant suffisante pour développer la maladie (Athanasίου et al., 2018).

Des mutations dans certains gènes codant des protéines responsables de fonctions biologiques spécifiques des cellules de l'EPR, tels que MERTK ou BESTROPHIN-1 peuvent également être responsables de formes rares de RP. Des gènes codant des facteurs de transcription importants pour la différenciation rétinienne et plus particulièrement ceux qui interviennent dans le lignage des photorécepteurs, tels que les facteurs de transcription NRL et NR2E3

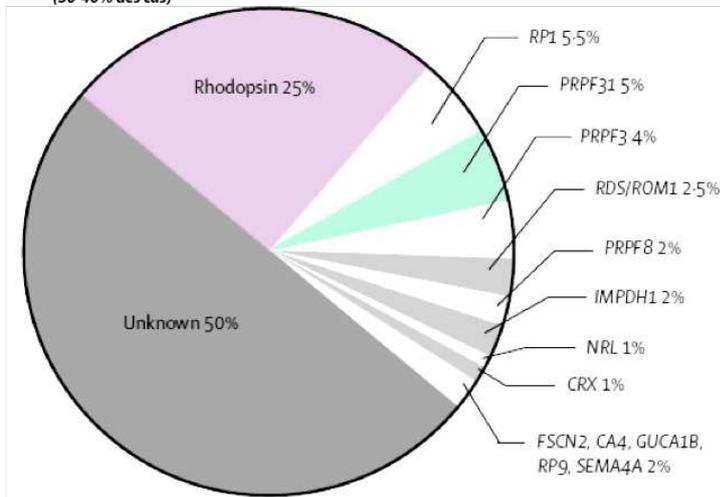
impliqués dans la spécification cône versus bâtonnet (Bessant et al., 1999). Enfin, la structure particulière des photorécepteurs est déterminée par un ensemble de protéines qui maintiennent la forme caractéristique des segments externes. Des mutations dans certains gènes codant ces protéines tels que ROM1, PERIPHERINE ou FASCININE-2 peuvent engendrer des RP (Kajiwara et al., 1994, Goldberg et Molday, 1996 ; Apfelstedt- Sylla et al., 1995).

Tandis que les cinq premières classes réunissent des gènes majoritairement ou exclusivement exprimés dans la rétine, la dernière grande catégorie de gènes responsables de RP concerne une famille de gènes codant des protéines du spliceosome impliquées dans la machinerie d'épissage des ARNms. Trois protéines spécifiques, regroupées sous l'appellation PRPF (Pre-mRNA Processing Factor), PRPF3, PRPF8 et PRPF31 sont impliquées et responsables d'environ 15% des formes autosomiques dominantes de RP. Il n'existe à ce jour aucune explication précise permettant de comprendre pourquoi et comment une mutation sur une protéine ubiquitaire, induit des dommages uniquement dans l'œil.

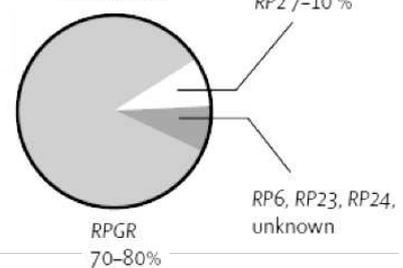
**Rétinites pigmentaires autosomales récessives**  
(50-60% des cas)



**Rétinites pigmentaires autosomales dominantes**  
(30-40% des cas)



**Rétinites pigmentaires liées à l'X**  
(5-15% des cas)



**Figure 18. Répartition des gènes responsables de Rétinites Pigmentaires, classés selon le mode de transmission de la pathologie.**

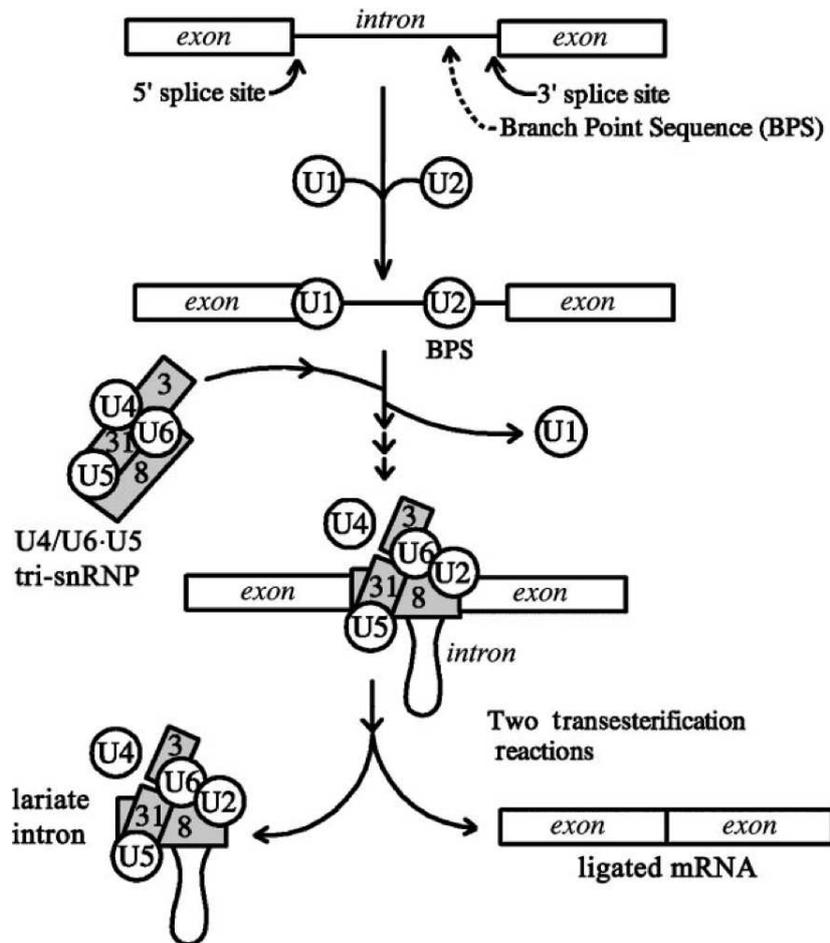
Extrait de Hartong et al., 2006.

## ***II. 3. Gènes d'intérêt de l'étude***

### **PRPF31**

Le gène *PRPF31* est situé sur le chromosome 19 dans la région q13.4 et comprend 14 exons pour une taille de 16 kb. Il code pour la protéine PRPF31, composée de 499 acides aminés, et un poids moléculaire de 61 kDa (Rose et al., 2017).

Cette protéine joue un rôle essentiel pour le fonctionnement du complexe qui assure l'épissage des ARN pré-messagers (pré-ARNm), le splicéosome (**Figure 19**). Il est formé d'un ensemble de cinq petites ribonucléoprotéines (U1, U2, U4, U5, et U6) qui permettent de réaliser l'excision des séquences introniques et la suture des exons (Will et Luhrmann, 1997 ; Hastings et Krainer, 2001). L'épissage majeur est initié par la liaison de la ribonucléoprotéine (« small nuclear ribonucleoprotein » ou snRNP) U1 en 5' du site d'épissage du pré-ARNm, et de la snRNP U2 en 3' au niveau du point d'embranchement (BPS) (Hastings et Krainer, 2001 ; Pacione et al., 2003). Le splicéosome devient actif après la liaison du complexe protéique, formé par l'association des snRNP U5 et U4 / U6, 5' de la séquence d'épissage. Chacune des snRNP est liée spécifiquement avec un facteur d'épissage de pré-ARNm, respectivement PRPF3, PRPF31 et PRPF8 (Makarova et al., 2002). Divers réarrangements ont lieu entre les snRNP, les facteurs d'épissage et la séquence intronique : la snRNP U5 se lie en 5', libérant ainsi le snRNP U1. Les snRNP U4 et U6 se dissocient l'une de l'autre, permettant à U6 et U2 de se lier. Le noyau catalytique formé entre U2, U5, et U6 permet l'élimination de l'intron du pré-ARNm (Pacione et al., 2003 ; Schultz et al., 2006). Le facteur PRP31 joue un rôle crucial au sein du splicéosome en stabilisant dans un premier temps le complexe tri-snRNP U5 U4/U6. Il régule la liaison de la snRNP U4 à la séquence intronique et facilite la dissociation des snRNP U4 et U5 (Weidenhammer et al., 1997 ; Liu et al., 2007).



**Figure 19. Rôle de PRPF31 dans l'épissage des ARNm.**

La maturation des pré-ARNm nécessite deux étapes cruciales : l'excision des introns, et l'épissage des exons. Elles sont réalisées par un complexe protéique de 6 sous-unités, le spliceosome, dont la stabilité est assurée par les facteurs de la famille PRPF. Le processus se décompose en différentes étapes : 1) les sous unités U1 et U2 se fixent sur la séquence intronique, 2) formation du tricomplexe U4/U5/U6 stabilisé par PRPF3, PRPF31 et PRPF8, 3) liaison du tricomplexe à la séquence intronique libérant U1 et U4, 4) le noyau catalytique formé par U2, U5 et U6 permet l'élimination de l'intron du pré-ARNm. **3** PRPF3 (Pre-mRNA Processing Factor 3) ; **31** PRPF31 ; **8** PRPF8 ; **U1/2/3/4/5/6** SnRNP (Small nuclear Ribonucleoprotein). Extrait de Pacione et al., 2003.

Les mutations dans le gène *PRPF31* sont à l'origine de 5 à 10% des RP autosomiques dominantes, soit environ 2.5% de l'ensemble des RP, il s'agit ainsi du second gène le plus fréquemment muté chez les patients atteints de RP autosomiques dominantes (Hartong et al., 2006 ; Sullivan et al., 2006 ; Vithana et al., 2003). Près de 140 mutations différentes du gène *PRPF31* ont été recensées à ce jour, localisées sur l'ensemble de la séquence génique mais plus communément au niveau des exons 6 à 10, et en particulier dans les exons 7 et 8 (Daiger et al., 2013 ; Wheway et al., 2020). L'éventail de mutations comprend tous les types de mutations répertoriées : des mutations non sens, des mutations faux sens, des insertions, des duplications,

et/ou des délétions plus au moins importantes, qui bien que variées mènent toutes à la perte de fonction de PRPF31 (Rose et al. 2017 ; Wheway et al., 2020).

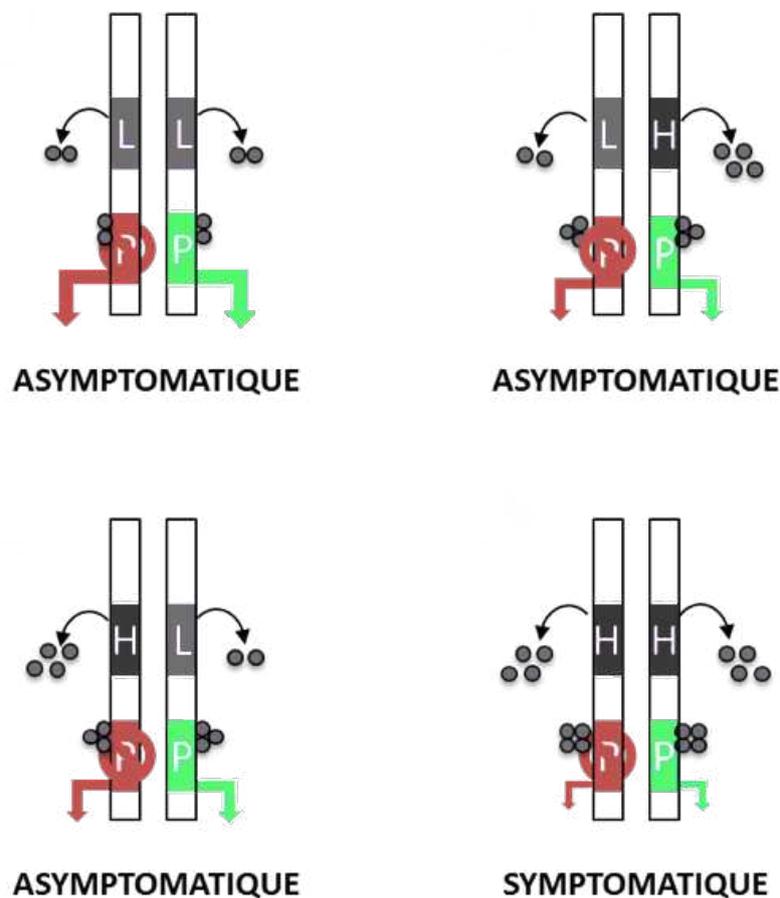
Le phénotype, l'âge d'apparition et la gravité de la maladie chez les patients varient selon le type de mutation. De plus, au sein d'une même famille, la même mutation peut être associée à des variations phénotypiques, comme rapporté dans plusieurs études familiales réalisées à travers le monde au cours des vingt dernières années en Angleterre (Al-Magthteh et al., 1994 ; Vithana et al., 2001), Colombie (Al-Magthteh al., 1996 ; Vithana et al., 1998), Chine (Xia et al., 2004 ; Liu et al., 2008 ; Xu et al., 2012 ; Lu et al., 2013 ; Xiao et al., 2017 ; Cao et al., 2020), Inde (Saini et al., 2013 ; Bhatia et al., 2018), Etats-Unis (McGee et al., 1997 ; Bryant et al., 2017) et en France (Audo et al., 2010). L'ensemble de ces études a révélé la présence de patients asymptomatiques, mettant en évidence la pénétrance incomplète de la pathologie. La pénétrance incomplète d'un phénotype est souvent associée à l'hypothèse d'haplo-insuffisance. L'haplo-insuffisance se définit par la capacité de l'allèle sain à produire la protéine sauvage en quantité suffisante, malgré la présence de l'allèle pathologique. Un haut niveau d'expression de l'allèle sauvage permet de compenser le déficit d'expression de l'allèle muté, et ainsi d'assurer la fonction biologique de la protéine chez les patients asymptomatiques. A l'inverse un taux d'expression insuffisant de l'allèle sauvage, par rapport au niveau d'expression nécessaire de la protéine requise, ici PRPF31, entraîne les symptômes de la RP. Cette hypothèse principale a été appuyée par différentes études menées, montrant que les patients symptomatiques diffèrent principalement des patients asymptomatiques porteurs de la même mutation, par les niveaux d'ARNm de PRPF31 produits (Waseem et al., 2007 ; Venturini et al., 2012).

À la lumière des différents résultats démontrant la corrélation de la pénétrance incomplète de la maladie et le niveau d'expression de *PRPF31*, des modèles de co-régulation de l'expression de *PRPF31* ont été proposés et établis :

- L'expression quantitative du trait locus eQTL: situé dans la région 14q21-23 et capable de réguler la transcription des deux allèles de *PRPF31* en trans (Rio Frio et al., 2008).
- Le niveau d'expression de *CNOT3* : gène isoallélique situé en 19q13.4 proche de *PRPF31*, a été décrit comme un régulateur négatif spécifique de *PRPF31*. La protéine CNOT3 agit en se liant directement au promoteur de *PRPF31*, l'expression de CNOT3 est ainsi inversement proportionnelle à celle de PRPF31 (Venturini et al., 2012). CNOT3 étant lui-même soumis à des variations d'expression soit à cause d'un polymorphisme du gène ou bien suite à l'action des facteurs de l'eQTL (Utz et al., 2013). L'ensemble de ces études suggère que le phénotype de la maladie serait

déterminé par le co-héritage allélique *PRPF31* (un mutant et un sauvage) et *CNOT3* (deux allèles correspondants aux variants fortement exprimés) (Rose et al., 2014) (**Figure 20**).

- Le nombre de répétitions du mini-satellites MSR1 (Minisatellite repeat element 1) : située environ 600 pb en amont du site d'initiation de la transcription du promoteur de *PRPF31*, cette séquence présente un nombre variable de copies dans la population, qui est corrélé à la pénétrance de la maladie. Tandis que l'allèle « de haute-expression » présentant 4 répétitions n'est jamais observé chez les patients asymptomatiques, celui présentant 3 copies est associé à une activité répressive de la transcription (Rose et al., 2016).



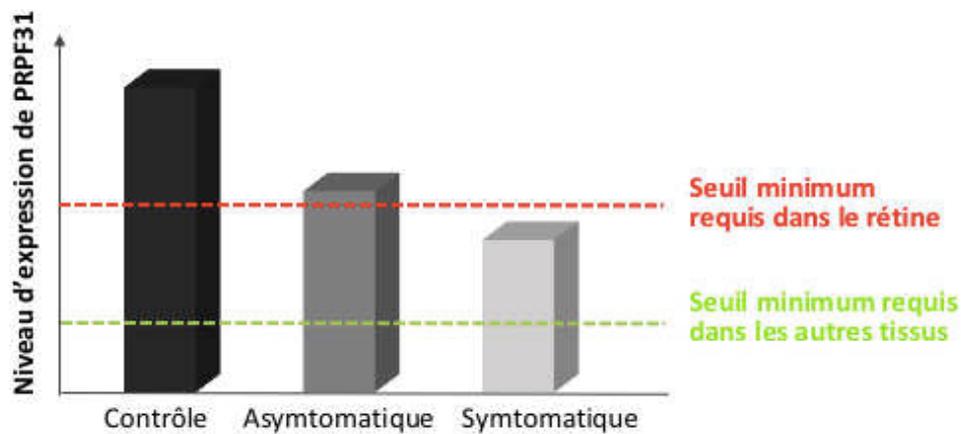
**Figure 20. Modulation de l'expression de PRPF31 par CNOT3.**

*CNOT3* est un régulateur négatif de la transcription de *PRPF31*, leurs niveaux d'expression sont donc inversement proportionnels. La maladie est associée à une combinaison d'un allèle muté *PRPF31* et de deux allèles de haute expression pour le gène *CNOT3*. La présence d'un allèle *CNOT3* de faible expression donne lieu à un phénotype asymptomatique. **L** allèle *CNOT3* de faible expression ; **H** allèle *CNOT3* de haute expression ; **Signe rouge barré** allèle muté de *PRPF31* ; **P** allèle sauvage de *PRPF31*. Adapté de Rose et al., 2014.

Le mécanisme d'épissage étant requis dans toutes les cellules de l'organisme, plusieurs études ont été menées afin de comprendre pourquoi les mutations du gène *PRPF31* entraînent exclusivement une atteinte rétinienne (RP non syndromiques). L'existence d'isoformes spécifiques de *PRPF31* dans la rétine a été exclue (Tanackovic et Rivolta, 2009). En revanche, il a été montré, d'abord chez la souris adulte (Cao et al., 2011), puis confirmé chez l'homme (Tanackovic et al., 2011), que les niveaux d'expression des facteurs d'épissage, dont *PRPF31* et les cinq snRNPs, sont plus élevés dans la rétine que dans les autres tissus, suggérant qu'une forte activité basale d'épissage est requise spécifiquement dans la rétine. Ainsi, bien que des mutations dans *PRPF31* confèrent des insuffisances d'épissage dans tous les tissus, la haute activité d'épissage requise dans la rétine par rapport aux autres tissus conduit à des manifestations de la maladie spécifiquement dans le tissu rétinien (**Figure 21**). Cette forte activité d'épissage requise attribuée aux cellules de la rétine peut s'expliquer par la nécessité du renouvellement constant des segments externes des photorécepteurs, mais aussi le besoin de synthétiser continuellement de grandes quantités de protéines impliquées dans la phototransduction.

De nombreux transcrits dont l'épissage est dépendant de *PRPF31* ont été mis en évidence, parmi eux certains sont issus de gènes connus pour être potentiellement responsables de RP en cas de mutations tels que *PRPH2* (Retinal Degeneration Slow, peripherine) et *FSCN2* (retinal actin-binding protein fascin) (Mordes et al., 2007). Des études menées sur des cultures primaires de neurones rétiniens de souris post-natales, exprimant des formes mutées de *Prpf31*, ont mis en évidence un épissage réduit de l'intron 3 du gène *Rho*, engendrant une réduction de l'expression de la protéine et une apoptose des cellules rétiniennes porteuses de la mutation (Yuan et al., 2005). À l'inverse d'autres études, réalisées notamment sur des lymphocytes de patients, démontrent un effet mineur ou inexistant d'une mutation du gène *PRPF31* sur l'épissage dans ces cellules (Deery et al., 2002 ; Rivolta et al. 2006). Des études récentes, menées sur des organoïdes rétiniens et des cellules de l'EPR dérivés de cellules souches pluripotentes induites (iPS) de patients portant des mutations sur le gène *PRPF31*, montrent une expression différentielle des transcrits de gènes impliqués dans l'épissage et l'épissage alternatif des pré-ARNm, le cytosquelette d'actine, la membrane ciliaire, les cils primaires, les segments interne et externe des photorécepteurs, les protéines de la terminaison axonale et les protéines de la phototransduction. De plus, les organoïdes de patients présentent un enrichissement de transcrits différemment épissés de gènes impliqués dans l'organisation des microtubules et du centriole. Ceci suggère que le centriole, la ciliogénèse et la fonction ciliaire sont tous régulés

par un mécanisme d'épissage alternatif, qui est défectueux chez les patients présentant des mutations dans le gène *PRPF31* (Buskin et al. 2019 ; Azizzadeh Pormehr et al., 2020).

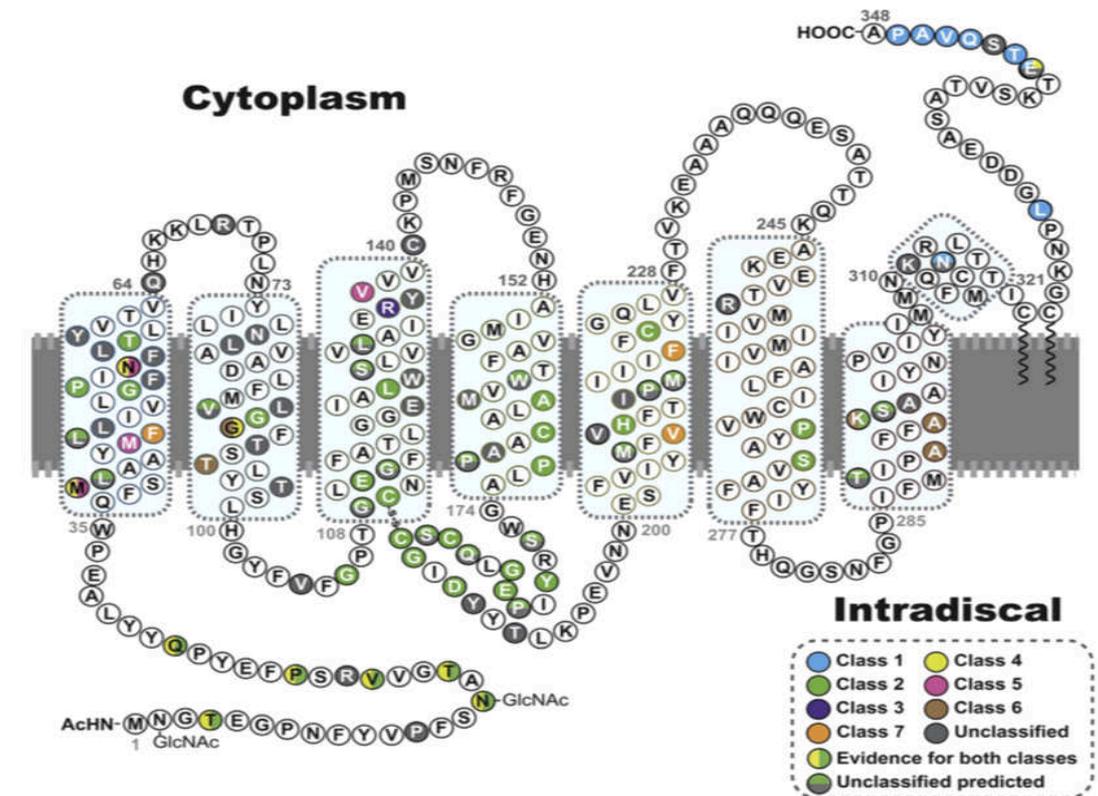


**Figure 21. Représentation du modèle d'haploinsuffisance proposé pour PRPF31.**

Même si la mort des cellules photoréceptrices explique aisément la cécité observée chez les patients atteints de RP, le ou les types cellulaires rétiniens initialement affectés par les mutations du gène *PRPF31* n'ont pas été clairement identifiés. La génération de modèles murins a indiqué que l'inactivation totale du gène *Prpf31* était létal au stade embryonnaire (Bujakowska et al., 2009). En revanche, les souris *Prpf31*<sup>+/-</sup> présentent des changements dégénératifs dans l'EPR associés à une diminution de l'adhérence rétinienne entre l'EPR et les photorécepteurs, et une diminution de l'activité phagocytaire des cellules de l'EPR (Graziotto et al., 2011). Le même phénotype a été observé avec une lignée humaine de cellules de l'EPR (ARPE-19) où l'expression de PRPF31 a été réprimée par des petits ARN interférents (siRNA). La localisation et l'expression de certains marqueurs d'adhésion, telle que la sous-unité β5 de l'intégrine et de protéines impliquées dans la phagocytose comme le récepteur MerTK, sont également perturbées dans les cellules de l'EPR des souris *Prpf31*<sup>+/-</sup> (Farkas et al., 2014). Toutes ces données, recueillies dans différentes espèces, s'accordent sur le fait que les cellules de l'EPR seraient les premières cellules affectées par les mutations du gène *PRPF31*, entraînant potentiellement chez l'homme la mort secondaire des photorécepteurs. Cependant, d'autres données établies chez le poisson-zèbre ont démontré que l'épissage aberrant de transcrits spécifiques des photorécepteurs pouvait également contribuer à la mort des cellules photoréceptrices par un mécanisme cellulaire autonome, indépendant de l'atteinte des cellules de l'EPR (Yin et al., 2011). Ainsi, chez l'Homme la question de l'étiologie de la dégénérescence rétinienne engendrée par une mutation du gène *PRPF31* reste entière.

## RHODOPSINE

Le gène *RHODOPSINE* (*RHO*) est situé sur le chromosome 3 dans la région 3q21.24, et comprend 5 exons pour une taille de 1044 pb. Il code pour la protéine RHO, composée de 348 acides aminés, qui appartient à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G. Elle se localise spécifiquement dans les photorécepteurs de type bâtonnet, et est organisée en trois domaines distincts : la partie N-terminale intra-discale, la partie transmembranaire constituée de 7 domaines hélicoïdaux qui représente environ 65% de la protéine, et la partie C-terminale localisée dans le cytoplasme des segments externes (Napier et al., 2014) (**Figure 22**).



**Figure 22. Structure de la Rhodopsine et les principales mutations connues associées à une Rétinite Pigmentaire.**

La Rhodopsine est un récepteur couplé aux protéines G comptant 7 domaines transmembranaires, une partie C-terminale cytosolique, et une partie N-terminale localisée entre les disques des segments externes des bâtonnets. C'est le gène le plus fréquemment muté chez les patients atteints de RP autosomiques dominantes. L'existence d'un large spectre de mutations a mené à l'établissement d'une classification déterminée sur le critère du dysfonctionnement cellulaire engendré. **Class I** défaut de transport de la Rhodopsine non lié à

une anomalie de repliement ; **Class II** séquestration dans le réticulum endoplasmique affectant le recyclage du 11-cis-retinal ; **Class III** défaut d'endocytose ; **Class IV** modifications post-transcriptionnelles altérant la stabilité de la protéine ; **Class V** sur-activation de la Transducine ; **Class VI** activation constitutive de la Rhodopsine ; **Unclassified** mutations ne présentant pas de conséquences biochimiques ou cellulaires connues. Extrait de Athanasiou et al., 2017.

Cette protéine, qui constitue le pigment visuel des bâtonnets, joue un rôle central dans le processus de phototransduction (détaillé en I.3).

Les mutations dans le gène *RHO* sont responsables de plus de 20% des RP autosomiques dominantes à travers le monde, c'est le gène le plus fréquemment muté chez les patients atteints de RP autosomiques dominantes. Cette prévalence varie à travers le monde : aux Etats-Unis les mutations du gène *RHO* représentent jusqu'à 26% des patients atteints, tandis que les populations d'Asie montrent une prévalence plus faible, moins de 7% pour la Chine, moins de 6% au Japon, et moins de 2% en Inde (Sullivan et al. 2006 ; Chan et al., 2001 ; Ando et al., 2007 ; Gandra et al., 2008). Les études de cohortes européennes montrent moins de variabilités avec 20% de prévalence en Espagne, 16% en Allemagne et en Italie, et 16.5% en France (Bunge et al., 1993 ; Ziviello et al., 2005 ; Audo et al., 2010). Deux régions se démarquent néanmoins, le Royaume-Uni et la Norvège qui présentent une prévalence de 25 à 50% (Grondahl et al., 2007). Plus de 120 mutations ponctuelles différentes ont été décrites, chacune conduisant à la dégénérescence rétinienne, majoritairement aux RP autosomiques dominantes, mais aussi parfois aux RP autosomiques récessives, ou encore à la cécité nocturne stationnaire congénitale (Mendes et al., 2005 ; Berger et al., 2010). La mutation P23H est la mutation la plus fréquente en Amérique du nord, elle représente environ 10 % des patients présentant une RP autosomique dominante. En Europe, ce sont les mutations P347L et R135W qui sont les plus fréquentes (Dryja et al., 1990 ; Audo et al., 2010).

L'existence d'un si large spectre de mutations a mené à l'établissement d'une classification de l'ensemble des mutations en fonction de leur effet direct sur la protéine Rhodopsine (Kaushal et Khorana, 1994). Cette classification a évolué au fur et à mesure de l'identification de nouvelles mutations, aboutissant à la création de 6 classes déterminées sur le critère du dysfonctionnement cellulaire causé par la mutation (Mendes et al. 2005) (**Figure 22**) :

- Classe I : regroupe l'ensemble des mutations qui n'interfèrent pas dans le repliement de la protéine, mais qui engendrent un défaut de son transport au segment externe (ex : mutation P347L/S).

- Classe II : correspond aux mutations empêchant le recyclage du 11-cis-rétinal, due à une séquestration de la protéine Rhodopsine au sein du reticulum endoplasmique (ex : mutation P23H).
- Classe III : désigne les mutations qui interfèrent dans le mécanisme d'endocytose.
- Classe IV : réunit les mutations qui impliquent une modification post-transcriptionnelle affectant la stabilité de la protéine.
- Classe V : représente l'ensemble des mutations qui entraînent une augmentation du taux d'activation de la transducine
- Classe VI : distingue les mutations qui provoquent une activation constitutive de la Rhodopsine en absence du chromophore. Ces mutations sont principalement responsables de cécités nocturnes stationnaires congénitales.

Cependant, cette classification ne permet malheureusement pas de classer l'intégralité des mutations identifiées actuellement, toute n'ayant pas fait l'objet d'études détaillées sur leurs conséquences biochimiques et cellulaires.

Le gène *RHO* présente une séquence hautement conservée entre les différentes espèces mammifères, avec environ 95% de similitude dans la séquence d'acides aminés entre l'homme, la souris, le lapin et le rat (NCBI). Ainsi, différents modèles animaux ont pu être établis afin de comprendre les mécanismes à l'origine de la dégénérescence des photorécepteurs consécutive à une mutation du gène *RHO*.

Une des mutations les plus étudiée est la mutation substitutive C>A en position 28, menant au remplacement d'une proline par une histidine dans le codon 23 (P23H), mutation la plus prévalente aux Etats-Unis mais quasi absente de la population européenne (Dryja et al. 1990 ; Farrar et al., 1990). Elle correspond aujourd'hui au modèle type des mutations de la classe II, avec un gain de fonction toxique, et un effet dominant négatif dû au mauvais repliement de la forme mutée de la protéine. Ce défaut de conformation empêche la protéine Rhodopsine de transiter normalement au niveau du reticulum endoplasmique, mais aussi de se lier au 11-cis-rétinal. Les protéines mal repliées se regroupent, formant des agglomérats qui s'accumulent au sein du cytosol, et entraînent l'agrégation des formes sauvages de la protéine Rhodopsine qui seront alors elles aussi ciblées par la voie de dégradation ubiquitine-dépendante médiée par le protéasome (Illing et al., 2002 ; Saliba et al., 2002). Plusieurs lignées de souris transgéniques ont été établies exprimant la forme mutée P23H de la Rhodopsine humaine ou murine, et développent une dégénérescence rétinienne progressive semblable à celle des patients atteints de RP (Naash et al., 1993 ; Olsson et al., 1992 ; Sakami et al., 2011). En raison de la plus grande

taille de l'œil du rat, plus propice aux pratiques chirurgicales, trois lignées de rats transgéniques ont également été développées portant de multiples copies du transgène murin de la protéine mutée. Ces lignées transgéniques diffèrent quant aux niveaux d'expression transgénique et au taux de dégénérescence des photorécepteurs. La lignée 1 ou P23H-, se caractérise par une dégénérescence rapide, c'est la plus utilisée pour les études thérapeutiques avec des agents neuroprotecteurs. La lignée 3 se définit par une dégénérescence moins rapide, et la lignée 2 par la dégénérescence la plus lente. Habituellement, les hémizygotés sont préférables aux animaux homozygotés, car ils présentent une dégénérescence plus lente et récapitulent mieux la condition génétique autosomique dominante humaine. Dans les trois lignées, le phénotype typique de la RP est récapitulé avec une dégénérescence des bâtonnets dans un premier temps, suivie par la perte des cônes, ainsi que l'amincissement graduel de l'épaisseur de la CNE et une détérioration progressive de la réponse à l'ERG (LaVail et al., 2018). Plus récemment, des modèles transgéniques P23H ont été établis à partir du porc et du porc nain afin d'étudier les changements et altérations rétiniennes s'opérant pendant la gestation, la naissance et les stades très précoces de l'enfance (Scott et al., 2014 et 2017).

La mutation P347L, substitution d'une proline en leucine dans le codon 347, est la mutation la plus commune des RP autosomiques dominantes en Europe (Audo et al., 2010). Elle illustre les mutations de la classe I liées à un défaut ou à l'absence du domaine QVAPA, situé sur la partie C-terminal de la protéine, qui est essentiel pour le transport de la protéine dans les segments externes des photorécepteurs (Li et al., 1996). Les rats transgéniques S334ter, dont la protéine Rhodospine est amputée des 15 derniers acides aminés C-terminaux, présentent une distribution anormale de la forme tronquée de la protéine, détectée dans la CNE. À l'échelle subcellulaire, les auteurs démontrent un enrichissement en Rhodopsine au niveau cytoplasmique et membranaire (Green et al. 2000). Cependant, il a été montré à partir de ce même modèle que les protéines mutées sont co-transportées avec la forme sauvage de la protéine au sein des vésicules du post-Golgi, mais que ce défaut de localisation ne serait pas à l'origine de la dégénérescence des photorécepteurs (Concepcion et al., 2002). Des modèles de lapins et de porcs transgéniques pour les mutations P347L et P347S ont également été générés, et développent une dégénérescence des photorécepteurs présentant de nombreuses similitudes avec celle observée chez des patients atteints de la même mutation. Parmi elles, une délocalisation de la protéine Rhodopsine mutée au niveau des segments internes des photorécepteurs et une réponse à la lumière sensiblement altérée. Une hypothèse envisagée serait que la substitution P347 interfère avec l'inactivation de la Rhodopsine (Kondo et al., 2009 ; Petters et al., 1997 ; Kraft et al., 2005). Cette hypothèse est en accord avec des études

antérieures montrant un haut niveau de phosphorylation des peptides présentant les substitutions P347S et P347L, qui pourrait être à l'origine d'une perturbation du processus d'inactivation de la Rhodopsine (Ohguro, 1997).

Ces différents modèles établis n'ont pas permis d'élucider clairement les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent la mort des photorécepteurs suite aux mutations de type P347 du gène *RHO* chez l'homme. Les questions laissées en suspens sont encore plus nombreuses dans le cadre du gène *PRPF31*. L'évaluation et la compréhension de ces mécanismes sont essentielles pour le développement de futures thérapies, mais la quantité et l'hétérogénéité des mutations causales de RP, de leur localisation génique à leur mécanisme d'action potentiel, mettent en lumière la difficulté évidente pour trouver un traitement global et efficace.

#### ***II. 4. Approches thérapeutiques actuelles***

L'œil représente une cible idéale pour le développement de traitements de pointe : il est facilement accessible, petit et surtout hautement compartimenté, permettant de cibler différents tissus oculaires à la fois. De plus son isolement du reste du corps, assuré par la barrière hémato-rétinienne, lui offre un privilège immun avec une réponse inflammatoire limitée, et permet une diffusion systémique minimale. En outre, le développement d'approches d'imagerie non invasives, tel que l'OCT, est d'une grande utilité à la fois pour le diagnostic mais aussi pour le suivi après traitement. Enfin, la possibilité de ne traiter qu'un seul œil individuellement, et ainsi utiliser l'œil controlatéral comme contrôle, permet de détecter facilement les effets indésirables potentiellement causés par le traitement, les traiter localement, et l'essai peut être immédiatement arrêté afin de limiter et empêcher d'autres dommages. Pour toutes ces raisons, l'œil a été à l'avant-garde du développement de nombreuses nouvelles approches thérapeutiques.

Malgré la grande diversité de causes initiatrices possibles, les RP mènent toujours à une perte irréversible de la population cellulaire rétinienne photosensible, aboutissant à une déficience visuelle permanente. Néanmoins, les neurones internes de la rétine ne sont pas gravement affectés même après une perte importante de cellules photoréceptrices et une altération conséquente de l'EPR. À ce stade, un remodelage progressif de la rétine, consistant en une reprogrammation morphologique, fonctionnelle et moléculaire graduelle, se produit

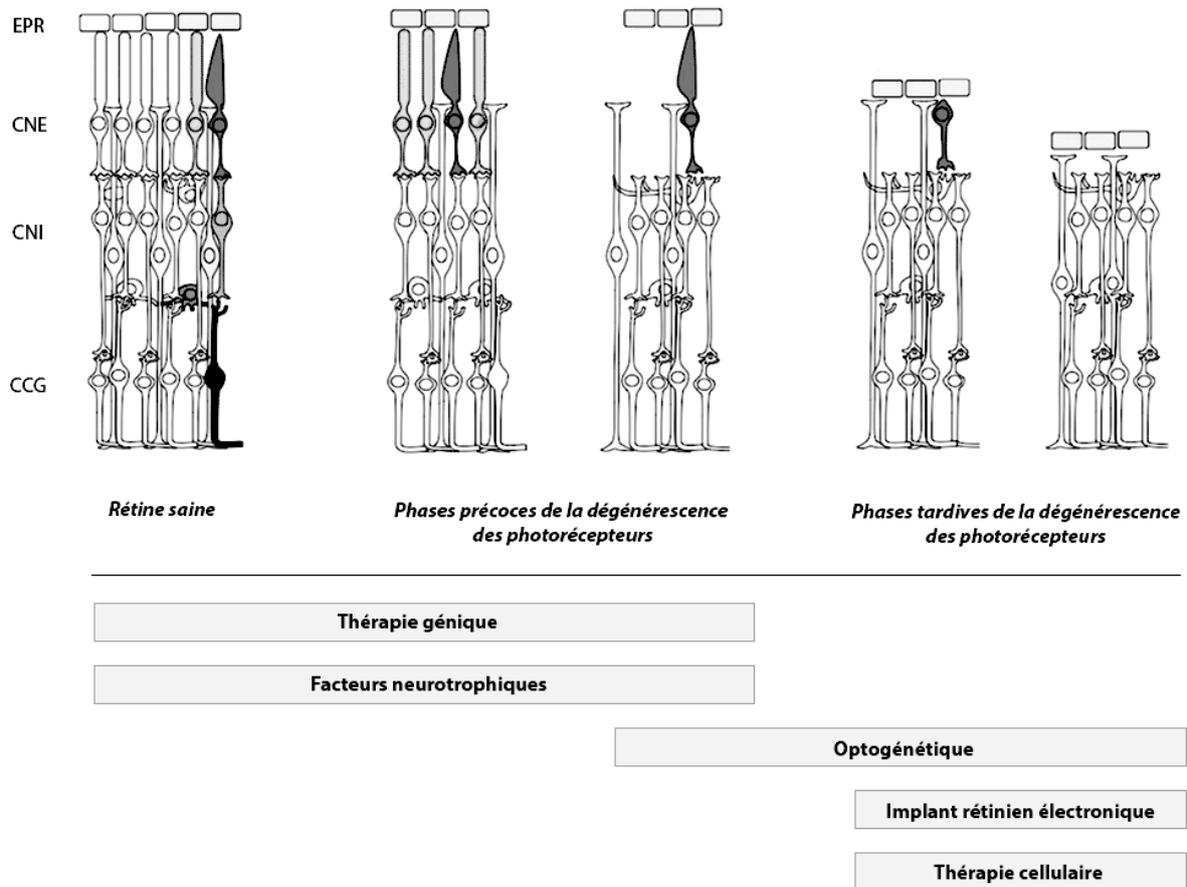
dans toutes les composantes rétiniennes, comprenant les neurones, les cellules gliales et les vaisseaux sanguins (Jones et Marc, 2005). Différentes approches thérapeutiques ont été envisagées pour tenter d'enrayer la dégénérescence des photorécepteurs et/ou de l'EPR, ou de remplacer les cellules perdues. Ainsi, toutes les approches actuellement développées pour éviter la progression de la RP peuvent être classées en trois groupes déterminés par le stade d'évolution de la maladie (**Figure 23**) :

- Avant la dégénérescence des photorécepteurs : lorsque l'altération génétique en cause est identifiée, des stratégies de correction ou d'augmentation génique sont envisageables afin de prévenir l'établissement de la maladie. Elles sont aussi réalisables lors des stades précoces de la maladie, lorsque seul un petit nombre de cellules a dégénéré. *In vivo*, elle repose sur l'utilisation de vecteurs viraux, souvent les virus adéno-associés (AAV), pour permettre l'administration d'une copie fonctionnelle du gène muté chez le patient. Le plus souvent, elle est appliquée par injection sous-rétinienne permettant d'atteindre les couches externes de la rétine ciblées par les RP. Les cellules doivent donc être vivantes pour cette approche et un diagnostic précoce est ainsi nécessaire (Jayakody et al., 2015 ; Dalkara et al., 2016). L'exemple de thérapie génique le plus abouti à ce jour, concernant les rétinopathies, cible les cellules de l'EPR portant une mutation dans le gène *RPE65* dans le contexte d'une amaurose congénitale de Leber, une forme très sévère de RP touchant les enfants. Les différents essais cliniques réalisés à partir de 2007 ont rencontré un grand succès, et ont mené en 2017 à l'approbation, par la Food and Drug Administration des Etats-Unis, du traitement de thérapie génique ciblant le gène *RPE65*, commercialisé sous le nom de Luxturna<sup>TM</sup>. Ce traitement est réservé uniquement aux patients présentant une mutation bi-allélique confirmée du gène *RPE65* et possédant suffisamment de cellules rétiniennes viables (Jacobson et al., 2015 ; Maguire et al., 2008 ; Amado et al., 2010 ; Le Meur et al., 2018).
- Lorsque seulement quelques bâtonnets ont dégénéré : des traitements neuroprotecteurs, basés sur l'administration de facteurs neurotrophiques, sont envisagés afin de préserver les cellules restantes. De nombreuses preuves de leur efficacité thérapeutique ont été démontrées dans des modèles *in vivo* de RP, davantage pour stabiliser et retarder la dégénérescence que pour la prévenir. Ces stratégies visent à administrer des facteurs « pro-survie », anti-apoptotiques et anti-inflammatoires pour arrêter ou retarder la mort des cellules photoréceptrices. Elles peuvent également servir à stimuler les voies « pro-survie » déjà uprégulées au sein de la rétine dégénérative, mais dont le potentiel endogène n'est pas suffisant pour préserver les photorécepteurs.

Différents facteurs neurotrophiques tels que le facteur neurotrophique ciliaire (CNTF), le facteur dérivé de l'épithélium pigmentaire (PEDF) et le facteur neurotrophique dérivé de la lignée cellulaire gliale (GDNF), ont permis de sauvegarder la structure et la fonction des cellules rétinienne menacées. Contrairement à la thérapie génique, les approches neuroprotectrices sont indépendantes de la mutation et peuvent ainsi être appliquées pour traiter un large éventail de maladies dégénératives rétiniennes. Leur principal inconvénient est que, pour être efficaces, elles nécessitent une sécrétion soutenue et continue des facteurs neurotrophiques, inenvisageable dans le cadre d'injections intra-oculaires à répéter fréquemment. Leur administration a ainsi été repensée pour être médiée soit par des dispositifs implantés, soit par des vecteurs viraux assurant une production permanente des protéines neuroprotectrices. Des essais cliniques novateurs visant à administrer le CNTF au moyen d'implants cellulaires encapsulés ont vu le jour, mais se sont conclus sans véritable résultat thérapeutique probant (Tao et al., 2002 ; Sieving et al., 2006 ; Birch et al., 2013). Les approches de thérapie génique visant à fournir des facteurs neurotrophiques à l'aide de vecteurs viraux présentent des avantages semblables. Un candidat de premier plan est le facteur RdCVF, sécrété par les bâtonnets et connu pour son rôle protecteur sur les cônes. Il a permis, chez des souris atteintes de RP, de prolonger la survie et la fonction des cônes après avoir été administré par le biais d'AAV (Byrne et al., 2015 ; Dalkara et al., 2016).

- Lorsque la plupart des photorécepteurs ont été perdus, et qu'il ne reste que quelques cônes dits dormants : différentes stratégies alternatives ont été développées, l'optogénétique, les implants rétiniens électroniques et la transplantation cellulaire. L'optogénétique et les prothèses rétiniennes tentent toutes deux de se substituer à l'activité endogène des photorécepteurs, en insérant des photocapteurs artificiels et en les couplant aux neurones restants de la rétine. Les approches optogénétiques consistent à introduire dans des cellules rétiniennes initialement insensibles à la lumière, des gènes codant pour une protéine photosensible de type opsine microbienne, afin qu'elles puissent induire une réponse à une stimulation lumineuse. Cette stratégie a déjà fait ses preuves dans différentes études précliniques, et son évolution vers la clinique est actuellement entreprise par différentes compagnies (Dalkara et al., 2016 ; Sahel et al., 2021). Les prothèses rétiniennes électroniques comprennent différents types de dispositifs de détection de la lumière, conçus pour générer et transmettre des réponses électriques aux neurones rétiniens internes survivants. Les prothèses rétiniennes sont déjà entrées en clinique avec des résultats prometteurs, les patients parviennent à

percevoir des signaux lumineux, mais aussi à se repérer dans une pièce pour certains d'entre eux, se déplacer seul, ou encore lire sur un écran d'ordinateur des mots à gros caractères blancs sur fond noir. Ces résultats très encourageants ne permettent cependant pas aux patients de retrouver leur autonomie, et le réel bénéfice de ces prothèses est encore très limité (Ayton et al., 2020). La thérapie cellulaire consiste à remplacer les cellules dégénérées par de nouvelles cellules saines, dans l'espoir de recréer le système rétinien fonctionnel préexistant. Dans le cas des photorécepteurs, le succès de cette stratégie repose sur plusieurs critères cruciaux 1) remplacer les photorécepteurs perdus par de nouvelles cellules morphologiquement différenciées et fonctionnelles, 2) les cellules greffées doivent parvenir à établir des connexions synaptiques appropriées avec la rétine hôte, et 3) restaurer la fonction visuelle à un degré satisfaisant et mesurable par différents tests fonctionnels notamment électrophysiologiques et comportementaux. Enfin, et ce quel que soit le type cellulaire, les greffes ne doivent pas former de tumeurs ou être nocives pour le patient receveur (Seiler et Aramant, 2012). L'un des principaux avantages de cette stratégie est d'être indépendante de la mutation causale, elle peut ainsi être utilisée dans un large éventail de conditions dégénératives rétiniennes. En raison de la faible capacité de réparation et de régénération endogène dans la rétine des mammifères, la thérapie cellulaire nécessite la transplantation de cellules issues de donneurs dont la disponibilité et la quantité peuvent représenter des facteurs très limitants. Ainsi les photorécepteurs et cellules de l'EPR dérivés de cellules souches, qui représentent une source de production potentiellement illimitée, sont une alternative très intéressante et déjà exploitée (Chen et al., 2014 ; Li et al., 2016). Des résultats encourageants ont été obtenus en transplantant de l'EPR dérivé de cellules souches embryonnaires humaines (hESC), et de l'EPR différencié à partir de cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC). Selon la stratégie choisie les cellules sont transplantées sous forme de suspension cellulaire, ou d'un feuillet de cellules polarisées. L'injection de cellules dissociées s'est avérée moins efficace, ces cellules n'étant pas parvenues à se polariser correctement ou à survivre à long terme. La majorité des tentatives ultérieures ont ainsi porté sur l'implantation d'une monocouche polarisée d'EPR réalisée ou non sur différents types d'échafaudages comme le polyester, le parylène, l'acide poly-lactique-co-glycolique (PLGA) et la membrane amniotique humaine (Kamao et al., 2014 ; Liu et al., 2014 ; Ben M'Barek et al., 2017).



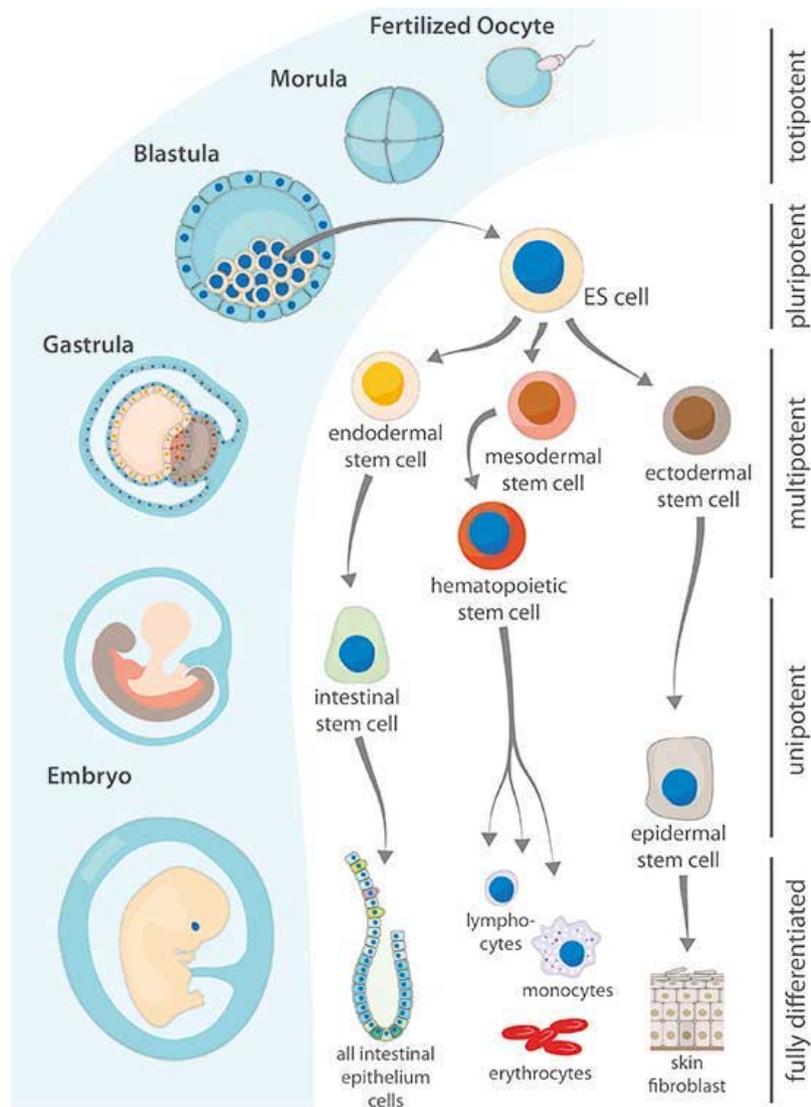
**Figure 23. Les principales stratégies thérapeutiques envisagées pour traiter les dystrophies rétiniennes, en fonction du stade de dégénérescence des photorécepteurs.**

La thérapie génique et les stratégies neuroprotectrices conviennent lorsque les photorécepteurs sont encore au moins partiellement présents, et peuvent également être utilisées comme approches préventives avant le début de la dégénérescence. Pour les dégénérescences très avancées, avec peu ou pas de photorécepteurs restants, l'optogénétique, les prothèses rétiniennes électroniques et la thérapie cellulaire sont plus adaptées. Adapté de Dalkara et al., 2016.

### **III. La technologie des cellules iPS**

#### ***III.1. Cellules souches, propriétés et classification***

Les cellules souches sont définies par deux propriétés fondamentales : la capacité d'autorenouveaulement, et l'habilité de se différencier en un ou plusieurs type(s) cellulaire(s). L'autorenouveaulement est le processus par lequel une cellule souche est capable de se renouveler à l'identique. Il peut être assuré par un processus de division symétrique donnant lieu à deux cellules filles indifférenciées, ou asymétrique aboutissant à une cellule fille indifférenciée et une cellule fille différenciée. Les cellules souches peuvent être classées en fonction de leur origine : embryonnaire, fœtale ou adulte; mais aussi de leur potentiel de différenciation : cellules souches totipotentes, pluripotentes, multipotentes et unipotentes (**Figure 24**).



**Figure 24. Restriction du potentiel de différenciation des cellules souches au cours du développement.**

Le zygote et les blastomères de l'embryon précoce (jusqu'à 4 cellules) sont totipotents, avec le potentiel de différenciation de créer un tout nouvel organisme. Ce potentiel de différenciation diminue progressivement au cours du développement à une capacité de pluripotence, multipotence, unipotence, jusqu'aux cellules terminales différenciées ou cellules somatiques. Le potentiel des cellules somatiques peut être rétabli au stade pluripotent par reprogrammation, expression forcée de facteurs de transcription spécifiques, c'est la technologie iPS. Adapté de Pohl, 2019.

Les cellules souches totipotentes présentent le plus haut potentiel de différenciation. Elles sont capables de se différencier en n'importe quel type cellulaire embryonnaire dérivé d'un des trois feuillet (endoderme, mésoderme ou ectoderme), ou extra-embryonnaire dérivé du trophoblaste et constitutif des annexes embryonnaires placentaires. Ces cellules sont retrouvées exclusivement durant les stades très précoces du développement, du zygote au stade blastomère 4-8 cellules, avant le stade blastocyste.

Au stade blastocyste, la capacité de différenciation des cellules souches se restreint aux cellules des tissus embryonnaires. Ces cellules situées dans la masse interne du blastocyste, connues sous le nom de cellules souches embryonnaires (ES), sont dites pluripotentes.

Les cellules souches multipotentes sont capables de donner plusieurs types cellulaires issus du même lignage, comme les cellules progénitrices rétiniennes qui peuvent s'engager vers tous les lignages cellulaires rétiniens matures (Cepko, 2014). Elles se caractérisent par un état indifférencié quiescent, et une certaine plasticité pour induire la différenciation plus ou moins restreinte vers un ou plusieurs lignages cellulaires (Clevers and Watt, 2018). Ces cellules sont présentes au cours du développement, mais aussi au stade adulte, où elles sont généralement regroupées au sein de niches spécialisées, microenvironnements adaptés à la régulation de la population de cellules souches. Elles assurent l'homéostasie et la réparation des tissus, c'est le cas par exemple de la zone marginale ciliaire (ZMC) de l'œil contenant les cellules souches rétiniennes adultes, dont l'existence permet chez certaines espèces de générer de nouveaux neurones rétiniens (Perron et Harris, 2000).

Enfin les cellules souches dites unipotentes sont des cellules capables de ne donner qu'un seul type cellulaire spécialisé.

Compte tenu du succès clinique de greffes impliquant des cellules souches multipotentes adultes, notamment les cellules souches hématopoïétiques, beaucoup d'efforts ont été consacrés à l'isolement et à l'expansion de ces cellules pour des applications thérapeutiques. Cependant, les cellules souches adultes présentent de nombreuses limites, généralement incluses dans des niches elles sont peu accessibles et difficile à isoler, mais aussi à manipuler car elles sont rares et se divisent naturellement à un taux très faible.

À l'inverse, la capacité des cellules souches pluripotentes à proliférer et à générer tous les types cellulaires de l'organisme offre un grand potentiel en médecine régénérative et plus largement pour l'ensemble du domaine biomédical. C'est dans ce contexte que les premières cellules ES ont été isolées et mises en culture à partir de blastocystes de souris (Evans and Kaufman, 1981). La première lignée de cellules ES humaines ne fut dérivée que 16 ans plus tard, en 1998, par l'équipe du Dr. Thomson (Thomson et al., 1998). Les méthodes de culture de ces cellules ont été optimisées par la suite afin de garantir à long terme un maintien de leurs propriétés d'autorenouvellement et de pluripotence, et une stabilité de leur caryotype (Amit et al., 2000). Les propriétés uniques des cellules ES donnent l'opportunité de mieux comprendre le développement embryonnaire humain. De plus, elles peuvent actuellement être la source d'une

grande quantité de cellules différenciées, répondant au besoin des études portant sur la thérapie cellulaire et le criblage pharmacologique (Sugarawa et al., 2012).

Cependant, l'obtention de cellules ES humaines, en dehors de l'utilisation de lignées déjà dérivées, implique l'utilisation d'un embryon de pré-implantation, ce qui pose des questions éthiques alimentant aujourd'hui un débat sur les considérations morales, religieuses et politiques associées à cette recherche, mais aussi une véritable difficulté d'accès. Ainsi, bien que l'utilisation des cellules ES humaines révèle un potentiel immense pour la recherche médicale, la génération de cellules souches pluripotentes possédant les mêmes propriétés mais n'impliquant pas l'utilisation de matériel embryonnaire représentait un intérêt majeur.

### ***III.2. Reprogrammation cellulaire***

*“Prélever n'importe quelle cellule chez un adulte et la reprogrammer pour la rendre pluripotente, comme une cellule souche embryonnaire.”*

C'est le défi brillamment relevé par le Pr. Yamanaka et son groupe.

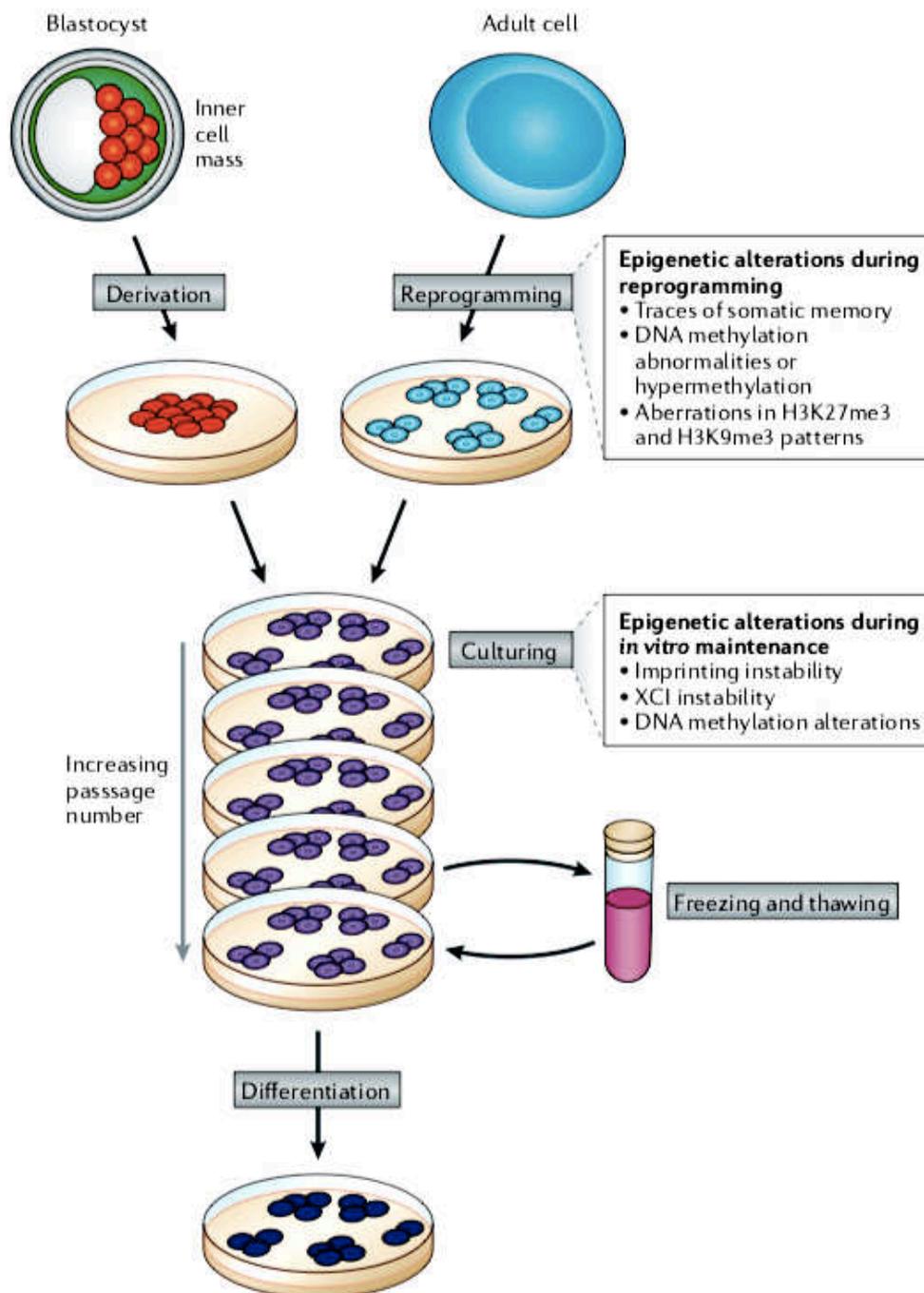
En 2006, ils démontrent qu'en forçant des fibroblastes murins à exprimer certains facteurs de transcription connus dans la littérature comme étant associés à l'état de pluripotence des cellules ES, les cellules adoptent une morphologie semblable à ces dernières. La surexpression à l'aide de rétrovirus des quatre gènes *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, et *c-Myc*, a été identifiée comme suffisante pour induire la pluripotence dans ces fibroblastes de souris. Les cellules résultantes, appelées cellules souches induites à la pluripotence (iPS) ont été reconnues comme similaires aux cellules ES d'un point de vue moléculaire et fonctionnel (Takahashi et Yamanaka, 2006). Ces facteurs ont été sélectionnés parmi une liste de 24 gènes candidats connus pour leur rôle dans l'état de pluripotence, et testés sur leur capacité à activer le locus *Fbx15* spécifiquement exprimé dans les cellules ES murines et les embryons précoces. Ce système test, de réduction successive du nombre de transgènes nécessaires, a permis de déterminer une combinaison restreinte à 4 facteurs nécessaires et suffisants pour la reprogrammation en cellules iPS. La combinaison la plus couramment utilisée est l'association des quatre facteurs *Oct4*, *Klf4*, *Sox2* et *C-myc*, appelée cocktail « OKSM ». La combinaison *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, et *Lin28*, dite « OSNL », est moins utilisée mais possède l'avantage d'exclure le proto-oncogène *C-myc* (Yu et al., 2007). Dans le même objectif, différentes approches de reprogrammation ont été

entreprises en utilisant une combinaison de seulement trois (OKS) ou deux facteurs (OK) montrant que C-myc, n'est pas indispensable à la reprogrammation mais améliore considérablement son efficacité. Il agit principalement dans les stades précoces en rendant l'environnement de la chromatine actif (Rahl et al., 2010).

Tout comme les cellules ES, les cellules iPS obtenues sont capables de se renouveler et de se différencier dans les trois feuilletts embryonnaires, y compris la lignée germinale (Okita et al., 2007). Lors de l'injection dans un blastocyste hôte, les cellules iPS murines contribuent au développement du fœtus. Elles sont aussi capables de former à elles seules par complémentation tétraploïde des embryons viables, ce test de pluripotence étant considéré comme le plus rigoureux (Boland et al., 2009 ; Zhao et al., 2009).

L'exploit est renouvelé en 2007, par les équipes du Pr Yamanaka au Japon et du Dr Thomson aux Etats-Unis, qui parviennent à transposer cette technologie à des cellules humaines en produisant des cellules iPS à partir de fibroblastes humains (Takahashi et al., 2007 ; Yu et al., 2007). En utilisant la même approche, via respectivement les cocktail OKSM et OSNL, ils rendent possible la dédifférenciation des cellules somatiques adultes en cellules souches pluripotentes.

Les cellules iPS humaines peuvent être maintenues en culture dans les mêmes conditions que les cellules ES humaines, étroitement similaires en termes de morphologie cellulaire, d'expression spécifique d'antigènes de surface et de marqueurs de la pluripotence, et de capacité de différenciation dans l'ensemble des types cellulaires. Tout comme les cellules ES, différentes aberrations génomiques et épigénétiques peuvent survenir lors de la génération des cellules iPS, aussi bien durant la reprogrammation, que lors des différentes étapes de la culture : entretien, passage, congélation/décongélation (Lund et al., 2012) (**Figure 25**). Bien que la majorité des lignées de cellules iPS maintiennent un caryotype normal, un certain nombre d'aberrations chromosomiques récurrentes peuvent être retrouvées telle que l'amplification des chromosomes 8, 12, 17, 20 et X. L'inactivation du chromosome X, l'empreinte génomique et la méthylation de l'ADN font partie des altérations épigénétiques qui peuvent être observées lors de la culture. Les altérations épigénétiques rapportées en lien avec la reprogrammation concernent des anomalies de méthylation de l'ADN d'un sous-ensemble de gènes sur des motifs H3K27me3 et H3K9me3 (Guenther et al., 2010). Ainsi chaque lignée cellulaire, ES ou iPS, doit être soigneusement caractérisée post-reprogrammation et régulièrement surveillée au cours de la culture, afin d'exclure les cellules présentant des anomalies qui pourraient être problématiques ou biaiser les études et applications souhaitées.



**Figure 25. Altérations génomiques et épigénétiques potentielles liées à la reprogrammation et la culture des cellules souches pluripotentes.**

Extrait de Lund et al, 2012.

Parallèlement aux similitudes des cellules ES et iPS, de nombreuses études comparatives ont débattu de leurs différences transcriptionnelles et épigénétiques. La mémoire épigénétique, résultant de l'élimination incomplète de la méthylation de l'ADN spécifique des cellules somatiques au cours de la reprogrammation, semble conservée dans les lignées iPS, leur conférant potentiellement une facilité accrue à se différencier dans leur type cellulaire originel (Kim et al., 2010 ; Polo et al., 2010). Dans ce contexte, des cellules iPS reprogrammées à partir de cellules rétinienne telles que les cellules de l'EPR et les photorécepteurs, auraient éprouvé une facilité à se redifférencier dans ces types cellulaires (Liao et al., 2010 ; Hiler et al., 2015). Mais si cette mémoire épigénétique est avérée dans les cellules iPS à bas passages, elle semble perdue après seulement quelques passages. Ainsi d'autres études ont montré que la capacité des cellules iPS à se différencier préférentiellement dans un type cellulaire est d'avantage liée aux variabilité entre donneurs qu'au type cellulaire originel (Kim et al, 2011 ; Kajiwara et al., 2012 ; Kytala et al., 2016). Quelle que soit leur origine somatique, certains types cellulaires étant favorisés car plus accessible tels que les fibroblastes et les cellules sanguines, les cellules iPS ont donné lieu à l'établissement de nombreux protocoles de différenciation rétinienne démontrant leur capacité et leur reproductibilité indépendamment du type cellulaire d'origine (Capowki et al., 2019).

### ***III.3. Protocoles de différenciation des cellules iPS humaines en cellules rétiniennes***

L'étude pointue et la connaissance préalable des différentes étapes du développement embryonnaire de l'œil représentent des pré-requis indispensables à l'établissement de protocoles permettant de guider la différenciation des cellules iPS humaines en cellules rétiniennes. Chez l'homme et l'ensemble des vertébrés, le développement de l'œil implique l'assemblage de structures d'origine embryologique distincte : la rétine neurale et l'EPR dérivent du neurectoderme, la cornée et le cristallin de l'ectoderme de surface, et la sclère du mésoderme.

La formation de l'œil s'amorce lors de la gastrulation par une série d'événements structuraux régis par des signaux moléculaires spécifiques, qui confèrent à un groupe de cellules du neuroépithélium médian et antérieur une identité oculaire. Par la suite, l'établissement d'une ligne médiane permet la séparation du domaine oculaire présomptif unique, en deux territoires oculaires latéraux (Grow et al., 2010). L'établissement de ce territoire est médié par l'activation ou l'inhibition chronologique de différentes voies de signalisation (**Figure 26**) :

1. Activation des voies de signalisation du FGF (Fibroblast Growth Factor) et de l'IGF-1 (Insuline-like Growth Factor 1), qui induisent l'induction neurale.
2. Inhibition de la voie commune au TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) et aux protéines BMP (Bone Morphogenetic Protein), permettant de guider la régionalisation ventrale du neuroépithélium optique selon l'axe dorso-ventral. Les protéines Noggin, Chordin et Follistatin, connues pour être des inhibiteurs de la voie BMP, induisent donc la spécification neuroectodermique.
3. Inhibition de la voie canonique WNT (Wingless integration site), à l'origine de la spécification du territoire antérieur du neuroectoderme

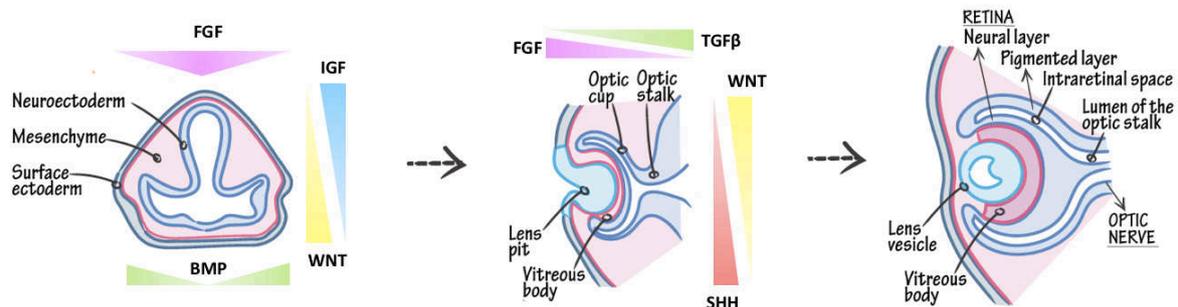
Ces facteurs extracellulaires orchestrent la régulation spatiale et temporelle de l'expression de gènes codant des facteurs de transcription spécifiques connus sous le nom de « Eye Field Transcription Factors (EFTF) » (Zuber et al., 2010). Les EFTF permettent de définir le territoire oculaire et comprennent : six protéines homeobox différentes LHX2, OTX2, PAX6, RAX, SIX3 et SIX6 ; un récepteur nucléaire NR2E1 (Nuclear Receptor Subfamily 2 Group E Member 1) aussi appelé TLX ; et une protéine T-box TBX3 (T-box transcription factor 3) (Zuber et al., 2010 ; Bailey et al., 2004). La délimitation du territoire oculaire présomptif fait ainsi intervenir plusieurs facteurs extrinsèques qui coordonnent à leur tour l'expression de facteurs intrinsèques, les EFTF.

Le remodelage permettant à ce territoire de se scinder en deux, se traduit par une évagination du neuroépithélium conduisant à la formation des vésicules optiques qui formeront, par la suite, la rétine et le nerf optique. Une étape d'invagination de ce neuroépithélium donne naissance à la cupule optique, constituée désormais de deux couches (**Figure 26**). Ces couches externe et interne formeront respectivement l'EPR et la rétine neurale, sous l'influence de signaux endogènes ou exogènes provenant de tissus adjacents, tels que (**Figure 27**) :

- Pour l'EPR : l'activine, membre de la famille des TGF, qui active l'expression du gène MITF (*Microphthalmia-Associated Transcription Factor*), lui-même responsable en concordance avec OTX2 (Orthodenticle Homeobox 2) de l'activation des gènes impliqués dans la différenciation des cellules de l'EPR. Mais aussi de nombreux autres signaux qui assurent le maintien du phénotype de l'EPR, telles que les voies SHH, BMP, ainsi que la voie WNT (par l'intermédiaire de la  $\beta$ -caténine, et de l'acide rétinoïque). Un défaut ou une inactivation d'une de ces voies de signalisation peut induire la transdifférenciation de l'EPR en rétine neurale (Fuhrmann, 2010 ; Martinez-Morales et al., 2004).

- Pour la rétine neurale : le FGF, sécrété par des tissus adjacents, favorise l'expression du facteur de transcription VSX2 (Visual System Homeobox 2), qui spécifie le caractère neurorétinien en inhibant l'expression de MITF, facteur pro-EPR. VSX2 joue également un rôle crucial dans le maintien du phénotype neurorétinien (Adler and Canto-Soler, 2007 ; Fuhrmann et al., 2014).

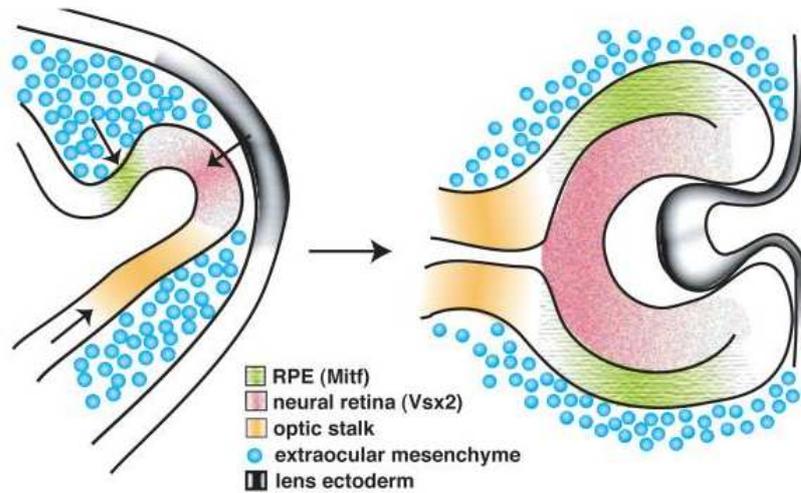
À ce stade, la future rétine neurale est constituée de progéniteurs rétiniens multipotents, capables de donner naissance à tous les types cellulaires rétiniens selon une séquence temporelle ordonnée remarquablement conservée et similaire chez tous les vertébrés (Cepko et al., 2014). Deux vagues principales de différenciation neurorétinienne se distinguent, qualifiées respectivement de précoce et de tardive. Lors de la phase précoce, les cellules ganglionnaires sont le premier type cellulaire à apparaître, suivi rapidement des cellules amacrines, des cellules horizontales et des photorécepteurs à cône. Au cours de la phase tardive, apparaissent les photorécepteurs à bâtonnet, les cellules bipolaires et enfin les cellules gliales de Müller (Turner and Cepko, 1987 ; Young, 1985) (**Figure 28**).



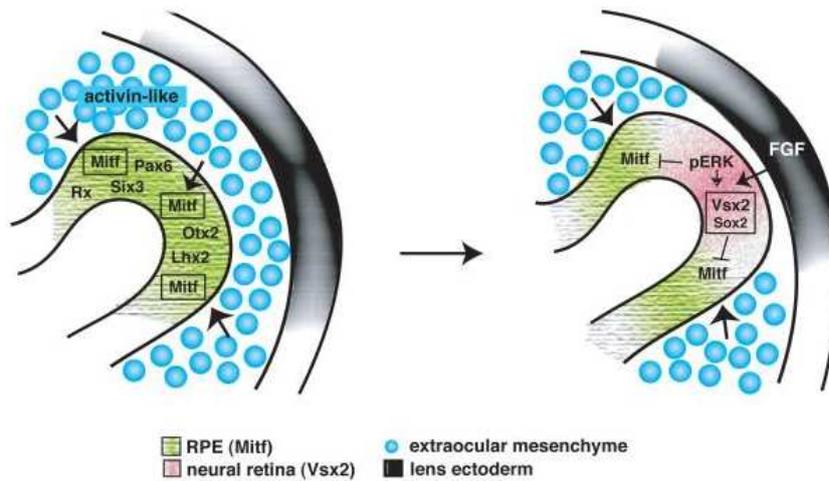
**Figure 26. Développement embryonnaire de l'œil.**

Représentation schématique des étapes majeures du développement de l'œil : délimitation de la vésicule optique, invagination de la cupule optique, et spécification de la rétine neurale et de l'EPR. Pour chaque phase, les gradients des molécules de signalisations impliquées sont indiqués. **IGF** Insulin Growth Factor ; **FGF** Fibroblast Growth Factor ; **BMP** Bone Morphogenetic Protein ; **TGFβ** Transforming Growth Factor β ; **SHH** Sonic Hedgehog. Adapté à partir de drawittoknowit.com.

### Facteurs extrinsèques

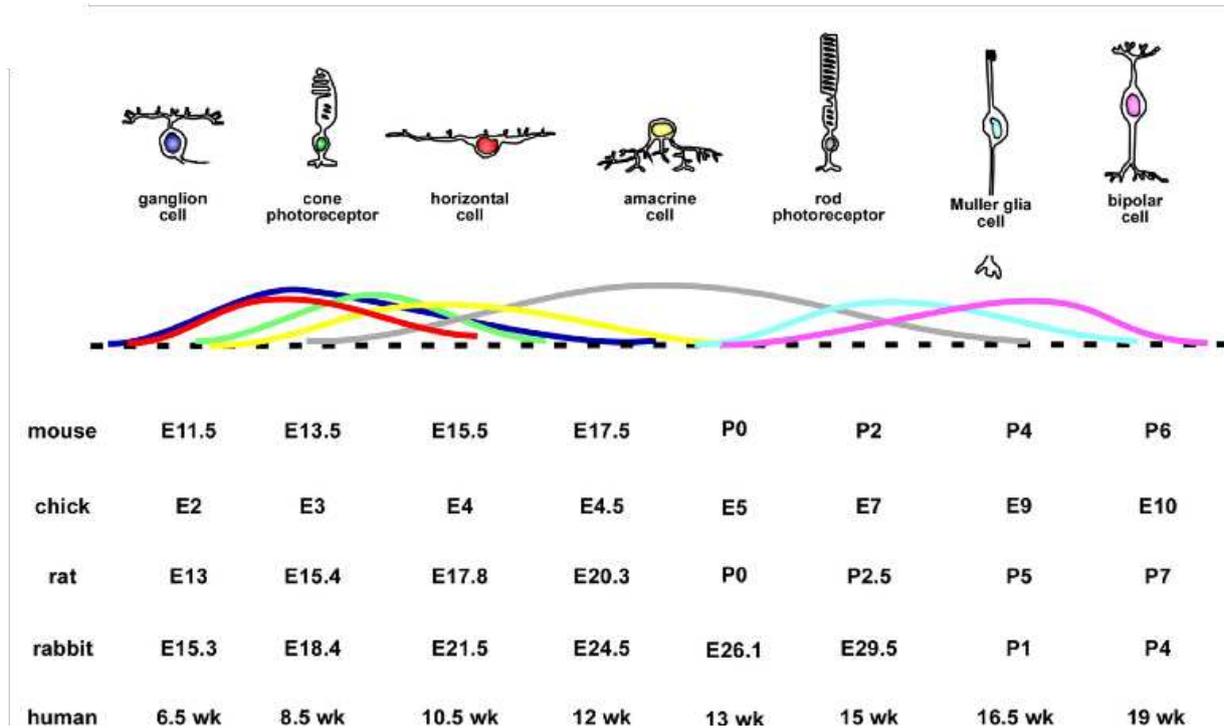


### Facteurs intrinsèques



**Figure 27. Spécification de la rétine neurale et de l'épithélium pigmentaire rétinien.**

Cette régionalisation se fait sous l'influence de signaux exogènes provenant des tissus adjacents, et de facteurs endogènes en particulier l'opposition de VSX2 pro-neural et MITF pro-EPR. **MITF** Melanocyte Inducing Transcription Factor ; **VSX2** Visual System Homeobox 2 ; **FGF** Fibroblast Growth Factor. Extrait de Fuhrmann, 2010.



**Figure 28. Cinétique d'apparition des différents types cellulaires au cours de la rétino-génèse.**

La séquence temporelle du développement rétinien est un processus bien conservé au sein des différentes espèces, avec une phase précoce regroupant les cellules ganglionnaires, les cellules amacrines, les cellules horizontales et les photorécepteurs à cônes, puis une phase plus tardive produisant les photorécepteurs à bâtonnets, les cellules bipolaires et les cellules gliales de Müller. Extrait de Martins et Pearson, 2008.

En utilisant le potentiel de différenciation des cellules ES et iPS, il est possible de reproduire, de manière simplifiée *in vitro*, les mécanismes impliqués dans le développement de l'œil et de la rétine, et de conduire les cellules pluripotentes à adopter une identité neuro-ectodermique, puis celle du territoire oculaire, et finalement d'orienter leur différenciation vers un lignage rétinien. Cela a été rendu possible par l'utilisation séquentielle de composés chimiques ou de facteurs protéiques permettant l'activation successive des voies de signalisation du FGF et de l'IGF-1 ainsi que l'inhibition des deux voies de signalisation TGF- $\beta$  /BMP et Wnt (Thompson et al., 1998 ; Takahashi et al., 2007).

## Différenciation en photorécepteurs

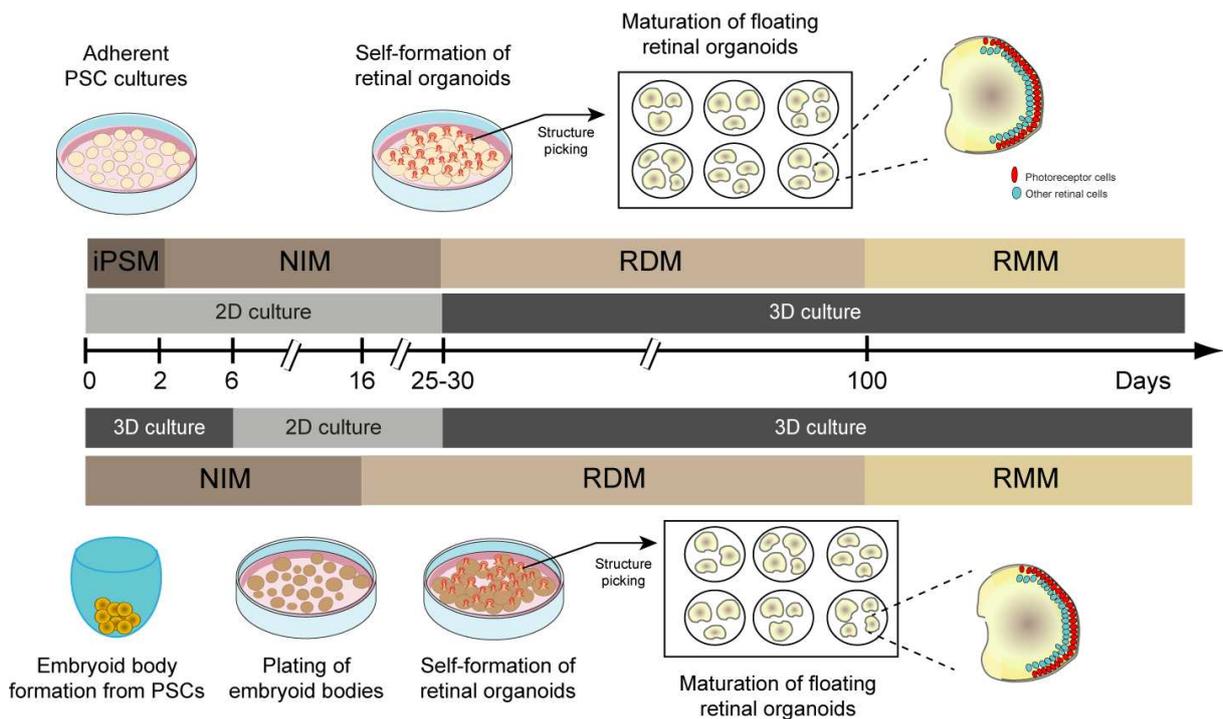
En 2006, le groupe du Dr. Reh est le premier à établir les conditions permettant de générer efficacement des cellules rétiniennes à partir de cellules ES humaines (Lamba et al., 2006). Ce protocole est basé sur l'utilisation d'une combinaison d'inhibiteurs de la voie BMP et de la voie WNT, NOGGIN et DKK1 respectivement, et de l'addition du facteur de croissance IGF-1. Différentes combinaisons alternatives ont été mises en évidence par la suite, notamment l'utilisation de LEFTY, un antagoniste de la voie BMP/Nodal (Osakada et al., 2008 et 2009 ; Hirami et al., 2009 ; Lamba et al., 2010). D'autres méthodes permettent elles d'éviter l'utilisation de protéines recombinantes en tirant parti de la sécrétion endogène de NOGGIN et DKK-1, grâce à des milieux supplémentés de N2, B27 ou petites molécules favorisant la différenciation neurale comme SU5402 (Meyer et al., 2009). Ces différents protocoles utilisant à la fois des systèmes de culture en deux et trois dimensions, associés à des milieux de culture pro-neuraux, ont permis de générer des progéniteurs rétiniens capables de se différencier dans l'ensemble des types cellulaires de la rétine neurale, dont les photorécepteurs. Cependant, une étape de formation de corps embryonnaires (EB) reste très majoritairement nécessaire.

Ces différentes stratégies ont ouvert la voie à un protocole innovant permettant, à partir de cellules ES de souris, la génération de structures rétiniennes en trois dimensions, avec un déroulement qui récapitule *in vitro* plus ou moins fidèlement le développement de la rétine *in vivo* (Eiraku et al., 2011). L'un des éléments clés permettant d'obtenir non plus de « simples » cellules rétiniennes, mais des structures tridimensionnelles auto-organisées, est la culture en suspension d'agrégats de cellules ES dans des matrices extracellulaires artificielles. Dans ce protocole, les cellules sont cultivées sous forme d'agrégats en suspension en présence de Matrigel et de sérum, dans un milieu pro-neural supplémenté, dans des fenêtres de temps bien déterminées, avec un antagoniste de la voie Wnt puis un agoniste de la voie Shh. Une fois le processus de différenciation entamé, ces amas de cellules ES forment des EB qui au cours de la culture présentent à leur périphérie une émergence de structures de type vésicule optique, contenant des progéniteurs rétiniens multipotents. Après avoir été isolées, ces vésicules poursuivent leur développement laissant apparaître l'ensemble des types cellulaires rétiniens avec une organisation et une orientation semblables à celles observées *in vivo*. Un an plus tard, des résultats similaires sont obtenus à partir de cellules ES humaines (Nakano et al., 2012). Les optimisations ultérieures ont eu pour principal but de réduire le coût élevé et l'hétérogénéité cellulaire inhérents à ce protocole. Ainsi, des structures de type vésicule optique ont été générées à partir de cellules ES et iPS humaines, reposant toujours sur une première étape de

formation d'EB, cultivées en présence d'un milieu pro-neural et de composés chimiques (LDN-19318 et XAV939) mimant l'activité des protéines Noggin et Dkk1. L'ajout d'une étape de repiquage manuel des structures neuro-épithéliales et ainsi de sélection permet d'obtenir, à l'issue de ce protocole, des structures 3D de type vésicule optique contenant une population homogène de progéniteurs rétiniens. Cependant, l'organisation structurale laminée et caractéristique de la rétine neurale est rapidement perdue dans ces structures (Meyer et al., 2011 ; Phillips et al., 2012). Une adaptation de ce protocole repose sur l'utilisation de Matrigel à faible concentration de facteurs de croissance (Growth Factor Reduced-Matrigel) et l'addition d'acide rétinoïque dans une fenêtre de temps bien définie, permettant respectivement d'augmenter la survie cellulaire et la maturation des photorécepteurs. Il a permis de montrer pour la première fois que des photorécepteurs dérivés de cellules iPS humaines, exprimant des marqueurs spécifiques des cônes et bâtonnets matures, sont capables de générer une réponse à un stimulus lumineux (Zhong et al. 2014).

Dans l'optique de futures applications cliniques, une véritable nécessité a émergé, celle de développer un protocole de différenciation rétinienne simple, robuste et fiable, et qui permet de réduire ou de s'affranchir de l'utilisation de facteurs exogènes (en particulier de Matrigel, dont la composition n'est pas précisément connue) et de sérum animal. Pour y répondre, une approche alternative a été développée au sein de notre équipe permettant de générer des organoïdes de neurorétine à partir de cellules iPS humaines, en absence de cellules nourricières et de composant d'origine animale dans le milieu, conditions dites feeder-free et xeno-free, et compatibles avec les réglementations GMP (Good Manufacturing Practices) requises en thérapie cellulaire (Reichman et al., 2014 ; Reichman et al., 2017). L'innovation de ce protocole repose sur la génération spontanée d'organoïdes neurorétiniens à partir de cellules souches pluripotentes différenciées en conditions adhérentes, sans étape de formation et de sélection d'EB (**Figure 29**). Ce protocole simple et reproductible de culture en 2D puis 3D, permet également de s'affranchir de l'utilisation de Matrigel et de l'ajout de différentes molécules d'induction, puisque le système de culture permet de stimuler la sécrétion endogène de NOGGIN et DKK1. La mise en culture en suspension de ces structures neurorétiniennes, permet la différenciation des progéniteurs rétiniens qu'elles contiennent en tous les types cellulaires de la rétine, d'une manière séquentielle conforme à la rétino-genèse naturelle. En terme de cinétique, les cellules ganglionnaires, amacrines et horizontales sont détectées entre 20 et 35 jours et les précurseurs des photorécepteurs autour de 30 à 40 jours. Les photorécepteurs plus matures, exprimant les pigments visuels opsine (cônes) ou rhodopsine (bâtonnets), sont identifiés après 75 à 80 jours de culture, en même temps que les cellules gliales

de Müller et les cellules bipolaires (Reichman et al., 2014). L'optimisation de ce protocole pour aboutir à des organoïdes rétiniens présentant une structure laminée au plus proche de la rétine humaine, permettant ainsi le développement et donc l'étude de la morphologie des segments externes des photorécepteurs, sévèrement ciblés dans le cadre de RP, a constitué l'un des objectifs premiers de mon travail de thèse.



**Figure 29. Représentation schématique des étapes clés de la différenciation d'organoïdes rétiniens à partir de cellules souches pluripotentes humaines.**

*En haut* : illustration des différentes étapes pour générer des organoïdes rétiniens à partir de cellules souches pluripotentes humaines adhérentes, sans formation de corps embryonnaires (Reichman et al. 2014 et 2017 ; Gonzalez-Cordero et al., 2017). *En bas* : présentation des protocoles de différenciation nécessitant la formation de corps embryonnaires à partir de cellules souches pluripotentes (Zhong et al., 2014, Kuwahara et al., 2015 and Capowski et al., 2019). **IPSM** milieu de culture des cellules iPS ; **RDM** milieu de différenciation rétinienne ; **RMM** milieu de maturation rétinienne. Extrait de Gagliardi et al., 2019.

## Différenciation en cellules de l'EPR

La capacité des cellules ES et iPS humaines à se différencier en cellules de l'EPR a été démontrée à plusieurs reprises, les méthodes principalement utilisées peuvent se distinguer en deux grandes catégories :

- La différenciation spontanée des cellules souches pluripotentes en cellules de l'EPR, en utilisant un système de culture adhérente.
- La différenciation nécessitant une étape de formation d'EB ou d'agrégats 3D des cellules souches.

La première approche consiste à permettre aux cellules ES ou iPS humaines de proliférer sur une période prolongée, et d'induire une différenciation spontanée en supprimant du milieu de culture le FGF2, facteur responsable du maintien de l'état de pluripotence. Ainsi, environ 1 à 8 semaines après le retrait du FGF2, des zones pigmentées brunes apparaissent au sein du tapis cellulaire, et s'élargissent au fil du temps. Ces zones pigmentées sont isolées manuellement et remises en culture pour être amplifiées sous forme de population pure et homogène (Klimanskaya et al., 2004 ; Vugler et al., 2008 ; Carr et al., 2009 ; Buchholz et al., 2009). Bien que les rendements soient plus faibles, l'avantage de cette méthode repose sur l'absence de facteurs exogènes en utilisant simplement des milieux supplémentés (Maruotti et al., 2013 ; Reichman et al., 2014). D'autre part, il est possible d'accroître le nombre de foyers pigmentés lors de ce processus de différenciation spontanée, en ajoutant un inhibiteur de la voie BMP telles que la dorsomorphine ou la molécule CHIR99021, un agoniste de la voie de signalisation Wnt (Lane et al. 2014 ; Leach et al., 2015).

Toujours dans l'objectif d'augmenter le rendement, des protocoles de « différenciation dirigée » ont été établis en mimant directement le modèle du développement précoce de l'EPR. Ces méthodes se sont donc appuyées sur l'utilisation, dans un premier temps, de facteurs induisant la différenciation neuronale tels que Noggin ou SB431542 (inhibiteur de la voie TGF- $\beta$ ) et le FGF2, puis impliqués dans la spécification en cellules de l'EPR tel que Shh. L'addition de ces facteurs spécifiques, sur les cellules pluripotentes adhérentes, permet d'obtenir une population de cellules pigmentées en près de 18 jours (Zahabi et al. 2012). Ce délai a été réduit à 14 jours, en combinant l'utilisation des facteurs de spécification rétinienne Noggin, IGF1, DKK1, et le FGF2, et de facteurs favorisant la différenciation des cellules de l'EPR tels que la nicotinamide (NIC), l'activine A, le peptide intestinal vasoactif (VIP) et un inhibiteur du récepteur au FGF

(SU5402). Ce protocole présente l'un des meilleurs rendements publiés avec près de 80% de cellules exprimant PMEL17, marqueur des pigments de l'EPR (Buchholz et al., 2013).

La méthode nécessitant la formation d'EB présente l'avantage d'être généralement initiée en même temps que la différenciation des cellules de la rétine neurale. Ainsi, plusieurs protocoles se basent sur la culture des EB dans un milieu d'induction neurale, contenant le supplément N2, puis d'un passage en culture adhérente, sur du matrigel ou de la laminine, dans un milieu contenant du B27, favorisant la différenciation rétinienne (Meyer et al., 2009 ; Phillips et al., 2012 ; Singh et al., 2013 ; Zhong et al., 2014). Différents progrès ont été réalisés par la suite, notamment pour réduire le temps de différenciation et améliorer le rendement. Ces optimisations se sont principalement basées sur l'utilisation de facteurs de croissance et de petites molécules capables de moduler spécifiquement certaines voies de signalisation.

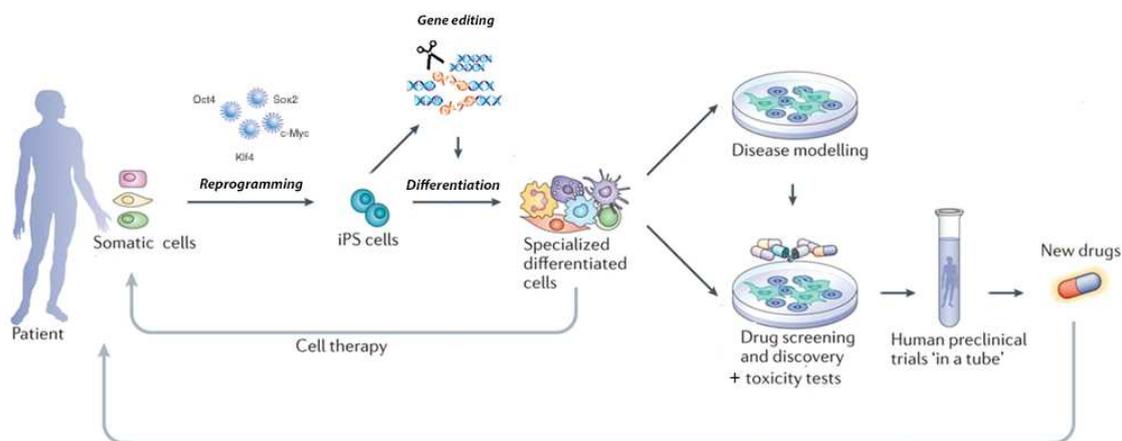
L'une des premières consiste à favoriser la production de précurseurs neuronaux, en cultivant les agrégats de cellules pluripotentes en présence de sérum et des facteurs DKK1 (inhibiteur de la voie Wnt) et Lefty A (inhibiteur de la voie BMP/nodal). Les structures en suspension sont ensuite dissociées (généralement après 20 jours de culture) etensemencées sur un substrat, différent suivant les études (le plus souvent laminine, Matrigel ou poly-D-lysine). Ces méthodes démontrent que près d'un tiers des cellules générées présentent des pigments ou sont positives pour les marqueurs de progéniteurs de l'EPR, co-exprimant MITF et PAX6 (Osakada et al., 2008 ; Hiramani et al., 2009). Inspiré de ce protocole de différenciation induite, les protéines recombinantes DKK-1 et Lefty-A ont été remplacées par les composés chimiques CKI-7 (inhibiteur de la caséine kinase) et SB431542 (inhibiteur des récepteurs TGF de type 1), afin d'obtenir une méthode de différenciation adaptable aux normes requises pour de futures applications cliniques (Nistor et al. 2010).

Les cellules de l'EPR sont également présentes au sein des structures de type vésicule optique rapportées par différentes équipes (Nakano et al., 2012 ; Zhong et al., 2014). En effet, après différentes étapes de culture en présence de sérum de veau fœtal et de composés chimiques modifiant la signalisation des voies BMP et Wnt, les vésicules contiennent dans leur partie la plus externe des cellules qui expriment MITF, marqueur spécifique de l'EPR (Nakano et al., 2012). Des structures très similaires avec une couche de cellules de l'EPR sont également obtenues à l'aide d'un protocole passant par la formation d'EB et n'utilisant qu'un milieu supplémenté avec du N2 ou du B27 (Zhong et al., 2014). Bien que l'efficacité de ces protocoles reste relativement faible, ils permettent néanmoins d'obtenir une population pure de cellules de l'EPR capable de proliférer.

Le protocole mis au point et utilisé au sein de notre équipe permet, à partir de cellules iPS humaines, la production simultanée de photorécepteurs (au sein d'organoïdes) et de cellules de l'EPR, répondant parfaitement aux besoins rencontrés dans l'étude de pathologies dégénératives de la rétine où ces deux types cellulaires sont atteints. Il repose sur la différenciation spontanée en cellules de l'EPR, ne nécessitant ainsi pas la formation d'EB, des cellules iPS soumises à un milieu de culture uniquement supplémenté en N2. Ce protocole feeder-free, xeno-free et compatible avec les exigences cliniques, permet de générer en 1 mois une population pure de cellules pigmentées présentant la structure en « nid d'abeille » caractéristique, exprimant des marqueurs spécifiques (MITF, MERTK et RPE65), et réalisant un certain nombre de fonctions physiologiques importantes pour l'EPR telles que la phagocytose des segments externes des photorécepteurs, la formation des jonctions serrées et la sécrétion de molécules bioactives de manière polarisée (Reichman et al., 2014). Enfin, ce protocole simplifié et rapide permet aussi de produire un très grand nombre de cellules, offrant ainsi un large champ d'application allant de l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents au développement de la rétine humaine, au criblage de molécules pharmacologiques, en passant par les thérapies cellulaires et géniques, ou encore le développement de modèles *in vitro* de maladies dégénératives de la rétine humaine.

### ***III. 4. Intérêt clinique des cellules rétinienne dérivées de cellules iPS humaines***

La technologie iPS est un outil puissant pour le développement d'applications thérapeutiques futures. Basé sur la combinaison des propriétés fondamentales de ces cellules et l'émergence de protocoles de différenciation reproductibles et efficaces, il est désormais possible d'obtenir des quantités potentiellement illimitées de cellules différenciées d'intérêt (**Figure 30**).



**Figure 30. Les différentes applications des cellules iPS humaines.**

Les cellules iPS représentent un outil innovant pour de nombreuses approches thérapeutiques, parmi lesquelles : la thérapie génique, la thérapie cellulaire, la modélisation pathologique *in vitro* dans un contexte humain, et le criblage pharmacologique pour identifier de futures molécules d'intérêt mais aussi évaluer leur toxicité. Adapté de Riva et Hénaut, 2014.

Une des utilisations thérapeutiques potentielles majeures est la thérapie cellulaire ou médecine régénérative. Elle vise à réparer ou remplacer les tissus altérés, par une maladie ou un accident, par des cellules saines et fonctionnelles. Ces cellules transplantables sont produites et amplifiées *in vitro* à partir de cellules qui peuvent être issues ou dérivées du patient lui-même, la greffe est dite autologue, ou d'un donneur, greffe allogénique. En septembre 2014, les premiers essais cliniques de médecine régénérative chez l'homme à l'aide des cellules iPS voient le jour. Ils sont conduits au Japon par la Fondation pour la Recherche Biomédicale et l'Innovation de Kobé (Institut RIKEN) sur une patiente atteinte de DMLA, première cause de cécité des plus de 55 ans dans les pays industrialisés. Avec son équipe, le Dr. Masayo Takahashi, a ainsi transplanté dans la rétine de la patiente un feuillet de cellules de l'EPR dérivées de cellules iPS reprogrammées à partir de ses propres fibroblastes. L'opération apporte des premiers résultats prometteurs, elle permet de stabiliser la vision de la patiente, lui évitant les injections intra-oculaires fréquentes jusqu'ici seul traitement enrayant la dégradation de son acuité visuelle (Mandai et al., 2017). La question de la sécurité de l'utilisation des cellules iPS reste toutefois à résoudre, le risque de développement de tumeurs après transplantation lié à la présence de cellules iPS résiduelles dans le greffon n'étant pas négligeable. Afin de sélectionner des produits dérivés de cellules iPS suffisamment purs pour être utilisables en clinique, l'équipe du RIKEN a proposé des lignes directrices pour la réalisation de tests d'évaluation de

la tumorigénicité. Ils reposent sur l'estimation du risque de formation de tératomes après transplantation chez l'animal, généralement la souris (Kawamata et al., 2015). Actuellement, une dizaine d'essais cliniques sont en cours dans le monde, reposant essentiellement sur l'utilisation de cellules iPS allogéniques, et couvrant de nombreux domaines tels que les maladies neurodégénératives en particulier la maladie de Parkinson, l'insuffisance rénale ou encore la cancérologie.

En plus d'offrir une source illimitée de cellules essentielles pour la thérapie cellulaire, l'avènement de protocoles de différenciation rétinienne, menant à des cellules ou des organoïdes rétiniens ayant des propriétés similaires à la rétine *in vivo*, a fourni aux chercheurs une plateforme idéale pour comprendre les maladies rétiniennes. De plus, les cellules iPS dérivées directement du patient ne portent pas uniquement la ou les mutations géniques d'intérêt, mais abritent l'ensemble du fond génétique du patient, c'est à dire les modifications génétiques connues et inconnues susceptibles de contribuer et d'expliquer les mécanismes et le phénotype de la maladie. Enfin, en raison de leur hétérogénéité génétique complexe, les modèles cellulaires iPS de dystrophies rétiniennes héréditaires sont d'une importance capitale lorsque les modèles animaux n'existent pas ou ne montrent pas tous les aspects de la pathologie humaine. Dans le contexte de l'œil, la majorité des modèles animaux ne permettent pas forcément de récapituler tous les aspects de la maladie humaine, l'œil humain ayant ses propres spécificités, telle que l'existence de la fovéa. Par ailleurs, les tissus post-mortem humain présentent généralement une dégénérescence trop avancée pour permettre l'étude et la compréhension des mécanismes pathologiques à l'origine du phénotype. Ainsi, dernièrement de nombreuses études reposant sur la dérivation de cellules iPS de patients atteints de différentes maladies dégénératives de la rétine, impliquant plus particulièrement la dégénérescence des photorécepteurs et/ou de l'EPR, ont permis de mieux comprendre l'étiologie et l'évolution de la maladie mais aussi d'identifier de nouvelles mutations causales (**Tableau 1**).

Il a été possible par exemple d'élucider le mécanisme pathologique lié aux mutations du gène *RPGR* (Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator), représentant 16% des patients atteints de RP, en générant des organoïdes rétiniens et des cellules de l'EPR à partir de cellules iPS humaines. Les photorécepteurs dérivés des cellules iPS portant la mutation présentent une morphologie altérée avec des cils raccourcis (visible également dans les cellules de l'EPR) associée à une localisation aberrante, des défauts transcriptionnels et une anomalie de l'activité électrophysiologique. Ces différents défauts correspondent au phénotype observé en clinique,

appuyant la pertinence de l'utilisation des cellules iPS pour la modélisation pathologique (Deng et al., 2018).

L'utilité des cellules iPS dans la découverte de nouvelles mutations géniques causales s'est parfaitement illustrée avec l'étude du gène *MAK* (Male Germ Cell Associated Kinase). La génération de progéniteurs rétiniens et de précurseurs de photorécepteurs, à partir de cellules iPS d'un patient atteint d'une forme de RP, a permis d'identifier le type de mutation à l'origine de la maladie : l'insertion d'une séquence Alu homozygote dans l'exon 9 du gène *MAK*. Cette mutation perturbe l'épissage du gène *MAK* et la production d'une protéine MAK fonctionnelle, à l'origine d'une dégénérescence des photorécepteurs (Tucker et al., 2011).

L'établissement de tels modèles *in vitro*, qui permettent à la fois de comprendre les mécanismes pathologiques sous-jacents mais aussi de mimer au mieux le phénotype de la maladie, associé à l'abondance de cellules d'intérêt qu'il est possible de générer à partir de cellules iPS offrent un nouvel horizon au criblage pharmacologique. Les lignées cellulaires iPS de patients peuvent ainsi être utilisées à la fois pour tester différents composés pharmaceutiques dans le but de restaurer le phénotype de la maladie et donc trouver un nouveau médicament efficace, mais aussi pour étudier les effets toxiques potentiels d'un traitement. De telles études ont permis de démontrer l'effet positif de l' $\alpha$ -tocophérol sur la survie des bâtonnets (Jin et coll., 2011). L'ajout de cet antioxydant lors de la culture de photorécepteurs dérivés de cellules iPS de patients atteints de RP, due à une mutation dans le gène *RP9*, ayant fait ses preuves (Jin et al., 2011). Le même type d'approche sur des photorécepteurs porteurs d'une mutation dans le gène *RHO*, a permis de sélectionner des inhibiteurs de la voie mTOR comme composés neuroprotecteurs (Yoshida et al., 2014).

En plus des tests pharmacologiques, les modèles de maladies rétiniennes basés sur les cellules iPS offrent un excellent support pour mettre au point et tester les stratégies de thérapie génique directement dans un contexte humain, critère d'une extrême importance dans l'évaluation du tropisme des vecteurs viraux (Gonzalez Cordero et al., 2018 ; Khabou et al., 2018).

Il a déjà été démontré que la thérapie génique par le système CRISPR-Cas9 propose des possibilités thérapeutiques intéressantes pour les maladies rétiniennes héréditaires, comme les RP (Burnight et al., 2017). La génération de lignées de cellules iPS où le gène causant la maladie est corrigé, en utilisant l'outil moléculaire CRISPR-Cas9, est importante non seulement pour répondre à un objectif thérapeutique, mais aussi pour générer des lignées contrôles isogéniques

indispensables pour une modélisation fidèle de la maladie. Ces contrôles permettent de s'affranchir de l'influence du fond génétique et épigénétique du patient dont sont dérivées les cellules iPS et ainsi d'étudier uniquement les conséquences liées à la mutation d'intérêt. La génération de cellules iPS spécifiques de patients, associée à celle de contrôles isogéniques génétiquement corrigés, voire de lignées contrôles de parents non affectés, est actuellement l'approche optimale pour obtenir des résultats robustes et fiables de modélisation des maladies.

Pathologie	Gene	Mutation	Cellules d'origine	Technique de Reprogrammation	Type cellulaire différencié	Référence
RP récessive	MAK	Alu Insert Ex9	Fibroblastes	Lentivirus (OKSM)	Neurones rétiniens	Tucker et al. 2011
RP RP dominante RP dominante RP dominante	RP1 PERIPHERINE-2 RHODOPSINE RP9	p721Lfs722X pW316G pG188R pH137L	Fibroblastes	Lentivirus (OKSM)	Bâtonnets	Jin et al. 2011
RP dominante	RHODOPSINE	pG188R	Fibroblastes	Virus de Sendai (OKSM)	Cellules de l'EPR et bâtonnets	Jin et al. 2012
Amaraose congénitale de Leber RP liée à l'X Syndrome d'Usher	LCA RP2 USH1	non précisée	Fibroblastes	Rétrovirus (OKSM)	Cellules de l'EPR	Zahabi et al. 2012
Maladie de Batten RP Amaraose congénitale de Leber Maladie de Stargardt	<i>non précisé</i>	<i>non précisée</i>	Fibroblastes	Virus de Sendai (OKSM)	Cellules de l'EPR neurones rétiniens	Tucker et al. 2013
RP ou maladie de Best	BESTROPHINE BESTROPHINE	A146K N296H	Fibroblastes	Lentivirus (OKSM)	Cellules de l'EPR	Singh et al. 2013
Syndrome d'Usher	USH2A	R4192H	Fibroblastes - Keratinocytes	Virus de Sendai (OKSM)	Cellules de l'EPR / neurones rétiniens / photorécepteurs	Tucker et al. 2013
Chroidériémie	CHM	doupe dup. (introns 7 et 8)	Fibroblastes	Lentivirus (OKSM)	Cellules de l'EPR	Cereso et al. 2014
		c1370 T>C	Fibroblastes	Sendai Virus (OKSM)		Torriano et al., 2017
		c772 A>T	Fibroblastes			Torriano et al., 2018
		c1327_1328delAT	Cellules sanguines			Duong et al., 2018
		t(12;20)(q24.3;q11.2)	Fibroblastes			Erklic et al., 2019
RP récessive	Mb Frizzled-related protein	IVS10+5G>A 1 bp-del (492C)	Fibroblastes	Lentivirus (OKSM)	Cellules de l'EPR	Li et al. 2014
RP dominante	RHODOPSINE	E18K	Fibroblastes	Rétrovirus (OKSM)	Photorécepteurs	Yoshida et al. 2014
RP liée à l'X	RP2	R120X	Fibroblastes	Episomes	Cellules de l'EPR	Schwartz et al. 2014
Amaraose congénitale de Leber	CEP290	IVS26+1655 A>G	Fibroblastes	Virus de Sendai (OKSM)	Photorécepteurs	Burnight et al. 2014
RP récessive	LCHAD	E510Q	Fibroblastes	Rétrovirus (OKSM)	Cellules de l'EPR	Polinati et al. 2015
Amaraose congénitale de Leber	RPE65	IVS3-11	Fibroblastes	Sendai Virus (OKSM)	Cellules de l'EPR	Tucker et al. 2015
RP récessive	MERTK	S331S fs5*	Fibroblastes	Sendai Virus (OKSM)	Cellules de l'EPR	Lukovic et al. 2015 Artero Castro et al. 2019
RP dominante	PRPF8	6901C>T (exon 42)	Fibroblastes	Episomal (OKSM / Lin28 SV40)	None (isogenic-CRISPR) Cellules de l'EPR	Howden et al. 2015 Foltz et al. 2018
Amaraose congénitale de Leber	CEP290	c.2991+1665A>G	Fibroblastes	Episomal (OKSM / Lin28+ shRNAp53)	Organoides rétiniens	Parfitt et al. 2016
RP récessive	TRNT1	c127_129delGAA c1252delA c1245-1253insA c609T>C	Fibroblastes	Sendai Virus (OKSM)	Organoides rétiniens	Sharma et al. 2017
RP liée à l'X	RPGR	c1685_1686delAT c2234_2235delGA c2403_2404delGA	Cellules urinaires	Lentivirus (OKSM) Episomal	Organoides rétiniens	Deng et al. 2018
RP dominante	PRPF31	c1115-1125del11 c522-527+10del c12055C > A	Fibroblastes	Sendai Virus (OKSM) Episomal (OKSM / Lin28+)	Cellules de l'EPR / Organoides rétiniens Cellules de l'EPR	Buskin et al. 2018 McLenachan et al. 2018
RP récessive	CRB1	c.3122T>C (Met104Thr) 2,983G>T (Glu995*) c1892A>G (Tyr631Cys) c.2843G>A (Cys948Tyr) c3122 T>C (Met1014Thr)	Fibroblastes	Lentivirus (OKSM)	Organoides rétiniens	Quinn et al. 2019
Syndrome d'Usher	USH2A	c8559-2A > G c.9127_9129delTCC	Cellules urinaires	Sendai Virus (OKSM)	Retinal organoids	Guo et al. 2019
Amaraose congénitale de Leber	RPE65	c.200T>G (p.L67R) c.430T>C (p.Y144H)	Cellules urinaires	Episomal (OKS SV40LT / miR-302-367)	Cellules de l'EPR / Organoides rétiniens	Li et al. 2019
		625c>T (R209C)	Fibroblastes			
		200T>G (p.L67R) 430T>C (p.Y144H)	Fibroblastes	Sendai Virus (OKSM)	Cellules de l'EPR	Li et al. 2020
RP récessive	PDE6B	c.694G>A (Glu232Lys)	Cellules sanguines (PBMCs)	Episomal (OKSM / Lin28+ shRNAp53 + miR-302-367)	Organoides rétiniens	Gao et al. 2020
RP dominante	NRL	c.223dupC (L75Pfs*19)	Fibroblastes	Sendai Virus (OKSM)	Organoides rétiniens	Kallman et al. 2020
RP récessive	CRB1	1369C>T (p.R457X) 2027C>T (p.T676M)	Fibroblastes	Lentivirus TET	Structures de type vésicule optique	Tang et al. 2020
RP récessive	BBS10	271dup (frameshift Stop) (909_912del; 687del)	Fibroblastes	Retrovirus (OKSM)	Structures de type organoides rétiniens	Barabino et al. 2020
	MKS (TMEM67)	Hetero 233G > A 1046T > C				
RP récessive	ABCA4	intron 36 (c.5196+1137G>A)	Fibroblastes	<i>not precised</i>	Organoides rétiniens	Khan et al. 2020
RP liée à l'X	RP2	358C>T (R120X) 371_378del (Lys124SerfsTer11)	Fibroblastes	Sendai Virus (OKSM)	Organoides rétiniens	Lane et al. 2020
RP récessive	MERTK	deletion 2q13 (112,726,509-112,803,074) c.1297_1451del (K433_G484fsTer3)	Fibroblastes Cellules sanguines (PBMCs)	Sendai Virus (OKSM)	Cellules de l'EPR	Almedawar et al. 2020 Biswas et al. 2020
Amaraose congénitale de Leber	CRX	G264T (K88N) 413delT (1138fs48)	Fibroblastes	Sendai Virus (OKSM)	Organoides rétiniens	Kruczek et al. 2021
RP récessive	MERTK	c.225delA (Gly76Glufs*3) c.370C > T (Gln124*) c.225delA_p.(Gly76Glufs*3)	Fibroblastes	Sendai Virus (OKSM)	Cellules de l'EPR	Tagawa et al. 2021
RP récessive	NR2E3	166 G > A (G56R)	Fibroblastes	Sendai Virus (OKSM)	Organoides rétiniens	Diakatou et al. 2021
Syndrome de Bardet-Biedl	BBS5	214G > A (Gly72Ser)	Fibroblastes	Episomal (OKSM / Lin28+ shRNAp53)	Cellules de l'EPR	Hey et al. 2021
RP dominante	PRPF8	6974_6994del (Val2325_Glu2331del)	Fibroblastes	Retrovirus (OKSM)	Cellules de l'EPR	Arzalluz-Luque et al. 2021
RP récessive	CRB1	c.2555 T > C c.3014A > T	Fibroblastes	Episomal (OKSM)	Organoides rétiniens	Moon et al. 2021

**Tableau 1. Modèles de rétinopathies pigmentaires établis à partir de cellules iPS de patients.**

## IV. La thérapie génique

Né de l'essor des techniques d'édition du génome et de la vectorologie, le concept de thérapie génique s'est rapidement imposé dans le but de soigner les maladies génétiques. Cette technique consiste à insérer directement et de manière souvent permanente du matériel génétique dans des cellules cibles, soit pour remplacer un gène muté par une copie saine de celui-ci, soit pour inactiver un gène muté qui ne fonctionne pas correctement, soit pour introduire un nouveau gène dans l'organisme suivant une approche d'augmentation génique.

### IV.1. Edition du génome par CRISPR/Cas9

L'édition du génome désigne un ensemble de techniques utilisées pour modifier les séquences d'ADN qui constituent le génome. Jusque récemment, les nucléases à doigt de zinc, les méganucléases ou encore les TALENs, nucléases effectrices de type activateur de transcription, étaient utilisées. La découverte du système CRISPR/Cas9, distingué par un prix Nobel en 2020, moins couteux, plus simple, rapide et efficace pour couper l'ADN à un endroit précis du génome, dans n'importe quelle cellule, représente une véritable révolution technique (Doudna et Charpentier, 2014).

Le ciseau moléculaire CRISPR/Cas9 est dérivé d'un mécanisme de défense naturel des bactéries et archae contre les infections virales ou plasmidiques. Lors de la libération des acides nucléiques viraux au sein de la bactérie, celle-ci incorpore dans son génome une partie de la séquence virale sous forme de « spacer » entre des régions courtes et répétées appelées CRISPR (pour « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats »). Les spacers sont alors transcrits en ARN complémentaires au génome viral et s'associent à une endonucléase, Cas9, qui clive et inactive l'ADN viral lorsque celui-ci est complémentaire et donc reconnu (Mali et al., 2013).

Le système CRISPR se compose donc de trois éléments principaux et essentiels :

- Le crARN qui est composé d'un ARN provenant de la transcription de l'ADN sauvegardé dans la matrice CRISPR, il est complémentaire à la séquence ADN virale correspondante.
- Le tracrARN (*trans-activating crRNAs*) qui contribue à la maturation et l'activation du crARN.

- L'endonucléase Cas9 qui possède deux régions à activité nucléase permettant chacune de cliver un brin de l'ADN ciblé.

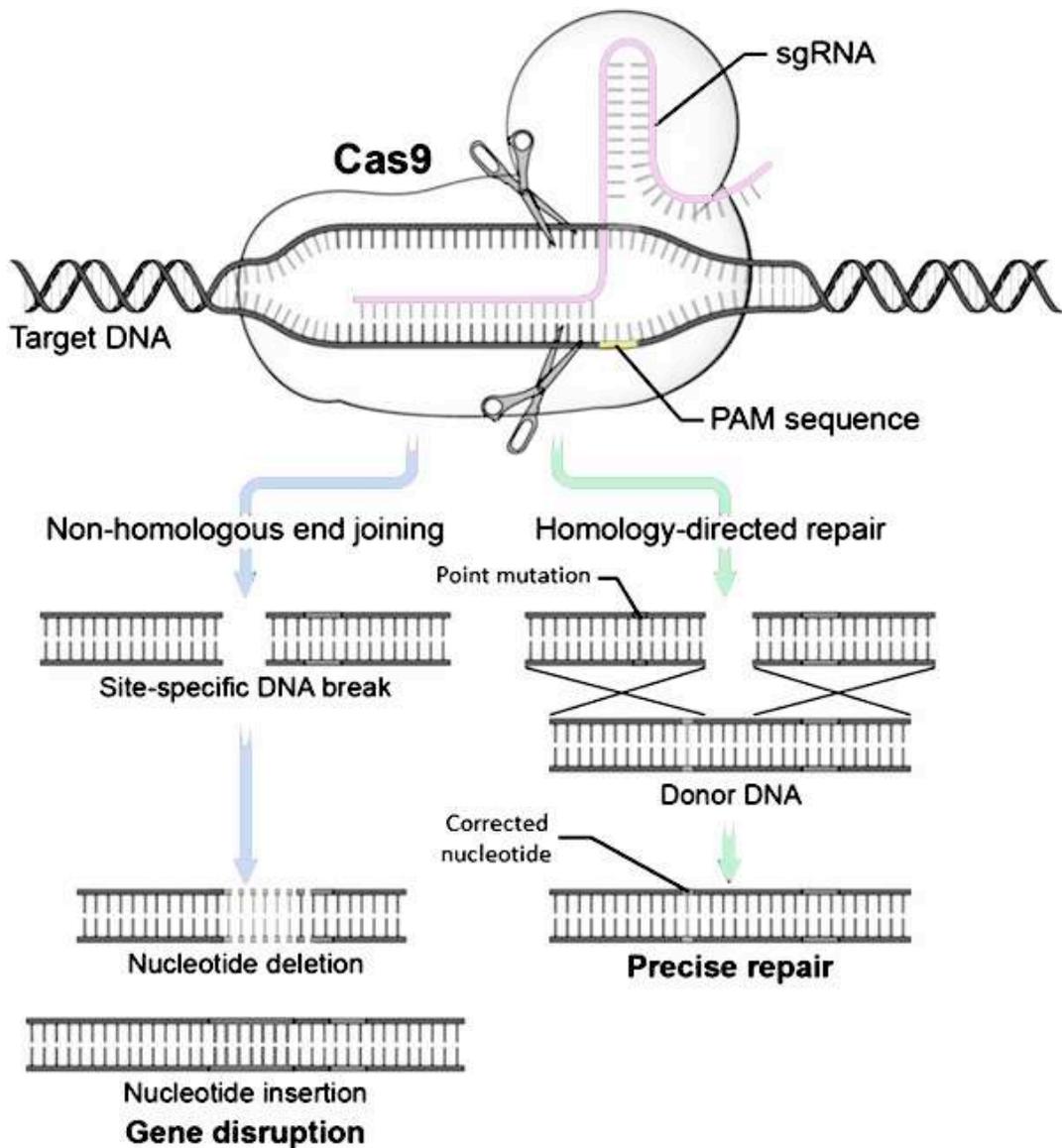
Le crRNA va induire la dégradation de l'ADN phage en s'y liant par complémentarité, permettant le recrutement de la Cas9 médié par le complexe entre le crRNA et le tracrRNA.

En 2012, une avancée majeure est réalisée en fusionnant le crARN et le tracrARN de la bactérie *Streptococcus pyogenes* en un seul ARN guide (ARNg) qui induit de façon efficace le clivage par la Cas9 (Jinek et al., 2012). Elle se lie au complexe formé entre l'ARN guide et l'ADN cible, et à une séquence spécifique de 3 à 5 nucléotides appelée *protospacer adjacent motif* (PAM), située en aval de la séquence ciblée par l'ARN guide. Pour la Cas9 provenant de *S. pyogenes*, la plus fréquemment utilisée, le motif PAM est formé par les nucléotides NGG (nucléotide-guanine-guanine). Les PAM sont très fréquentes dans tous les génomes (statistiquement présente environ une fois toutes les huit paires de bases pour NGG), et ne limitent donc que très peu le nombre de séquences qui peuvent être ciblées. Il est aussi possible d'utiliser des Cas9 provenant d'autres bactéries qui possèdent des séquences PAM associées différentes (**Tableau 2**). Ce n'est qu'après avoir reconnue et liée la séquence PAM que la Cas9 change de conformation et fait intervenir ses deux domaines nucléases (RuvC et HNH), chacun coupant un des deux brins de l'ADN environ 3 à 4 nucléotides en amont de la séquence le PAM (**Figure 31**). Ce détournement du système immunitaire adaptatif de la bactérie donne naissance à un véritable ciseau moléculaire, d'une facilité et d'une précision remarquable, adaptable dans n'importe quelle cellule de n'importe quel eucaryote. Seul l'ARNg doit être modifié et adapté à la séquence cible d'intérêt. Sa séquence comprend généralement entre 17 et 20 nucléotides complémentaires à la séquence génomique d'intérêt, suivie d'un motif constant correspondant au PAM spécifique de la Cas9 sélectionnée. Il peut être produit par transcription *in vitro* ou *in vivo*, et est habituellement associé aux promoteurs SP6, T3 et T7, issus des bactériophages du même nom (Bannikov et Lavrov, 2017).

<b>Espèce et type d'endonucléase Cas9</b>	<b>Variant</b>	<b>Séquence PAM</b>
Streptococcus pyogenes (Sp)	D1135E VRER EQR VQR	3' NGG NGG NGCG NGAG NGAN et NGNG
Streptococcus mutans (Sm)		NGG
Streptococcus thermophilus (St)		NNAAAW
Staphylococcus aureus (Sa)		NNGRRT OU NNGRR(N)
Treponema enticola (Te)		NAAAAC
Lactobacillus buchneri		NAAAAN
Francisella novicida		NG
Neisseria meningitidis (Nm et Nme)		NNNNGATT
Campylobacter jejuni (Cj)		NNNNRYAC

**Tableau 2. Présentation des différentes endonucléases Cas9 et leur motif PAM associé.**

Adapté de Addgene.org et Anders et al., 2014.



**Figure 31. Le complexe d'édition du génome CRISPR-Cas9.**

Cet outil repose sur 3 éléments principaux : la nucléase Cas9 qui induit des coupures double brin de l'ADN, un ARN guide (sgRNA) complémentaire de la séquence cible souhaitée, et une séquence de reconnaissance de quelques nucléotides dite séquence PAM (Protospacer Adjacent Motif). L'hybridation du sgRNA entraîne Cas9 à proximité du site choisi. La liaison de Cas9 avec une séquence PAM adjacente induit un changement conformationnel qui active l'activité de la nucléase et aboutit à une cassure double brin de l'ADN. La réparation de l'ADN fait intervenir les mécanismes endogènes de la cellule, le plus souvent le mécanisme de jonction d'extrémités non-homologues, ou la recombinaison homologue. Adapté de Guitart et al., 2016.

La cassure double brin de l'ADN, induite par la Cas9, est ensuite réparée par l'un des deux mécanismes cellulaires de réparation de l'ADN (**Figure 31**) :

- Spontanément, le processus le plus courant est le mécanisme de jonction d'extrémités non-homologues (ou NHEJ) qui assure la continuité de l'ADN endommagé et non la restauration de la séquence initiale. Il cause donc souvent des petites insertions ou délétions (indels), entraînant aléatoirement une réparation ou une perte de fonction du gène.
- En apportant une séquence d'ADN donneur complémentaire de la séquence endommagée, une recombinaison homologue (ou HDR) avec cette séquence peut avoir lieu. L'ADN donneur doit contenir, de chaque côté de la coupure de l'ADN ciblé, des séquences homologues allant de 50 à 2000 nucléotides. Entre ces deux séquences homologues, l'ADN donneur peut comporter une longue séquence de nucléotides qui sera introduite dans le gène ciblé. En introduisant dans la cellule une séquence d'ADN flanquée de séquences homologues au site de coupure, il est alors possible d'insérer un nouveau gène à cet endroit précis du génome (on parle de "knock-in" ou KI), ou de remplacer le gène existant pour créer ou réparer une mutation sur la séquence endogène.

Le point critique de l'utilisation des outils d'édition du génôme est l'existence possible de coupures et donc de modifications de l'ADN en dehors de la séquence ciblée, communément nommées « off-targets ». Bien qu'en théorie, une séquence constituée de 16 à 20 acides aminés consécutifs est unique dans le génome humain, de nombreuses études ont rapporté l'existence d'off-targets sur des séquences présentant jusqu'à cinq nucléotides différents par rapport à la séquence cible. Ces séquences sont toujours suivies du motif PAM, et il a été remarqué que les nucléotides les plus proches de celui-ci étaient moins fréquemment sujets à une erreur d'appariement, à l'inverse des nucléotides les plus éloignés (Fu et al., 2013).

Diverses optimisations ont ainsi été mises au point dans l'objectif d'augmenter la spécificité de ce système :

- Des mutations ont été introduites dans chacun des domaines catalytiques de la Cas9, afin de générer des nickases qui ne coupent qu'un seul des deux brins de l'ADN. La coupure double-brin de l'ADN nécessite donc l'utilisation de deux ARNg différents, chacun couplé avec une Cas9-nickase. Cette approche qui nécessite deux coupures rapprochées a permis de diminuer drastiquement le risque de off-target, jusqu'à 1500 fois selon la lignée cellulaire utilisée (Ran et al., 2013).

- La mutation de certains acides aminés de la Cas9 favoriserait la spécificité du système (Slaymaker et al., 2016).
- L'utilisation d'ARNg légèrement tronqués, 17 ou 18 nucléotides au lieu de 20 classiquement, permet également de restreindre davantage l'édition à la séquence d'intérêt (Fu et al., 2014).

Il reste toutefois nécessaire de vérifier l'absence de off-target en se basant sur l'analyse de la prédiction *in silico* des séquences off-targets les plus probables associée à la séquence originellement ciblée, puis en les séquençant.

CRISPR/Cas9 représente donc actuellement l'outil d'édition du génome incontournable. Il a révolutionné l'étude des maladies génétiques en permettant d'établir rapidement des lignées cellulaires modifiées stables, utilisées pour comprendre les mécanismes d'action d'une mutation en l'induisant ou à l'inverse en la corrigeant. Il a ainsi permis de générer de nombreux modèles pathologiques animaux, viables et déterminants, mais aussi directement dans un contexte humain grâce à l'utilisation notamment des cellules iPS humaines. La capacité de cet outil, à pouvoir cibler virtuellement n'importe quelle séquence du génome avec une facilité presque déconcertante et un champ d'actions complet, a également permis d'étendre radicalement les perspectives liées aux stratégies de traitement de certaines maladies génétiques. Combiné à l'émergence de vecteurs de transport d'acide nucléiques de plus en plus efficace, le système CRISPR-Cas9 fait tomber les barrières de la thérapie génique.

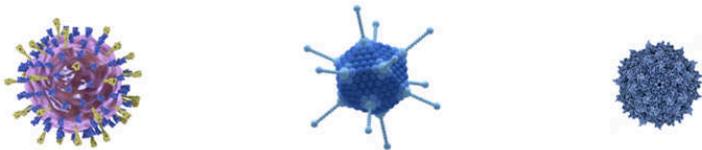
#### ***IV.2. Les vecteurs viraux***

En permettant d'introduire un gène sain ou de corriger une mutation dans les cellules d'un patient, l'édition génomique ouvre la voie à de potentielles thérapies géniques. Mais elle se confronte aux mêmes difficultés que les autres techniques de génothérapie, en particulier en ce qui concerne la vectorisation. C'est l'étape qui consiste à faire entrer l'ADN thérapeutique et/ou les nucléases nécessaires, Cas9 pouvant être délivrée sous forme ADN, ARN ou protéique, dans les cellules à traiter. Différentes méthodes de transport ont été développées, et se classent en deux grandes catégories :

- Les vecteurs non-viraux : l'ADN est combiné à des composés chimiques cationiques ou lipidiques afin de faciliter la traversée de la membrane cellulaire. Cette technique présente une toxicité inférieure, mais aussi une plus faible efficacité en particulier *in vivo*.

- Les vecteurs viraux : qui assure le transport en exploitant les propriétés exceptionnelles des virus pour livrer leur cargo génétique. Ils représentent le choix associé à la plus grande efficacité actuellement, et sont ainsi impliqués dans plus de 75% des essais cliniques de thérapie génique.

Un vecteur viral est un virus modifié dans lequel les gènes viraux ont été remplacés par un ou plusieurs gènes d'intérêt thérapeutique. Par conséquent, le virus est toujours capable de transférer son matériel génétique dans la cellule cible, mais il n'est plus capable de se répliquer. Les protéines nécessaires aux processus liés à l'infection virale sont ainsi codées par des gènes viraux apportés indépendamment du génome viral recombinant. Il existe différents types de vecteurs possédant chacun des caractéristiques propres qui découlent du virus d'origine dont ils sont issus, certaines particulièrement déterminantes dans le choix du virus à employer : la taille de la cassette du transgène qui peut être incorporée dans le génome viral, les cibles cellulaires, la stabilité de l'expression transgénique au fil du temps, la réponse immunitaire induite, et le potentiel oncogène lié aux propriétés intégratives de certains. Les principaux vecteurs utilisés pour la thérapie génique associées aux dégénérescences rétiniennes sont issus de trois virus : les lentivirus, les adénovirus, et les virus adéno-associés (AAV) (**Figure 32**).



	<b>Lentivirus</b>	<b>Adénovirus</b>	<b>AAV</b>
<b>Génome</b>	ARN	ADN double brin	ADN simple brin
<b>Capacité d'emballage</b>	10 Kb	36 Kb	4,7 Kb
<b>Cibles</b> ( <i>injection sous-rétinienne</i> )	EPR (faible efficacité sur PR)	EPR (faible efficacité sur PR)	EPR et PR
<b>Expressions</b>	Longue (intégration)	Longue dans les cellules post-mitotiques	Longue dans les cellules post-mitotiques
<b>Effets indésirables</b>	Risque oncogène	Induit une forte réponse immunitaire  Difficile à produire	

**Figure 32. Résumé des principales caractéristiques des vecteurs viraux les plus utilisés dans le cadre des thérapies géniques liées à l'œil.**

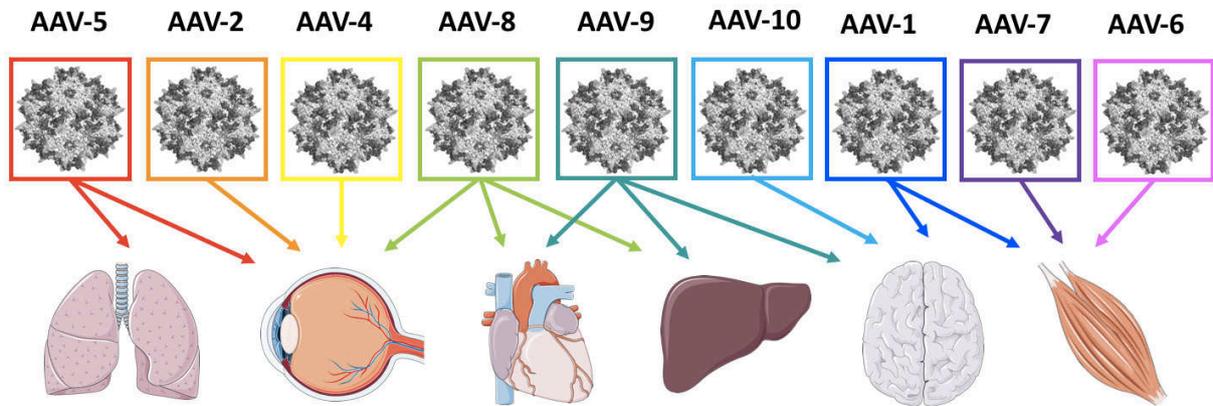
Les lentivirus sont des virus à ARN enveloppés, avec un génome viral d'environ 10 Kb. Ils sont généralement produits par une triple co-transfection plasmidiques des cellules hôtes productives avec : le premier codant les protéines de l'enveloppe, le second toutes les protéines nécessaires à la transcription inverse et au conditionnement du génome viral, et le troisième code le génome vectoriel contenant la cassette transgénique comprise entre deux longues régions terminales (LTR). Les vecteurs lentiviraux appartiennent à la classe des vecteurs intégratifs, ils s'insèrent dans le génome de la cellule hôte, permettant une expression durable dans le temps, même dans les cellules à haut taux de division. Mais cette intégration présente rapidement un problème majeur en thérapie génique, la transactivation possible de gènes potentiellement oncogènes proches du site d'intégration (Hacein-Bey-Albina et al., 2003). Des modifications ont ainsi été apportées pour améliorer la sécurité de l'utilisation de ces virus, tels que le développement de lentivirus self-inactivating, ou encore des lentivirus non intégratifs (Durand et Cimarelli, 2011 ; Yanez-Munoz et al., 2006). Néanmoins, pour la transduction des cellules rétinienne les lentivirus ne sont pas pleinement satisfaisants, bien qu'ils délivrent efficacement les gènes aux cellules de l'EPR, leur efficacité à transduire les photorécepteurs est plus limitée (Bemelmans et al., 2005 ; 2006).

Les adénovirus sont des virus non enveloppés présentant un génome à ADN double brin d'environ 35 Kb. Les premières générations de vecteurs adénoviraux recombinants conservent une partie importante de la séquence de codage viral, facilitant leur production *in vitro*, mais les rendant fortement immunogènes et toxiques. Par la suite, de nombreuses modifications ont été apportées pour améliorer leurs capacités et réduire leurs inconvénients, conduisant à un nouveau groupe de vecteurs dit à haute capacité. Totalement dépourvus de gènes viraux, ils ont une grande capacité d'encapsulation par rapport aux autres virus (environ 35 Kb), mais ils nécessitent un système complexe pour la production des particules virales impliquant un virus auxiliaire (Burcin et al., 1999). Les adénovirus dépendant d'auxiliaires sont donc beaucoup plus difficiles à produire, mais l'absence d'expression de gènes viraux dans les cellules transduites permet d'échapper à la réponse immunitaire normalement engendrée. Le principal atout de ce vecteur réside dans sa capacité élevée de chargement d'ADN, ainsi le développement d'adénovirus capables de transduire efficacement et de façon stable s'avère particulièrement utile pour traiter les maladies causées par des mutations dans des gènes de grandes tailles, trop larges pour être véhiculés par d'autres virus. Les adénovirus dépendants d'auxiliaires permettent une expression transgénique efficace et stable dans les cellules de l'EPR (Kreppel et al., 2002). Néanmoins, ils ont montré une efficacité beaucoup plus limitée pour les

photorécepteurs, et restent peu utilisés en raison des difficultés inhérentes à leur méthode de production (Wu et al., 2011).

Les virus AAV sont des petits virus de la famille des Parvoviridae, virus non enveloppés dont le génome est formé d'ADN simple brin de 4,7 Kb. Il porte plusieurs gènes viraux, placés entre deux répétitions terminales inversées palindromiques (ITR), codant les protéines non structurales (Rep) et les protéines de la capsid (VP). Les protéines Rep régulent chaque phase du cycle de vie de l'AAV tel que l'encapsidation de l'ADN mature, tandis que les protéines VP constituent les 60 sous-unités de la capsid qui forme un icosaèdre d'environ 25 nm de diamètre. De manière générale, l'infection par un virus adéno-associé commence par une adhésion aux récepteurs cellulaires suivie d'une internalisation par endocytose à travers des récepteurs secondaires. Suite à son transport endosomal et cytoplasmique, le virus est ensuite décapsidé et libère son ADN à l'intérieur du noyau. En l'absence d'un virus auxiliaire, l'AAV entre dans son cycle latent au cours duquel le génome du virus peut être intégré dans le chromosome 19 humain au niveau du locus AAVS1, ou persister dans la cellule sous forme épisomale (Warrington et Herzog, 2006). En effet, les AAV nécessitent la présence d'un virus auxiliaire, tel qu'un adénovirus ou le virus de l'herpès, pour se répliquer. Plus de 100 sérotypes naturels différents d'AAV ont été isolés, et parmi eux 10 ont été plus largement caractérisés et classés. Ils diffèrent sur la composition de leur capsid, par conséquent leur affinité pour les récepteurs de surface est modifiée, déterminant leur tropisme tissulaire et cellulaire (**Figure 33**). Le sérotype 2 (AAV2) est le plus étudié et le mieux caractérisé, ses récepteurs membranaires primaires sont les protéoglycanes à héparane sulfate. C'est un excellent vecteur de transfert de gènes pour la transduction de certaines cellules, comme les cellules de l'EPR ou les cellules ganglionnaires de la rétine. Cependant, il est peu efficace pour la transduction de nombreux autres types cellulaires, tels que les photorécepteurs. De plus, la transduction par ces vecteurs peut potentiellement être bloquée par les anticorps neutralisants, naturellement présents chez l'homme, dirigés contre des épitopes de la capsid virale. Ce sont plus exactement les VP, exposées à la surface du virus, qui déterminent l'ensemble de ces paramètres. Elles sont donc naturellement des cibles intéressantes pour améliorer les propriétés virales des différents sérotypes, augmenter leur tropisme envers un tissu particulier ou obtenir des variants échappant au système immunitaire (Tseng et al., 2014). Ainsi, de nombreux vecteurs recombinants des virus AAV (rAAV) ont été conçus par ingénierie de la capsid afin d'optimiser au maximum les capacités de ce virus comme véhicule thérapeutique. Leurs spécificités peuvent être encore

améliorées en plaçant les gènes vectorisés sous contrôle de promoteurs spécifiques du type cellulaire ciblé, mais aussi en adaptant la voie d'injection des virus si nécessaire.



**Figure 33. Tropisme des différents sérotypes d'AAV.**

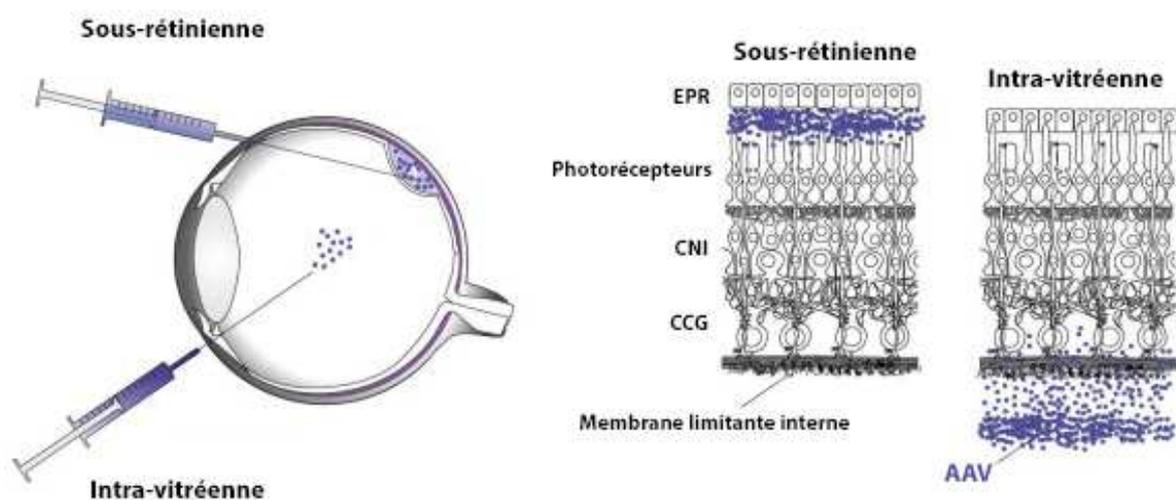
Le tropisme d'un AAV est déterminé par la composition protéique de sa capside. Inspiré de Lannoy et Hermans, 2017.

### ***IV.3. Applications à la rétine***

Les dégénérescences rétiniennes héréditaires, ensemble de pathologies d'origine génétique et cause majeure de cécité dans le monde, regroupent plus de 200 mutations causales identifiées. La majorité de ces mutations touchent les cellules de la rétine externe, plus spécifiquement les cellules de l'EPR et les photorécepteurs, ce qui en font les cibles privilégiées des thérapies géniques actuellement développées.

La spécificité cellulaire du vecteur est déterminée principalement par sa capside, mais la voie d'administration de celui-ci est également un des déterminants majeurs de l'efficacité du transfert de gène. Dans l'œil deux voies sont possibles : la voie intra-vitréenne et la voie sous-rétinienne. Un vecteur est habituellement injecté le plus proche possible du type cellulaire à transduire. Cela signifie que la voie sous-rétinienne sera préférée pour le transfert de gènes à la rétine externe, tandis que la voie intra-vitréenne sera choisie pour cibler la rétine interne (**Figure 34**). Ainsi, la compartimentation de l'œil permet de concentrer les particules virales dans un endroit donné, augmentant la spécificité des cellules ciblées. Mais ce n'est pas le seul avantage

de cet organe, modèle idéal pour les stratégies de thérapie génique. En raison de sa transparence et de son accessibilité, les injections virales sont très simples à réaliser. De plus, grâce aux technologies développées pour l'imagerie *in vivo*, les résultats peuvent être facilement suivis et avec précision. Parce qu'il est un compartiment fermé, dans lequel la rétine neurale est isolée de la circulation sanguine générale via la barrière hémato-rétinienne, il bénéficie d'un avantage immun avec une inhibition locale des réactions inflammatoires potentielles. Enfin, dans le cas de la rétine en particulier, la majorité des cellules sont des neurones post-mitotiques, ce qui signifie que les virus non intégratifs, tels que les AAV, peuvent être utilisés sans craindre de dilution transgénique par division cellulaire, permettant de s'affranchir des risques de mutagenèse par insertion des vecteurs intégratifs.



**Figure 34. Voies d'injection des produits de thérapie génique dans l'œil.**

Dans l'œil deux voies sont possibles : la voie intra-vitréenne et la voie sous-rétinienne. Le choix est déterminé en fonction de la région ciblée, la voie sous-rétinienne sera préférée pour le transfert de gènes à la rétine externe (photorécepteurs et EPR), tandis que la voie intra-vitréenne sera plus adaptée pour cibler la rétine interne (en particulier les cellules ganglionnaires). **EPR** Epithélium Pigmentaire Rétinien ; **CNI** Couche Nucléaire Interne ; **CCG** Couche des Cellules Ganglionnaires ; **AAV** Virus Adéno-Associé. Adapté de Dalkara et Sahel, 2014.

Les premières études visant à induire l'expression de gènes particuliers dans la rétine ont été effectuées avec le sérotype AAV2. Celui-ci a révélé une efficacité de transduction d'une grande population de cellules de la rétine, comprenant les cellules ganglionnaires, les cellules

de Müller, les cellules de l'EPR et les photorécepteurs, qui persiste au moins 80 jours, sans aucun signe de réponse inflammatoire ou de toxicité, après injection sous-rétinienne chez l'adulte. L'expression du gène rapporteur, lacZ ou GFP, peut également être restreinte aux photorécepteurs, en utilisant un promoteur spécifique (Flannery et al., 1997). Ces résultats ont ouvert la voie à de nombreuses recombinaisons de capsides de variants naturels, associées au génome du variant AAV2, pour transduire plus efficacement ou plus spécifiquement certains types cellulaires de la rétine. Parmi eux, plusieurs ont démontré un tropisme préférentiel pour les photorécepteurs et les cellules de l'EPR :

- rAAV2/5 : transduit spécifiquement les photorécepteurs et les cellules de l'EPR, mais plus efficacement que AAV2.
- rAAV2/7, rAAV2/8 et rAAV2/9 : transduisent également très efficacement l'EPR et les photorécepteurs chez les souris. Associés au promoteur de *CMV*, ces derniers présentent une distribution et un niveau d'expression similaires à celui de rAAV2/5, mais rAAV2/9 est également capable de cibler les cellules gliales de Müller. Combinés au promoteur de *RHO*, rAAV2/7 et rAAV2/8 permettent une expression du transgène six à huit fois plus importante qu'avec les rAAVs les plus efficaces pour transduire les cellules photoréceptrices de rétine de souris (Allocca et al., 2007). L'utilisation du rAAV2/8 pour transduire efficacement les photorécepteurs à ensuite été démontrée chez le porcelet, les chien et les primates non humains (Stieger et al., 2008 ; Vandenberghe et al., 2011 ; Natkunarajah et al., 2008).

Une nouvelle stratégie combinant l'évolution dirigée, qui consiste à mimer le processus naturel de l'évolution mais de façon accélérée *in vitro* en modifiant le génome du virus par différents procédés de mutagenèse aléatoire, et le criblage haut-débit afin de sélectionner le ou les meilleurs variants parmi les millions qui sont générés, s'est révélée redoutablement efficace. Dans le cas de la rétine, la stratégie de l'évolution dirigée a été utilisée avec succès et a permis de créer le variant AAV2.7m8, qui se caractérise par l'insertion d'un peptide de dix acides aminés exposés 60 fois sur la capside du virus. Cette modification apporte au virus des meilleures propriétés de pénétration et un plus large champ d'action puisqu'il est capable de transduire efficacement toutes les couches de la rétine chez le rongeur, y compris les plus externes tels que l'EPR et les photorécepteurs (Dalkara et al., 2013). Chez l'Homme, administré par la voie sous-rétinienne, le variant AAV2.7m8 permet de transduire efficacement les cellules de l'EPR, les photorécepteurs à bâtonnet et les cellules ganglionnaires, et à des doses plus élevées les photorécepteurs à cônes et les cellules bipolaires (Ramachandran et al., 2017).

La thérapie génique oculaire pionnière et la plus célèbre, qui a ouvert la voie, est le remplacement du gène *RPE65* dont les mutations entraînent une forme très sévère de RP, l'amaurose congénitale de Leber. La preuve de principe de la thérapie par remplacement génique a été effectuée chez le chien *RPE65* *-/-*, démontrant une efficacité sur la restauration de la vision à long terme après injection sous-rétinienne d'AAV2 contenant un ADNc *RPE65* sain canin ou humain (Acland et al., 2001 ; 2005). La technique a ensuite été transposée chez l'humain, en utilisant le même variant et la même voie d'injection. Ces essais cliniques se sont révélés sûrs, exempts de complications graves, et efficaces en ce qui concerne les progrès de la vision. Ce traitement de thérapie génique ciblant le gène *RPE65*, est aujourd'hui disponible sur le marché et commercialisé sous le nom Luxturna<sup>TM</sup>.

De nombreux autres essais cliniques de thérapies géniques rétiniennes sont actuellement en cours, basés sur l'utilisation des vecteurs AAV, notamment pour la RP autosomique récessive associée à une mutation du gène *MERTK*, la choroïdémie, et la DMLA.

## Objectifs

Les pathologies rétiniennes cécitantes d'origine génétique, telles que les RP, concernent environ un individu sur 3000 à travers le monde et sont généralement associées à une perte des neurones photosensibles, les photorécepteurs, et pour certaines d'une altération des cellules de l'EPR. De nombreux modèles animaux, porteurs de mutations similaires, ont été développés notamment chez le rongeur, afin d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent ces pathologies. Si ces modèles sont d'une utilité incontestable, la transposition des mécanismes mis en évidence dans le cadre de la pathologie humaine pose parfois des difficultés (absence ou différence de phénotype) liées principalement à l'anatomie et la fonctionnalité spécifiques de l'œil humain.

Une approche alternative très prometteuse consiste à reprogrammer des cellules somatiques humaines, issues de biopsies de patients souffrant de RP, en cellules iPS. La génération de cellules ou tissus (organoïdes) rétiniens dérivés de ces cellules iPS offre l'opportunité d'étudier les effets directs d'une déficience génique à l'origine d'une pathologie dans un système humain *in vitro*. Ces modèles peuvent également participer activement au développement de stratégies thérapeutiques innovantes afin de palier à l'absence actuelle de traitement.

Nous avons établi au sein de notre équipe plusieurs lignées de cellules iPS humaines issues de personnes non atteintes ("sains") et de patients atteints de RP, et validé un protocole de différenciation robuste permettant de générer à partir de cellules iPS humaines, simultanément des cellules de l'EPR et des structures tridimensionnelles auto-organisées (organoïdes rétiniens) contenant l'ensemble des types cellulaires de la rétine neurale (Reichman et al. 2014 et 2017).

Mon projet de doctorat s'inscrit dans une approche globale de modélisation des pathologies de type RP à partir de cellules iPS, avec la mise au point de stratégies de thérapies géniques.

Il s'organise plus précisément autour des objectifs suivants :

1. Optimisation du protocole de différenciation des cellules iPS en organoïdes rétiniens, afin de favoriser la maturation des photorécepteurs (formation de segments externes), et ainsi suivre plus précisément la dégénérescence des photorécepteurs.
2. Validation de l'approche de modélisation basée sur l'utilisation d'organoïdes rétiniens

dérivés de cellules iPS de patients atteints de RP portant une mutation bien caractérisée dans le gène *RHODOPSINE*.

3. Modélisation d'une forme de RP liée à des mutations du gène *PRPF31*, codant pour un facteur d'épissage, à partir des cellules iPS :
  - Caractérisation phénotypique des photorécepteurs et des cellules de l'EPR.
  - Création de lignées cellulaires iPS isogéniques via l'outil moléculaire CRISPR/Cas9.
  - Identification de gènes différentiellement exprimés et/ou épissés dans les cellules rétinienne dérivées de cellules iPS portant une mutation dans *PRPF31*.
  - Validation d'un mécanisme d'haploinsuffisance en corrélant le phénotype de dégénérescence rétinienne observé et le niveau d'expression de *PRPF31*
4. Mise au point d'une approche de thérapie par augmentation génique dans le contexte des mutations dans le gène *PRPF31* :
  - Création de lignées cellulaires iPS « *PRPF31* knock-in » avec CRISPR/Cas9, et caractérisation des cellules rétinienne dérivées.
  - Validation de la thérapie avec l'utilisation de vecteurs viraux AAV sur les cellules rétinienne différenciées à partir des cellules iPS.



# Résultats

## **1. Génération d'organoïdes rétiniens humains pseudo-laminés préservant la structure des photorécepteurs matures afin de modéliser au mieux les dégénérescences rétiniennes de type RP.**

La technologie des cellules iPS est particulièrement attrayante pour les dystrophies rétiniennes héréditaires, telles que les RP, qui affectent plus de 1,5 million de personnes dans le monde. Bien que les rétines de modèles animaux de RP puissent être utilisées pour étudier certains aspects de la pathologie, elles ne présentent pas toujours toutes les caractéristiques de la maladie humaine. Ainsi, les cellules rétiniennes dérivées de cellules iPS spécifiques d'un patient peuvent être utilisées pour explorer et comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires liés à la présence de mutations spécifiques. Pour cela, il est indispensable d'utiliser des protocoles de différenciation robustes, normalisés, et permettant de générer les types cellulaires d'intérêts avec une structure au plus proche de celle observée *in vivo*.

En me basant sur le protocole de différenciation préalablement établi dans l'équipe (Reichman et al., 2014 ; Reichman et al., 2017) permettant de générer, par un système d'auto-formation, des structures neuro-rétiniennes en trois dimensions qui contiennent des progéniteurs rétiniens capables de se différencier de façon séquentielle dans l'ensemble des types cellulaires de la rétine neurale, j'ai pu améliorer la structure des organoïdes obtenus et ainsi rendre possible la formation des segments externes de photorécepteurs. Ce protocole de maturation rétinienne optimisée se caractérise sur le plan chimique par la présence de sérum, et d'un taux de glucose élevé. Sur le plan technique, les organoïdes sont isolés, un seul par puit, et placés dans des plaques de culture de très faible adhérence afin d'éviter les fusions entre organoïdes ou leur adhérence, qui désorganisent complètement ces structures. La caractérisation de ces organoïdes a permis de mettre en évidence la présence de tous les types cellulaires de la rétine neurale, avec une cinétique d'apparition proche de celle observée au cours du développement de la rétine *in vivo*, et une architecture qui se dessine désormais de manière laminaire et non en rosette. Trois étapes successives dans l'organisation structurale des organoïdes rétiniens peuvent ainsi être décrites :

- De 35 à 40 jours, les organoïdes précoces sont constitués d'un neuro-épithélium contenant très majoritairement des progéniteurs rétiniens en prolifération.

- Entre 60 et 100 jours, les organoïdes intermédiaires présentent une séparation nette entre une couche nucléaire externe et une couche nucléaire interne présomptives, correspondant respectivement à la différenciation des photorécepteurs et des populations de neurones de la rétine interne.
- Après 150-175 jours, les organoïdes matures exposent à leur périphérie des photorécepteurs de type cônes et bâtonnets pouvant atteindre un stade avancé de développement, comme l'illustre la formation de segments internes et de segments externes.

Cette maturation avancée des photorécepteurs soutient non seulement la possibilité d'utiliser des organoïdes rétiniens pour étudier le développement des photorécepteurs, mais offre également une nouvelle opportunité pour la modélisation des maladies, en particulier pour les maladies rétiniennes héréditaires affectant ces cellules.

J'ai réalisé la mise au point de ce protocole sur une lignée iPS reprogrammée à partir de cellules gliales de Müller par Amélie Slembrouck-Brec.

L'ensemble de ces résultats est rapporté dans l'article présenté ci-après intitulé « Reprogramming of adult retinal Müller glial cells into human-induced pluripotent stem cells as an efficient source of retinal cells » par A. Slembrouck-Brec\*, A. Rodrigues\* et al., publié dans *Stem Cells International*, le 15 juillet 2019 (\*co-premiers auteurs).

## Research Article

# Reprogramming of Adult Retinal Müller Glial Cells into Human-Induced Pluripotent Stem Cells as an Efficient Source of Retinal Cells

Amélie Slembrouck-Brec,<sup>1</sup> Amélie Rodrigues,<sup>1</sup> Oriane Rabesandratana,<sup>1</sup> Giuliana Gagliardi,<sup>1</sup> Céline Nanteau,<sup>1</sup> Stéphane Fouquet,<sup>1</sup> Gilles Thuret,<sup>2</sup> Sacha Reichman,<sup>1</sup> Gael Orioux,<sup>1</sup> and Olivier Goureau <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, F-75012 Paris, France

<sup>2</sup>Biologie, Ingénierie et Imagerie de la Greffe de Cornée, EA2521, Faculté de Médecine, Université Jean Monnet, Saint-Etienne, France

Correspondence should be addressed to Olivier Goureau; [olivier.goureau@inserm.fr](mailto:olivier.goureau@inserm.fr)

Academic Editor: Holm Zaehres

Copyright © 2019 Amélie Slembrouck-Brec et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The reprogramming of human somatic cells to induced pluripotent stem cells (iPSCs) has broad applications in regenerative medicine. The generation of self-organized retinal structures from these iPSCs offers the opportunity to study retinal development and model-specific retinal disease with patient-specific iPSCs and provides the basis for cell replacement strategies. In this study, we demonstrated that the major type of glial cells of the human retina, Müller cells, can be reprogrammed into iPSCs that acquire classical signature of pluripotent stem cells. These Müller glial cell-derived iPSCs were able to differentiate toward retinal fate and generate concomitantly retinal pigmented epithelial cells and self-forming retinal organoid structures containing retinal progenitor cells. Retinal organoids recapitulated retinal neurogenesis with differentiation of retinal progenitor cells into all retinal cell types in a sequential overlapping order. With a modified retinal maturation protocol characterized by the presence of serum and high glucose levels, our study revealed that the retinal organoids contained pseudolaminated neural retina with important features reminiscent of mature photoreceptors, both rod and cone subtypes. This advanced maturation of photoreceptors not only supports the possibility to use 3D retinal organoids for studying photoreceptor development but also offers a novel opportunity for disease modeling, particularly for inherited retinal diseases.

## 1. Introduction

Human pluripotent stem cells (PSCs) represent a valuable tool to study human neuronal development and neurodegenerative diseases and to develop future stem cell-based therapies [1]. As concerns the retina, both human embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs) have been shown to be able to produce retinal cells [2–7], including retinal ganglion cells, photoreceptors, and retinal pigmented epithelial (RPE) cells, corresponding to the major cell types affected in the most common retinal degenerative diseases. The differentiation of human PSCs toward the retinal lineage has evolved considerably in the last few years, and

several innovative protocols allowing the self-formation of 3D retinal organoids have been reported [8–16].

Many types of somatic cells, such as skin fibroblasts, blood cells, keratinocytes, or urine-derived cells, have been successfully used for reprogramming and the production of human iPSCs [1, 17]. Due to their high availability through noninvasive and routine sampling in clinical settings, blood and urine-derived cells have been considered as a preferred source for reprogramming. Nevertheless, independently of the initial somatic identity of reprogrammed cells, human iPSCs can be guided to differentiate into retinal organoids with relatively similar efficiency using different retinal differentiation protocols [11, 18–21]. Recently, Wang et al. reprogrammed four

different neuronal cell types (rod photoreceptors, cone photoreceptors, bipolar cells, and amacrine/horizontal cells) from early and late postnatal mouse retina into iPSCs and further differentiated them into retinal organoids [22]. Mouse Müller glial cells (MGCs), which originate from the same pool of retinal progenitors as retinal neurons, can also be reprogrammed to pluripotency with high efficiency and can be guided to differentiate into retinal organoids [22]. Even though no data regarding the reprogramming of human retinal cells has been reported, human glial cells such as astrocytes isolated from cerebellar tissue can be efficiently reprogrammed into iPSCs and further differentiated into different neural cell types [23, 24].

Here, we report the generation of iPSCs from human MGCs. By applying our multistep retinal differentiation protocol [19], we differentiated human MGC-derived iPSCs into pseudolaminated retinal organoids that contained all major retinal cell types.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Human Postmortem Tissue and Müller Glial Cell Cultures.** Postmortem eye tissues were collected within 24 h after death from bodies donated to science (Laboratory of Anatomy, Faculty of Medicine of St-Etienne, France) in accordance with the French bioethics law. Handling of donor tissues adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki of 1975 and its 1983 revision in protecting donor confidentiality.

The retina was dissected from globes by circumferential hemisection behind the ora serrata to gently remove the anterior segment including lens. The retina was carefully separated from the vitreous by transection of the papillary head and around the peripheral regions and transferred into a CO<sub>2</sub>-independent medium (Thermo Fisher Scientific). After removing the major blood vessels, the retina was chopped into small fragments (<2 mm<sup>2</sup>) and cells dissociated as previously described [25, 26] with some modifications. After 3 washes in Ringer's solution (NaCl 155 mM; KCl 5 mM; CaCl<sub>2</sub> 2 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM; HEPES 10 mM; and glucose 10 mM), retinal fragments were dissociated with pre-activated papain at 31.8 U/mg (Worthington) in Ringer's solution during 30 min at 37°C. Digestion was arrested by the addition of 1 ml of DMEM (Thermo Fisher Scientific) containing 10% of fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific) and 25 µg/ml of DNase1 (Sigma-Aldrich). The cells were homogeneously suspended with gentle up and down pipetting in prewarmed DMEM with 10% FBS and 10 µg/ml gentamycin (MGC-medium) and seeded in 6 cm dishes previously coated with Poly-D-Lysin at 2 µg/cm<sup>2</sup> and Laminin at 1 µg/cm<sup>2</sup> (Sigma-Aldrich). Dissociated cells were incubated at 37°C in a standard 5% CO<sub>2</sub>/95% air incubator, and medium was left unchanged for 3 to 5 days and then renewed every 2 to 3 days. By the end of the first week in culture, large flattened glial cells were observed with few neuron-like cells scattered on the glial surface. Mitotic glial cells became confluent within 10 to 14 days after plating. At this time, cells were passaged by a brief incubation in TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific) and banked (cryopreservation in FBS-10% DMSO) or seeded in 6-well

plates previously coated with Poly-D-Lysin and Laminin for reprogramming.

**2.2. Human Müller Glial Cell Reprogramming and Validation.** Human MGCs at passage 1 were transduced using the CytoTune Sendai reprogramming vectors Oct4, Klf4, Sox2, and c-Myc (Thermo Fisher Scientific) and cultured for 6 days in the MGC-medium before plating on mitomycin human foreskin- (MHF-) seeded dishes. The day after, the MGC-medium was replaced with the iPS medium, corresponding to the ReProStem medium (ReproCELL, Ozyme) supplemented with 10 ng/ml of human recombinant FGF2 (PeproTech, France). The emergent human iPSC colonies were picked under a stereomicroscope according to their human ESC-like colony morphology and expanded on MHF feeder layers. After generation of a frozen stock, human iPSCs were cultured on MHF feeder layers and subsequently adapted to feeder-free conditions on truncated recombinant human vitronectin-coated dishes with Essential 8™ medium (both from Thermo Fisher Scientific) as previously described [19]. Cells were routinely cultured at 37°C in a standard 5% CO<sub>2</sub>/95% air incubator with a daily medium change and passaged with the enzyme-free Gentle cell dissociation reagent (Thermo Fisher Scientific) every week. The undifferentiated state of iPSC colonies was characterized by alkaline phosphatase expression as previously described [11]. Between twelve and sixteen passages, the clearance of the exogenous reprogramming factors and Sendai virus genome was confirmed by qPCR following the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific). At the same time, conventional cytogenetic analysis and *in vivo* pluripotency analysis by teratoma formation assay were performed as described previously [11]. The genomic integrity was confirmed by SNP genotyping (IntegraGen Genomics).

**2.3. Retinal Differentiation and Human iPSC-Derived Retinal Cell Cultures.** Retinal cell differentiation was based on our previously established protocol with adherent human iPSC [11, 27]. iPSCs derived from human MGCs cultured in Essential 8™ medium were switched in chemical-defined Essential 6™ medium (Thermo Fisher Scientific). After 2 days, iPSCs were cultured in the E6N2 medium composed of Essential 6™ medium, 1% N2 supplement (Thermo Fisher Scientific), 10 units/ml Penicillin, and 10 µg/ml Streptomycin (Thermo Fisher Scientific). The medium was changed every 2-3 days. Around Day 28 (D28), identified self-formed retinal organoids were isolated, using a needle, with the surrounding cells and cultured as floating structures in the ProB27 medium supplemented with 10 ng/ml of recombinant human FGF2 (PeproTech), and half of the medium was changed every 2-3 days. The ProB27 medium is composed of chemical-defined DMEM:Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12, 1:1, L-glutamine), 1% MEM nonessential amino acids, 2% B27 supplement (Thermo Fisher Scientific), 10 units/ml Penicillin, and 10 µg/ml Streptomycin. At D35, retinal organoids were cultured in the absence of FGF2 in the ProB27 medium with 10% FBS and 2 mM of Glutamax for the next several weeks. To evaluate maturation of photoreceptors, at D84, the retinal organoids were cultured in the

ProB27 medium with 2% B27 supplement without vitamin A (Thermo Fisher Scientific) until D200.

For human iPSC-derived RPE cell cultures, identified pigmented patches were cut around D42 and transferred, noted as passage 0 (P0), onto plates coated with Geltrex (Thermo Fisher Scientific). Human iPSC-derived RPE cells were expanded in the ProN2 medium composed of DMEM/F12, 1% MEM nonessential amino acids, 1% N2 supplement, 10 units/ml Penicillin, and 10  $\mu$ g/ml Streptomycin and passaged or banked as previously described [19, 27].

**2.4. Cryosection.** For cryosectioning, retinal organoids were fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde (PAF) at 4°C and washed in phosphate-buffered saline (PBS). Structures were incubated at 4°C in PBS/30% sucrose (Sigma-Aldrich) solution during at least 2 hrs and embedded in a solution of PBS, 7.5% gelatin (Sigma-Aldrich), 10% sucrose, and frozen in isopentane at -50°C. 10  $\mu$ m thick cryosections were collected in two perpendicular planes.

**2.5. Immunostaining and Imaging on Retinal Sections and Dissociated Cells.** Dissociated cells were fixed with 4% PAF in PBS for 10 min before immunostaining. Sections and fixed dissociated cells were washed with PBS; nonspecific binding sites were blocked for 1 hr at room temperature with a PBS solution containing 0.2% gelatin and 0.1% Triton X-100 (blocking buffer) and then overnight at 4°C with the primary antibody (Table S1) diluted in blocking buffer. Slides were washed three times in PBS with 0.1% Tween and then incubated for 1 hr at room temperature with appropriate secondary antibodies conjugated with either Cy3, Alexa Fluor 488, 594, or 647 (Interchim) diluted at 1:600 in blocking buffer with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) diluted at 1:1000 to counterstain nuclei. Fluorescent staining signals were captured with an Olympus FV1000 confocal microscope.

**2.6. Retinal Organoid Immunostaining-Clearing and Imaging.** Retinal organoids were fixed with 4% PAF in PBS for 30 to 60 min before immunostaining with a PBS solution containing 0.2% gelatin, 0.5% Triton X-100, and 0.01% thimerosal (Sigma-Aldrich) as previously described [11]. Samples were next submitted to the 3D imaging of solvent-cleared organ (3DISCO) clearing procedure [19]. 3D imaging was performed with an inverted confocal microscope (Olympus FV1200) with numerical objectives for high-resolution imaging. Images, 3D volume, and movies were generated with Imaris x64 software (version 7.6.1, Bitplane) using the “snapshot” and “animation” tools.

**2.7. RNA Extraction and TaqMan Assay.** Total RNAs were extracted using the NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel) and cDNA synthesized using the QuantiTect reverse transcription kit (Qiagen) following the manufacturer’s recommendations. qPCR analysis was performed with custom TaqMan® Array 96-Well Fast plates (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer’s protocol. All primers and MGB probes labeled with FAM for amplification were purchased from Thermo Fisher Scientific (Table S2). Results were normalized against 18S, and quantification of gene

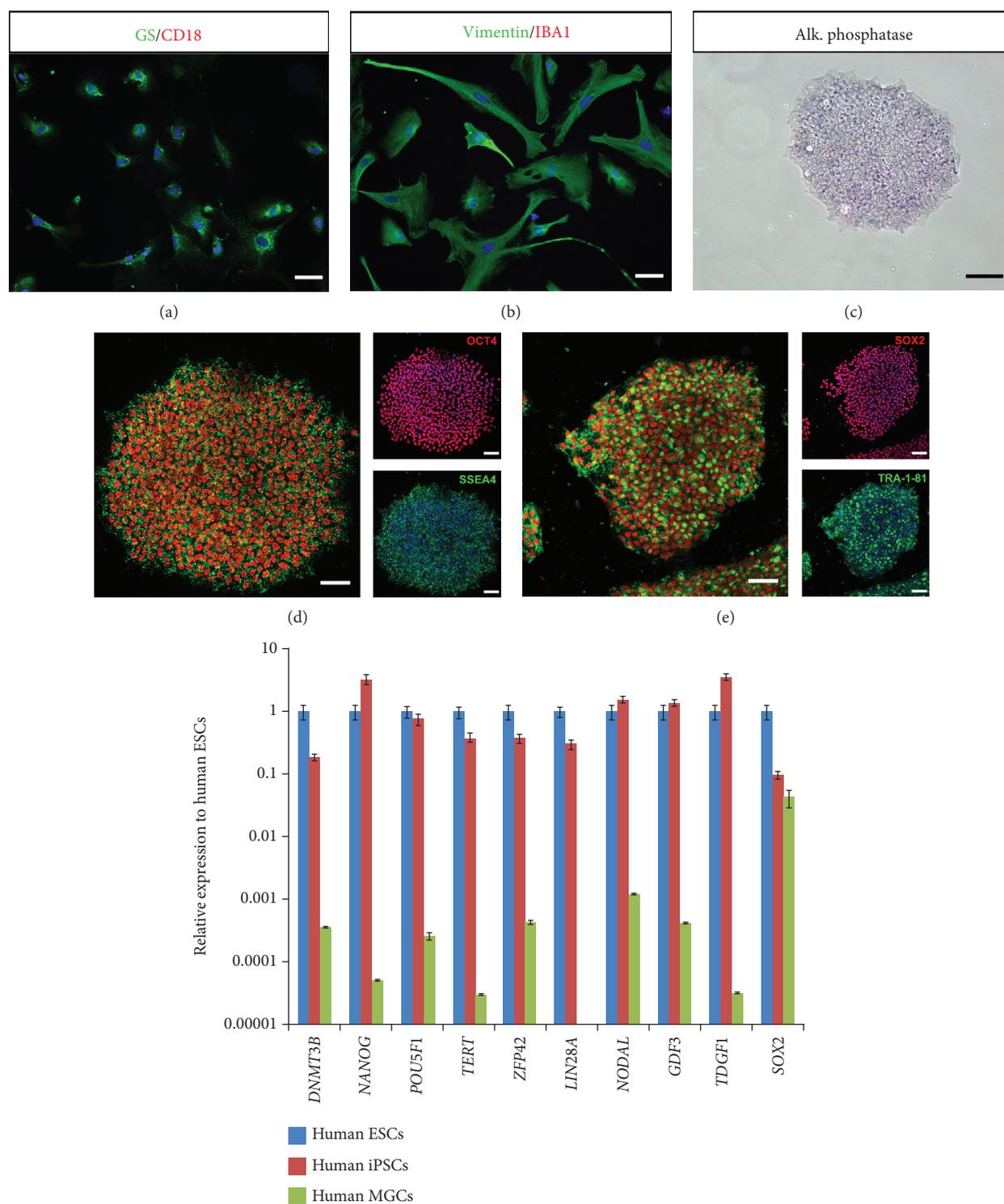
expression was based on the deltaCt method in minimum three independent biological experiments.

**2.8. Phagocytosis Assay.** Photoreceptor outer segments (POS) phagocytosis assay was performed as previously described [19]. Briefly, four weeks after plating confluent, human iPSC-derived RPE cells were challenged for 3 hrs with  $1 \times 10^6$  FITC-labeled POS before the detection of surface-bound and internalized FITC-POS particles. For exclusive detection of internalized particles, the fluorescence of surface-bound FITC-POS was selectively quenched by incubation in 0.2% trypan blue before cell fixation in ice-cold methanol. Following rehydration, cells were incubated with DAPI for nuclei counterstaining. Fluorescent signals were quantified with the Infinite M1000 Pro (Tecan). The immortalized rat RPE cell line RPE-J was used as a positive control for phagocytic activity.

### 3. Results

**3.1. Derivation of iPSCs from Human Müller Cells.** Retinal cells were dissociated from human postmortem retina and were seeded into tissue culture plates and left to develop as monolayer culture for one week in culture conditions previously described to favor glial cell culture while eliminating other cell types [25]. After one passage, immunostaining of the cells with anti-Vimentin and anti-Glutamine Synthase (GS) antibodies revealed homogenous labeling throughout the cytoplasm of the cells, consistent with a MGC phenotype (Figures 1(a) and 1(b)). In contrast, markers of microglia and monocytes/macrophages such as ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1) and CD18 were absent (Figures 1(a) and 1(b)). We investigated the potential of human MGCs to be reprogrammed into PSCs using the four reprogramming factors OCT3/4, SOX2, CMYC, and KLF4 delivered using nonintegrative Sendai viruses previously used for dermal fibroblast reprogramming [28]. Emerging iPSC colonies were detectable between 10 and 15 days after transduction, and around 10 colonies were picked up and expanded for at least 5 passages before being adapted in feeder-free conditions (vitronectin coating). Expanded human iPSC colonies displayed alkaline phosphatase activity as shown in Figure 1(c) for one clone (iPSC line-5f). Immunofluorescence analysis of human iPSC line-5f revealed the coexpression of transcription factors OCT4 and SOX2, and surface markers SSEA4 and TRA1-81 (Figures 1(d) and 1(e)), characteristic of pluripotent stem cells. RT-qPCR revealed that the expression of pluripotency genes markedly increased over the respective human MGC population and was similar with that seen in human ESCs (Figure 1(f)).

Human iPSC line-5f could be differentiated *in vivo* into derivatives of all three germ layers, as shown by teratoma formation in NSG mouse (Figures S1A-S1B) and exhibited a normal karyotype after 15 passages (Figure S1C). The clearance of the vectors and the exogenous reprogramming factor genes was confirmed by qPCR after 15 passages (Figure S1D). Furthermore, genomic integrity of the iPSC line-5f was confirmed by SNP genotyping (Figure S1E).



(f)

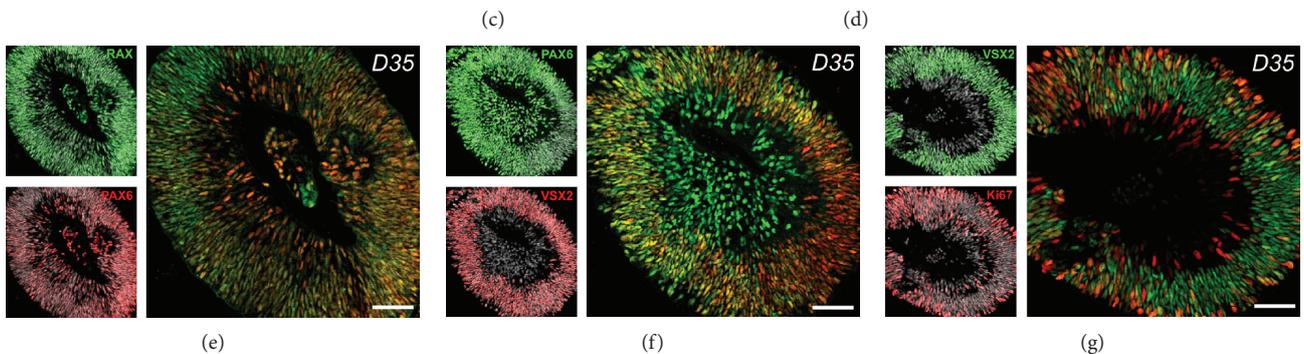
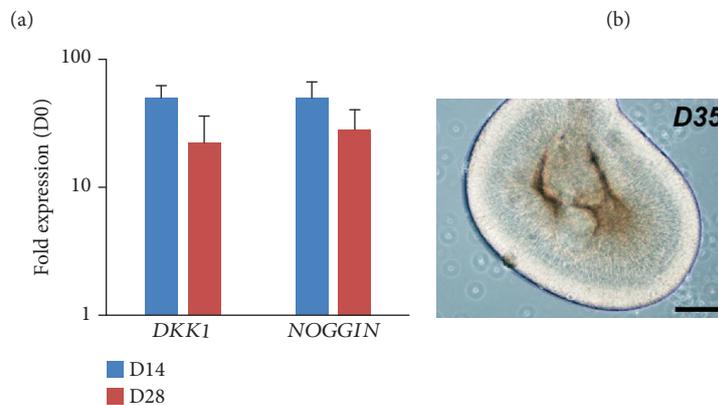
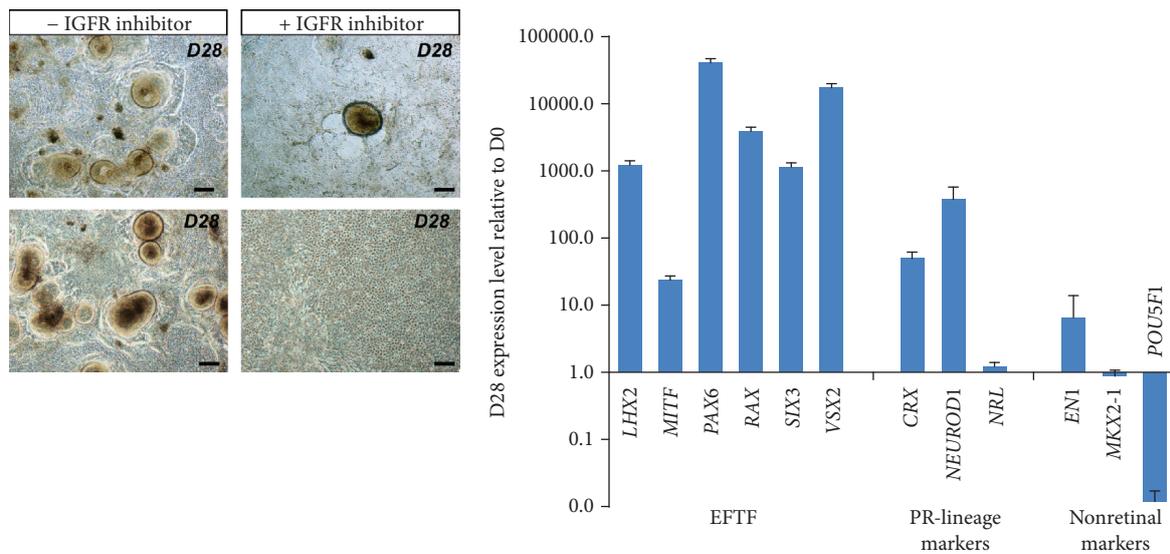
FIGURE 1: Derivation and characterization of iPSCs from human MGCs. (a-b) Characterization of human MGCs by immunostaining with glial (GS and Vimentin) and microglial (CD18 and Iba1) markers. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Note the absence of staining with microglial markers as expected. (c) Positive alkaline phosphatase staining of human iPSC-5f derived from human MGCs at P10. (d-e) Immunofluorescence of pluripotency markers (SSEA4, OCT4, TRA1-81, and SOX2) for iPSC-5f at P15. (f) qRT-PCR analysis of pluripotency and self-renewal markers in human ESCs, iPSC-5f, and human MGCs. Data are normalized to human ESCs (scale bars: a, b, d, e, 60  $\mu\text{m}$ ; c, 200  $\mu\text{m}$ ).

**3.2. Induction of Human MGC-Derived iPSCs toward Retina Cell Fates.** Based on our retinal differentiation protocol in xeno-free/feeder-free conditions [19, 27], we first evaluated the ability of overgrowing human MGC-derived iPSCs to give rise to neuroepithelial-like structures that could acquire an eye field (EF) fate. As previously reported for iPSCs derived from dermal fibroblasts, self-forming neuroepithelial-like structures can be observed about 4 weeks after the initiation of differentiation (Figure 2(a)). RT-qPCR analysis demonstrated that cells of 28-day-old (D28) structures expressed EF transcription factors, such as *LHX2*, *MITF*, *PAX6*, *RAX*, *SIX3*, and *VSX2*, while losing the expression of the pluripotency marker *POU5F1*, and showed low or no expression of forebrain and midbrain markers, such as *EN1* and *NKX2-1* (Figure 2(b)). Interestingly, the expression of transcription factors involved in the photoreceptor lineage, such as *CRX*, *NRL*, and *NEUROD1*, was also detected (Figure 2(b)). In previously published 3D induction protocols, inhibition of Wnt and BMP/TGF $\beta$  pathways contributed to directing human PSCs to a retinal identity [7, 16]. In our protocol, RT-qPCR analysis demonstrated that differentiating human MGC-derived iPSCs expressed *DKK1* and *NOGGIN*, endogenous antagonists of Wnt and BMP, respectively (Figure 2(c)). In these conditions, inhibition of BMP/TGF and Wnt functions could occur in the absence of exogenous inhibitors, enabling the formation of neuroepithelial structures after 14 days. Activation of the insulin/insulin-like growth factor-1 signaling pathway has been also reported to contribute to directing pluripotent stem cells toward a retinal identity [13, 16]. To test the possible role of this signaling pathway, we added the pharmacological inhibitor (OSI-906) of insulin and insulin-like growth factor-1 receptor signaling to the E6N2 medium at day 2. In this condition, very rare neuroepithelial-like structures were observed after 28 days compared to the control conditions (Figure 2(a)). All these results suggested that the activation of the insulin/IGF-1 pathway and endogenous production of Wnt and BMP antagonists could explain the self-formation of these structures. After mechanical detachment at D28, structures were collected for further culture in suspension in the presence of FGF2 for one week to favor the differentiation of the neural retina (Figure 2(d)). Coexpression of *RAX* and *PAX6* detected by immunostaining of sections from D35 organoids (after one week in floating culture) confirmed the EF identity of the organoids (Figure 2E). *PAX6*-positive cells located in the outer part of the developing neuroepithelium also expressed the retinal progenitor cell marker *VSX2* (Figure 2(f)). At D35, many *VSX2*-positive cells were still mitotic as revealed by the Ki67 proliferation marker staining (Figure 2(g)), confirming the retinal progenitor cell phenotype of these cells.

**3.3. Formation of Retinal Organoids from Human MGC-Derived iPSCs.** During retinal development, multipotent retinal progenitors can give rise to all retinal cell types in a defined overlapping chronological order with early-born cell types like retinal ganglion cells (RGCs) and horizontal/amacrine cells and late-born cell types including bipolar cells and MGCs. Regarding photoreceptors, cones are mostly pro-

duced during early stages of retinal development, whereas rods are generated later [29, 30]. To assess the identity of differentiating retinal cells within organoids, immunohistochemistry was performed on sections after different periods in floating culture conditions, based on our previous retinal differentiation protocol (see Section 2.3 for details). At D56, *BRN3A*-positive RGCs were scattered throughout the organoid with a higher concentration at the innermost part of the forming neural retina (Figure 3(a)), while cells committed toward photoreceptor lineage expressing *CRX* and Recoverin (*RCVRN*) were found on the opposite side of the structure, in the external part of the retinal organoids (Figures 3(a)-3(c)). Sparse horizontal cells expressing transcription factor *LHX1* can also be detected at the same time (Figure 3(b)). Immunostaining of D56 retinal organoid sections with the exclusive markers *CRX* for photoreceptors and *PAX6* for early-born nonphotoreceptor cells (RGCs, amacrine/horizontal cells) showed that *PAX6*-positive neurons and *CRX*-positive photoreceptors started to form two distinct layers (Figure 3(c)). Interestingly, cells displaying the highest level of *PAX6* were found in the most central part of the structure, while in the external part of the retinal organoid, *Pax6*-positive cells displayed a low level of expression of this transcription factor. As time progressed, these two layers can be more distinctly visualized, as shown by the exclusive location of *CRX*-expressing photoreceptors and *PAX6*-positive cells at D100 (Figure 3(d)) and D150 (Figure 3(g)). In addition to displaying a pseudolamination with both presumptive outer nuclear layer (ONL) and inner nuclear layer (INL), retinal organoids also showed organized *PAX6*-positive neurons presented toward the basal surface, where RGCs are located, and also localized in the presumptive INL (Figures 3(d) and 3(e)). Amacrine cells identified by *PAX6* and AP-2 costaining formed a clear nuclear layer at D100, while sparsely distributed *PAX6*-positive/AP-2-negative cells in the apical part of the presumptive INL could correspond to the horizontal cells (Figure 3(e)). The population of *CRX*/Recoverin-positive photoreceptors congregated at the outer part of the retinal organoids (Figure 3(f)), corresponding to the presumptive ONL. Consistent with *in vivo* retinogenesis, late-born bipolar cells can be identified by costaining with *PKC $\alpha$*  and *VSX2* antibodies (Figure 3(h)), demonstrating that our culture conditions allowed the generation of all five types of retinal neurons in organoids. Furthermore, RPCs were also able to differentiate in MGCs, as shown by the presence of cells coexpressing Glutamine Synthase (*GS*) and the transcription factor *SOX9* in D175 retinal organoids (Figure 3(i)).

When retinal organoids from human MGC-derived iPSCs were subjected to differentiation in the ProB27 medium in the absence of FBS and Glutamax, efficient retinal differentiation was still observed with the presence of RGCs expressing *BRN3A* in D56 organoids and photoreceptors identified by Recoverin and *CRX* immunostaining in D56 and D100 organoids (Figure 4). However, organoids failed to display a continuous laminar organization with the neuroepithelial layer mostly developing into small rosettes, where the innermost cells expressed photoreceptor markers, surrounded by *PAX6*-positive nonphotoreceptor cells (Figure 4). This



**FIGURE 2:** Commitment of human MGC-derived iPSCs into retinal lineage. (a) Examples of self-forming neuroepithelial-like structures derived from iPSC-5f at D28 and involvement of IGF-1/insulin signaling in neuroepithelium formation during iPSC differentiation. (b) qRT-PCR analysis of eye-field transcription factors (EFTF), photoreceptor-restricted lineage markers, and nonretinal markers in neuroepithelial-like structures at D28. Data are normalized to iPSC-5f at D0. (c) qRT-PCR analysis of NOGGIN and DKK1 in differentiating iPSC-5f at D14 and D28. Data are normalized to iPSC-5f at D0. (e-g) Immunofluorescence costaining of cryosections from neuroepithelial-like structures at D35 for RAX and PAX6 (e), PAX6 and VSX2 (f), or VSX2 and Ki67 (g). Nuclei were counterstained with DAPI (gray) (scale bars: a and d, 200  $\mu\text{m}$ ; e, f, g, 100  $\mu\text{m}$ ).

phenotype was similar to previously characterized iPSC line (hiPSC-2 clone) derived from human fibroblasts [19]. Interestingly, pseudolaminated retinal organoids can also be obtained from this hiPSC-2 line in the presence of 10%FBS and Glutamax, with similar formation of presumptive ONL, bearing CRX and Recoverin-positive photoreceptors, and

presumptive INL containing PAX6-positive cells, including amacrine cells expressing AP-2 (Figure S2). Cone arrestin (CAR) immunostaining was also restricted to the presumptive ONL (Figure S2), confirming that the generation of pseudolaminated organoids was independent on the iPSC line used as a source for differentiation and was rather due

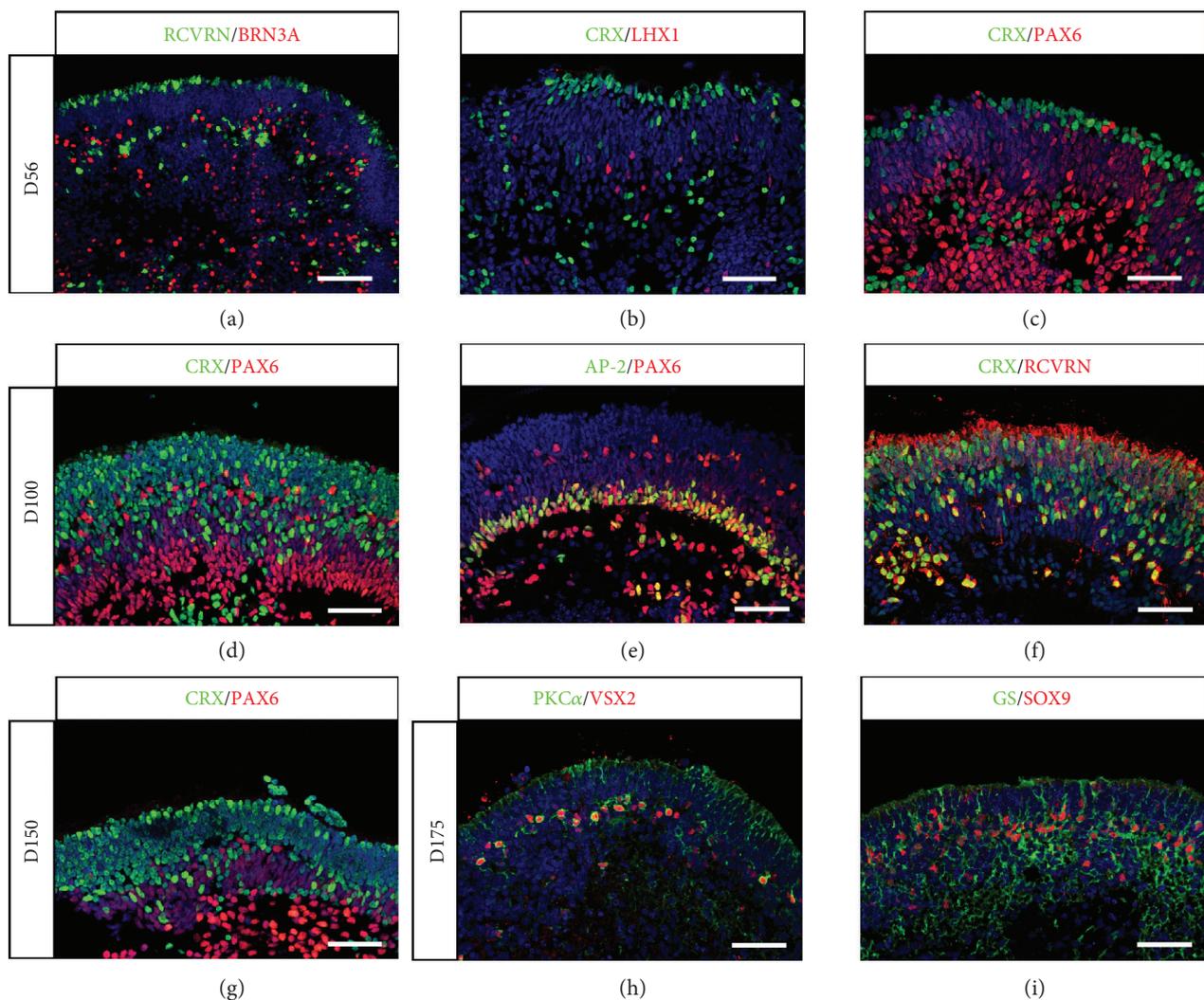


FIGURE 3: Generation of pseudolaminated retinal organoids containing all retinal cell types from human MGC-derived iPSCs. (a-f) Immunofluorescence staining of cryosections from retinal organoids at D56 (a-c) and D100 (d-f) using markers for retinal ganglion cells (BRN3A, PAX6), horizontal cells (LHX1, PAX6), amacrine cells (AP2, PAX6), and photoreceptors (CRX, RCVRN). (g-i) Immunofluorescence staining of cryosections from retinal organoids at D150 (g) and D175 (h, i) using markers for photoreceptors (CRX), bipolar cells (VSX2 and PKC $\alpha$ ), and MGCs (GS and SOX9). Nuclei were counterstained with DAPI (blue) (scale bars: a, 100  $\mu$ m; b-i, 50  $\mu$ m).

to the refinement of our original retinal differentiation protocol [19, 27].

**3.4. Maturation of Rods and Cones in Retinal Organoids.** Next, we sought to study the maturation of photoreceptor precursors, previously identified with CRX staining (Figure 3), in the presence of FBS and Glutamax for long-term culture. Constant application of retinoic acid (RA) has been reported to inhibit cone maturation in zebrafish [31] and recently in mouse PSC-derived retinal organoids [32]. Exogenous RA was never present in our culture conditions. Retinal organoids first cultured with normal B27 supplement containing vitamin A were switched at D84 in the ProB27 medium with B27 supplement without vitamin A to prevent the formation of endogenous RA, one active metabolite of vitamin A. Rods and cones can be clearly identified either by Rhodopsin or by Cone arrestin immunostaining restricted

to the apical presumptive ONL in D175 retinal organoids (Figure 5). Rhodopsin staining was distributed throughout the soma of rods and intensively stained the peripheral region of the presumptive ONL, reflecting the formation of outer segment- (OS-) like structures (Figures 5(b) and 5(c)). The ciliary protein ARL13B presented an expected punctuated labeling pattern closed to the presumptive ONL, indicating the formation of correctly positioned IS and OS-like structures (Figure 5(b)). Both short wavelength Opsin (blue Opsin) and long/medium wavelength Opsin (R/G Opsin) cones were observed with the presence of specific cone pedicle-like structures, apical to the presumptive ONL (Figures 5(d) and 5(e)). To visualize photoreceptors in 3D, we performed high-resolution confocal imaging of immunolabelled D175 whole organoids subjected to 3DISCO clearing procedure [19]. Spatial arrangement of cones characterized by the expression of CRX and cone arrestin was

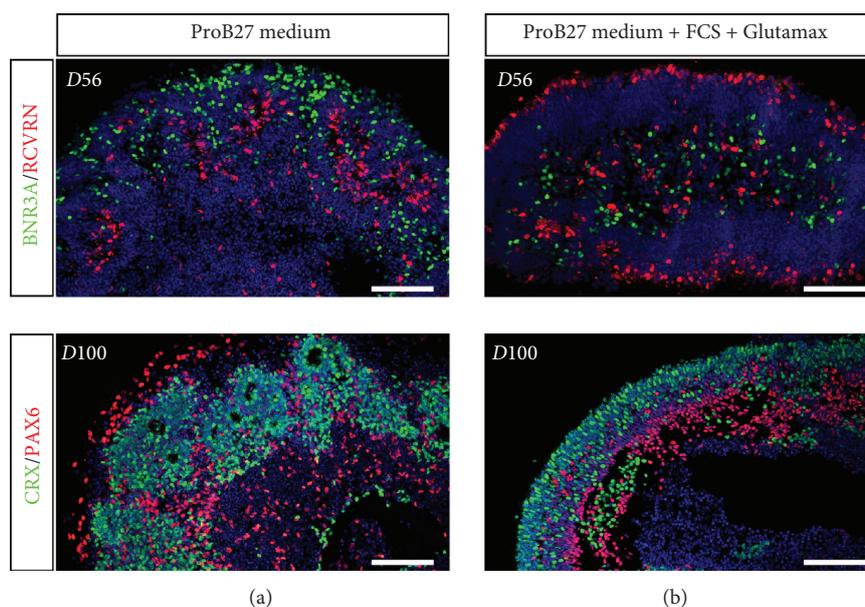


FIGURE 4: Improvement of retinal organoid lamination in the presence of FCS and Glutamax. Immunofluorescence staining of cryosectioned retinal organoids from human MGC-derived iPSCs using markers for retinal ganglion cells (BRN3A, PAX6), amacrine/horizontal cells (PAX6), and photoreceptors (CRX) after 56 and 100 days in floating cultures in the absence (a) or in the presence (b) of 10%FCS and 2 mM Glutamax in the ProB27 medium. Nuclei were counterstained with DAPI (blue) (scale bars: 100  $\mu$ m).

observed on 3D-reconstructed images with unambiguous morphological stubby bud-like cone features (Figures 5(f) and 5(g); Video S1).

**3.5. Generation of RPE Cells from Human MGC-Derived iPSCs.** After removal of retinal organoids and further differentiation of iPSC cultures in proneural medium, pigmented patches of cells appeared around D42 and could be mechanically isolated and spread onto new plates for expansion and amplification. After 4 weeks, pigmented cells formed a confluent monolayer with a cobblestone-shaped morphology (Figure 6(a)) and expressed the RPE-specific transcription factor MITF and the tight junction marker ZO-1 (Figure 6(b)). Z-stack analysis of confocal images showed the expression of Ezrin at the apical side of the cells and basolateral localization of bestrophin (Figures 6(c) and 6(d)), which is consistent with a mature polarized RPE. RT-qPCR studies demonstrated that iPSC-derived RPE cells expressed classic markers of RPE such as *PEDF*, *MERTK*, *RPE65*, and *BEST1* after long-term cultures (Figure 6(e)). We also evaluated the functionality of the iPSC-derived RPE cells by measuring the phagocytosis of fluorescent-labeled photoreceptor outer segments (POS). As shown in Figure 5(f), iPSC-derived RPE cells after one passage were able to phagocytose with an average of  $37.3 \pm 0.07\%$  (mean  $\pm$  SEM;  $n = 3$ ) internalized POS within 3 hours, similar to the control rat RPE-J cell line ( $49.6 \pm 0.02$ ; mean  $\pm$  SEM;  $n = 3$ ).

#### 4. Discussion

In this study, we generated iPSCs from a differentiated cell type isolated from normal human retina and showed that these human iPSCs derived from MGCs can be efficiently dif-

ferentiated toward retinal lineage with simultaneous formation of RPE cells and retinal organoids. Specification and maturation of retinal cells generated from MGC-derived iPSCs follow the same spatial-temporal pattern observed with retinal cells derived from other human somatic-derived iPSCs and consistent with *in vivo* development.

Since all body cells seem to have the potential to become iPSCs, though at different yields, it is not surprising that glial cells from the retina, such as MGCs, can be reprogrammed into iPSCs. Furthermore, MGCs represent the most plastic cell type found in the retina. In cold-blood vertebrate, MGC population constitutes an adult retinal stem cell niche able to dedifferentiate, proliferate, and generate new retinal cells, mainly after activation of the *Ascl1/Lin28* pathway following injury [33, 34]. This physiologic response is absent in mammals but *in vivo* ectopic expression of a specific combination of factors targeting mouse MGCs enabled MGCs to generate functional retinal neurons in different conditions [35, 36], confirming the latent stem cell potential of MGCs even in mammals.

Detailed examination of a variety of iPSCs has shown that these cells can retain some epigenetic memory of the cell of origin that bias their differentiation tendency toward the original cell type [37, 38]. While this phenomenon was obvious in early-passage iPSCs, the differences in epigenetics and differentiation capacities tended to be attenuated after prolonged passages [37, 38]. Other studies have shown that the cell type of origin contributed minimally to iPSC variability and that the variations in differentiation were largely attributable to donor differences rather than to the original cell type [39–41]. Even though no epigenetic characterizations have been done on the iPSCs used in this study, either derived from human MGCs or derived from

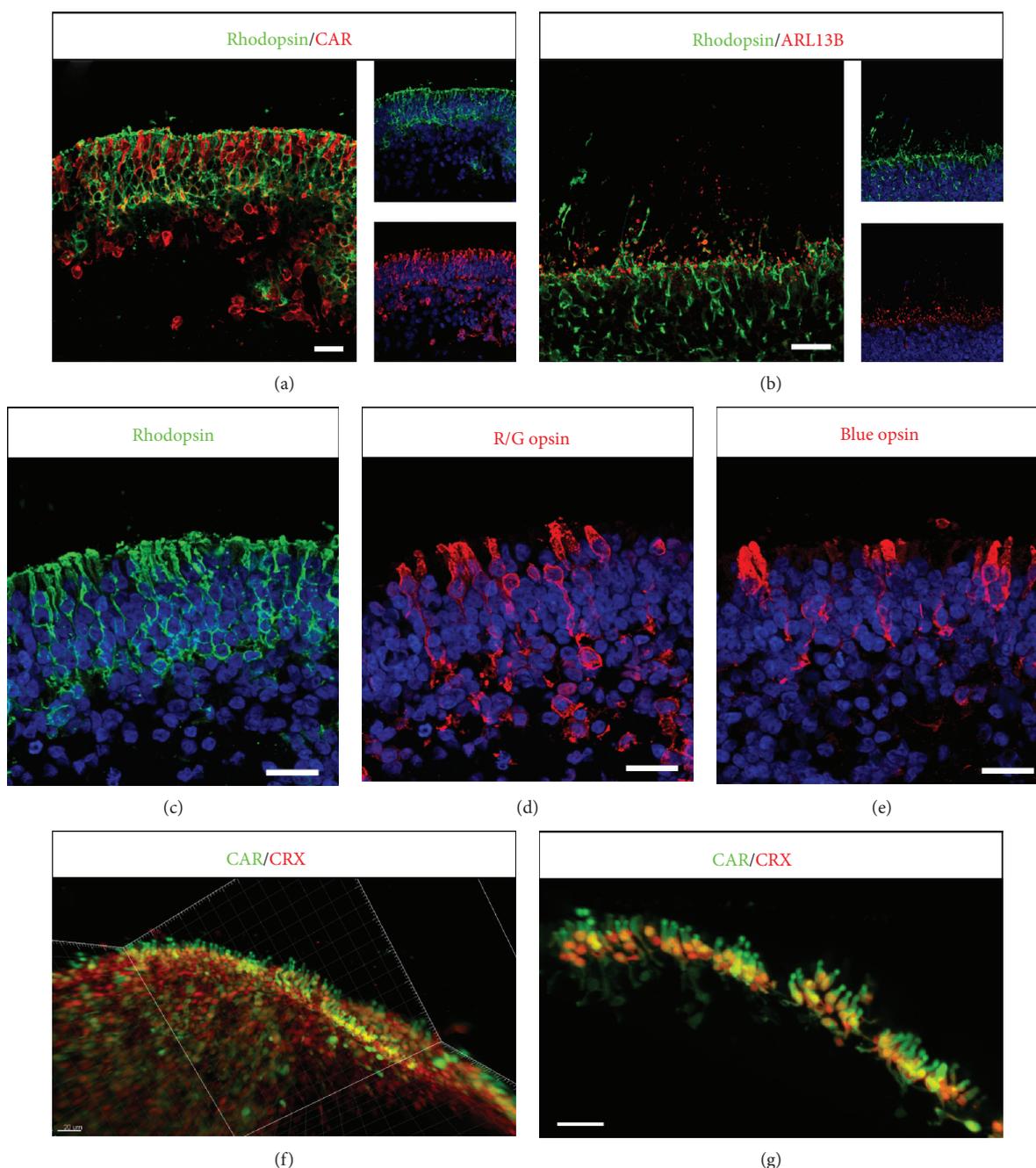


FIGURE 5: Photoreceptor development in retinal organoids from human MGC-derived iPSCs. (a-e) Immunofluorescence staining of cryosections from retinal organoids at D175 using specific photoreceptor markers to identify both rods (Rhodopsin), cones (CAR, R/G Opsin, blue Opsin), and cilia marker (ARL13B). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). (f, g) 3D views of solvent-cleared D175 retinal organoids immunostained for Cone arrestin (CAR) and CRX. (g) High-magnification image of isolated cones from (f) (white frame) with Imaris software (scale bars: 20  $\mu\text{m}$ ).

dermal fibroblasts [11, 19], no major difference in the characteristics of retinal organoids has been observed. In agreement with our observation, Capowski et al. recently reported the ability of human iPSCs derived from fibroblasts or blood cells to generate retinal organoids, demonstrating the reproducibility of retinal organoid generation independently of the starting cell type [21]. A different observation has been made using mouse iPSCs derived from different retinal cell types [42]. These authors showed that rod-

derived iPSCs were more efficient to differentiate into retinal structures containing all retinal cell types compared to structures obtained from iPSCs derived from fibroblasts. The authors hypothesized that epigenetic memory and especially the methylation status of the *Lhx9* gene could explain these differences. Epigenetic differences could be lower between human fibroblasts and human MGCs than between mouse fibroblasts and mouse photoreceptors. However, retinal organoids generated from mouse ESCs or iPSCs by

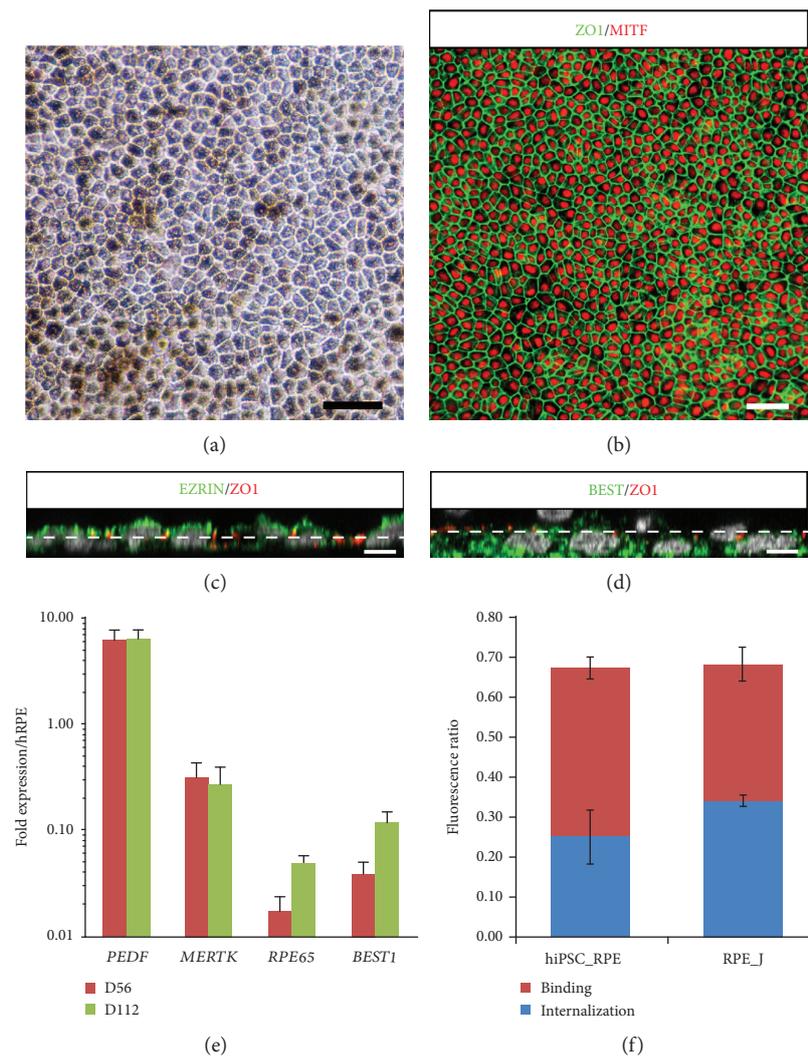


FIGURE 6: Generation of RPE cells from human MGC-derived iPSCs. (a) Phase-contrast images of RPE cells derived from iPSC-5f at passage 1 (P1), four weeks after picking. (b) ZOI and MITF immunostaining of hiPSC-derived RPE cell monolayer four weeks after picking. (c, d) XZ views after orthogonal reconstruction of confocal stacks showing typical polarized expression of BEST1 (basal) and Ezrin (apical), four weeks after picking. Dash line mark out the apical and basolateral compartments according to ZOI labeling. (e) qRT-PCR analysis of mature RPE markers in human iPSC-derived RPE cells at P1 and P2. Data are normalized to control RNA isolated from human adult RPE cells. (f) Evaluation of ratio of FITC/DAPI fluorescence in human iPSC-derived RPE cells at P1 and in control RPE-J cell line after 3 h incubation with FITC-labeled POS to determine RPE cell phagocytic activity; binding and uptake of POS were assayed as described Materials and Methods (scale bars: a, b, 50  $\mu\text{m}$ ; c, d, 5  $\mu\text{m}$ ).

other groups with relatively similar protocols of differentiation never reported a significant impact of the source of cells on the formation of retinal organoids [43–46].

The number of methods for generating 3D retinal cultures from human PSCs has greatly increased in the past five years [11–16, 18–21], all seeking at reproducing, despite few differences, the key steps of retinal development that are highly conserved throughout the vertebrate evolution. Morphological, cellular, and molecular analyses allow to determine the identity and the distribution of retinal cell types at different stages of organoid formation. As in many 3D protocols of differentiation, we can distinguish three successive stages in cultures of differentiating organoids. Early organoids around D35 correspond essentially to expansion of

RPCs within the neuroepithelial cell layer. At intermediate stages (between D50 and D100), a clear separation between presumptive ONL and INL—corresponding to differentiation of photoreceptors and neuron populations of inner retina—could be observed in the majority of organoids. Finally, in late retinal organoids (D150–D175), an advanced stage of photoreceptor development can be obtained, revealed by the formation of IS and OS, within an expected time range regarding human development during which OS formed and elongated between fetal weeks 23 and 30 [47, 48]. However, a progressive disorganization of the inner region of the structures was observed concurrently with the RGC loss that is expected in this type of cultures in the absence of central projection targets. The requirement of

RGCs for proper retinal lamination has been demonstrated in mouse and zebrafish retina, where the developmental ablation of a RGC subpopulation or interfering with the RGC migration and positioning led to a lamination defect [49, 50]. Neuronal migration and lamination play a central role in the building of the retinal laminar architecture [51]. It is likely that human iPSC-derived retinal organoids do not entirely recapitulate this highly controlled process of neuronal layering that takes place during retinogenesis. It is also important to consider that *in vivo* the inner retina is vascularized in contrast to the outer retina; thus, the absence of vasculature in retinal organoids could limit the metabolic support of the inner retina structures and explain the disorganization for long-term culture. The absence of RPE could also contribute to impaired organoid lamination. Even though our protocol allowed the generation of RPE cells from iPSCs, this monolayer of epithelial cells facing the photoreceptors *in vivo* is not present in retinal organoids as a monolayer. As reported in mice, ablation of RPE during early retinal development is accompanied by disruption of retinal lamination with formation of rosette [52].

In this study, we used FBS and Glutamax for long-term maintenance of cell survival [18] without addition of RA to the media throughout the whole differentiation process in order to try optimizing cone differentiation. Indeed, the RA signaling pathway plays an important role in photoreceptor development by promoting rod differentiation but inhibiting cone maturation in chicken and zebrafish [31, 53–55]. Recently, different groups reported that continued supplementation of RA hindered or prevented the expression of cone markers in retinal organoids derived from mouse or human iPSCs [18, 32] and that exogenous RA addition was not required to generate retinal organoids with both mature rod and cone photoreceptors [20]. Most of the recent protocols aiming at generating retinal organoids applied a relatively high concentration of RA in the culture medium in a specific time window, generally before photoreceptor maturation (around day 85–120 depending on the protocol used, yielding rod-enriched organoids) [14, 15, 21]. In our culture conditions, the precursor of RA, vitamin A, is present in B27 supplement only at early time of organoid floating cultures but not for long-term cultures (after 12 weeks), in an attempt to control the endogenous RA production during the culture. It would be interesting to investigate the expression of RA-synthesizing enzymes (Aldh1a1 and Aldh1a3) and catabolizing enzymes (Cyp26a1 and Cyp26a3) in human retinal organoids at different stages of maturation, since the transient and highly localized expression pattern of these enzymes in human fetal retina could explain the foveal patterning [55]. Recent data in mouse PSC-derived retinal organoids reported a drastic downregulation of RA metabolism enzymes (Raldh1, Raldh3, and Cyp26a1) at late differentiation stages, when cone precursors are present [32]. As reported by other groups [18, 20, 21, 56], we found that human organoids have similar distribution of cone subtypes, with less blue cones than red/green cones, as to the *in vivo* situation of human retina. The control of cone subtype specification by thyroid hormone signaling, largely described in mice [29, 30], was recently confirmed in human PSC-

derived retinal organoids by elegant CRISPR/Cas9-mediated gene editing [56]. In our study, the presence of triiodothyronine (T3), the most active form of thyroid hormone in the B27 supplement, makes it possible to control the cone subtype specification in retinal organoids via the thyroid hormone receptor beta.

In summary, stem cell-derived retinal organoid technology represents a useful tool for studying the development of human retina and for modeling human retinal diseases, particularly those targeting the outer retina. With the generation of relevant cells, this innovative technology is expected to facilitate the development of cell therapies for retinal dystrophies.

### Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

### Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

### Authors' Contributions

A.S.-B. and A.R. did the conception and design, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, and revision of manuscript. O.R. and G.G. did the collection and/or assembly of data and revision of manuscript. C.N. and S.F. both contributed in the collection and/or assembly of data. Provision of study material was done by G.T. S.R. performed data analysis and interpretation. G.O. did the collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, and manuscript writing. Conception and design, data analysis and interpretation, manuscript writing, and financial support were by O.G. Amélie Slembrouck-Brec and Amélie Rodrigues contributed equally to this work.

### Acknowledgments

The authors would like to thank Professor José-Alain Sahel (Director of the “Institut de la Vision”) for administrative and financial support and K. Marazova for comments and advice on the manuscript. We thank V. Fradot for valuable advice in Müller glial cell cultures, N. Oudrhiri and A. Bennaceur (GHU Paris-Sud APHP) for the conventional cytogenetic analysis, and Dr. C. Craft (Mary D. Allen Laboratory for Vision Research, USC ROSKI Eye Institute) for Cone arrestin antibody. This work was supported by grants from the “Agence Nationale de la Recherche” (ANR-15-RHUS-001, ANR-16-CE17-0008-02, and ANR-17-CE18-0004-01), the Labex Revive (ANR-10-LABX-73), the Labex LifeSenses (ANR-10-LABX-65), the Technology Transfer company SATT Lutech, and Retina France Association. O.R. was a recipient of a PhD fellowship from Fédération des Aveugles de France and G.G. a recipient of a PhD fellowship from the French Ministry of Higher Education and Research.

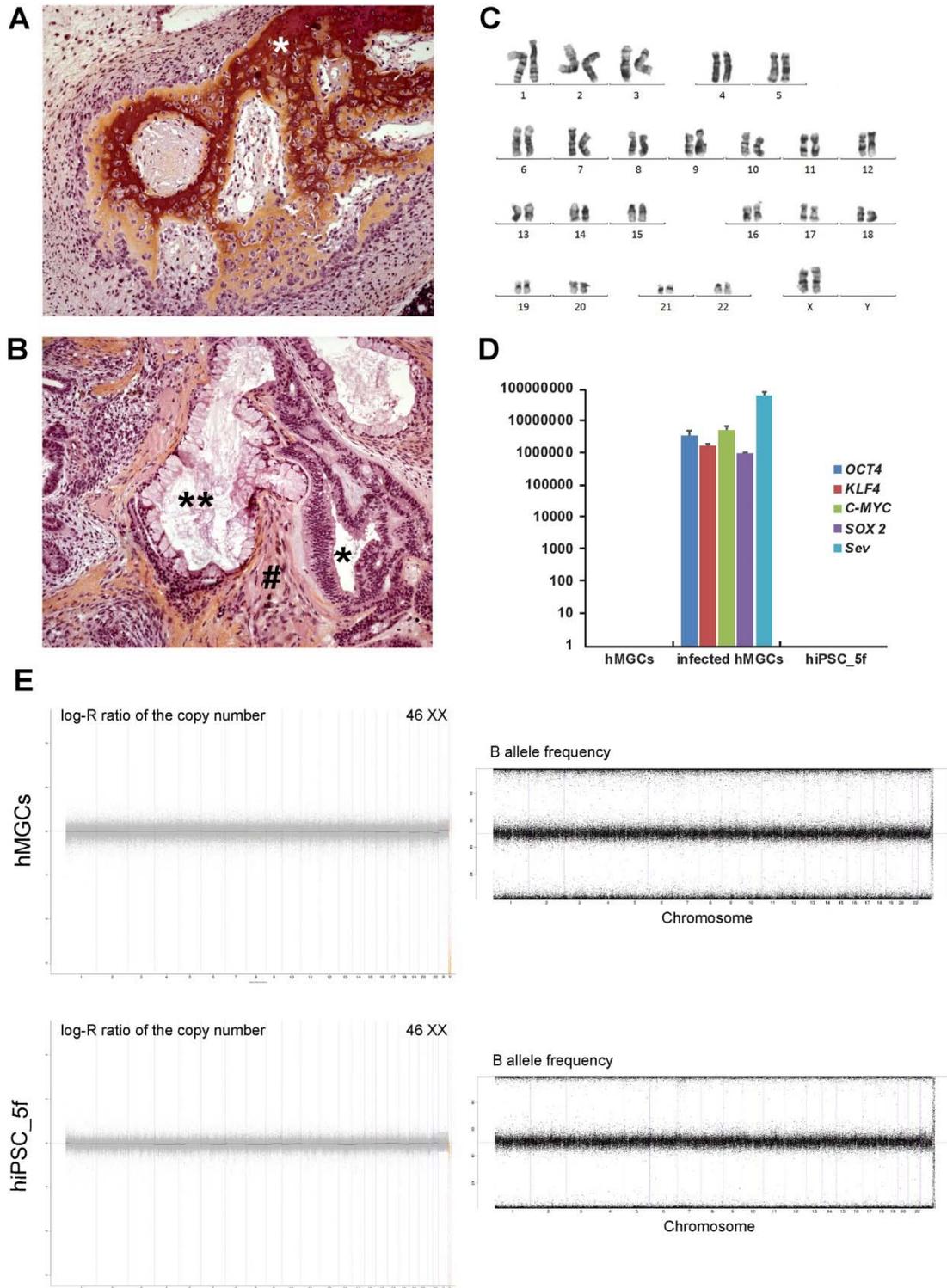
## Supplementary Materials

Figure S1: additional characterization of human MGC-derived iPSC lines Figure S2: reproducibility of retinal organoid lamination and photoreceptor differentiation with a human iPSC line derived from fibroblasts. Table S1: list of antibodies used for immunohistochemistry analysis. Table S2: list of TaqMan® Gene Expression ID Assays used for RT-qPCR. Movie S1: movie of a D175 retinal organoid labelled with anti-CRX (white) and Cone arrestin (red). Scale bar = 300  $\mu\text{m}$ . (*Supplementary Materials*)

## References

- [1] P. Karagiannis, K. Takahashi, M. Saito et al., "Induced pluripotent stem cells and their use in human models of disease and development," *Physiological Reviews*, vol. 99, no. 1, pp. 79–114, 2019.
- [2] L. A. Wiley, E. R. Burnight, A. E. Songstad et al., "Patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) for the study and treatment of retinal degenerative diseases," *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 44, pp. 15–35, 2015.
- [3] L. L. Leach and D. O. Clegg, "Concise review: making stem cells retinal: methods for deriving retinal pigment epithelium and implications for patients with ocular disease," *Stem Cells*, vol. 33, no. 8, pp. 2363–2373, 2015.
- [4] C. Zhao, Q. Wang, and S. Temple, "Stem cell therapies for retinal diseases: recapitulating development to replace degenerated cells," *Development*, vol. 144, no. 8, pp. 1368–1381, 2017.
- [5] O. Rabesandratana, O. Goureau, and G. Orieux, "Pluripotent stem cell-based approaches to explore and treat optic neuropathies," *Frontiers in Neuroscience*, vol. 12, p. 651, 2018.
- [6] Z.-B. Jin, M.-L. Gao, W.-L. Deng et al., "Stemming retinal regeneration with pluripotent stem cells," *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 69, pp. 38–56, 2019.
- [7] G. Gagliardi, K. Ben M'Barek, and O. Goureau, "Photoreceptor cell replacement in macular degeneration and retinitis pigmentosa: a pluripotent stem cell-based approach," *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 16, 2019.
- [8] J. S. Meyer, S. E. Howden, K. A. Wallace et al., "Optic vesicle-like structures derived from human pluripotent stem cells facilitate a customized approach to retinal disease treatment," *Stem Cells*, vol. 29, no. 8, pp. 1206–1218, 2011.
- [9] T. Nakano, S. Ando, N. Takata et al., "Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs," *Cell Stem Cell*, vol. 10, no. 6, pp. 771–785, 2012.
- [10] B. A. Tucker, R. F. Mullins, L. M. Streb et al., "Patient-specific iPSC-derived photoreceptor precursor cells as a means to investigate retinitis pigmentosa," *eLife*, vol. 2, article e00824, 2013.
- [11] S. Reichman, A. Terray, A. Slembrouck et al., "From confluent human iPSC cells to self-forming neural retina and retinal pigmented epithelium," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, no. 23, pp. 8518–8523, 2014.
- [12] A. Kuwahara, C. Ozone, T. Nakano, K. Saito, M. Eiraku, and Y. Sasai, "Generation of a ciliary margin-like stem cell niche from self-organizing human retinal tissue," *Nature Communications*, vol. 6, no. 1, 2015.
- [13] C. B. Mellough, J. Collin, M. Khazim et al., "IGF-1 signaling plays an important role in the formation of three-dimensional laminated neural retina and other ocular structures from human embryonic stem cells," *Stem Cells*, vol. 33, no. 8, pp. 2416–2430, 2015.
- [14] K. J. Wahlin, J. A. Maruotti, S. R. Sripathi et al., "Photoreceptor outer segment-like structures in long-term 3D retinas from human pluripotent stem cells," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, p. 766, 2017.
- [15] A. Gonzalez-Cordero, K. Kruczek, A. Naeem et al., "Recapitulation of human retinal development from human pluripotent stem cells generates transplantable populations of cone photoreceptors," *Stem Cell Reports*, vol. 9, no. 3, pp. 820–837, 2017.
- [16] S. Llonch, M. Carido, and M. Ader, "Organoid technology for retinal repair," *Developmental Biology*, vol. 433, no. 2, pp. 132–143, 2018.
- [17] F. González, S. Boué, and J. C. I. Belmonte, "Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte," *Nature Reviews. Genetics*, vol. 12, no. 4, pp. 231–242, 2011.
- [18] X. Zhong, C. Gutierrez, T. Xue et al., "Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs," *Nature Communications*, vol. 5, no. 1, 2014.
- [19] S. Reichman, A. Slembrouck, G. Gagliardi et al., "Generation of storable retinal organoids and retinal pigmented epithelium from adherent human iPSC cells in xeno-free and feeder-free conditions," *Stem Cells*, vol. 35, no. 5, pp. 1176–1188, 2017.
- [20] G. Li, B. Xie, L. He et al., "Generation of retinal organoids with mature rods and cones from urine-derived human induced pluripotent stem cells," *Stem Cells International*, vol. 2018, Article ID 4968658, 12 pages, 2018.
- [21] E. E. Capowski, K. Samimi, S. J. Mayerl et al., "Reproducibility and staging of 3D human retinal organoids across multiple pluripotent stem cell lines," *Development*, vol. 146, no. 1, 2019.
- [22] L. Wang, D. Hiler, B. Xu et al., "Retinal cell type DNA methylation and histone modifications predict reprogramming efficiency and retinogenesis in 3D organoid cultures," *Cell Reports*, vol. 22, no. 10, pp. 2601–2614, 2018.
- [23] S. Ruiz, K. Brennand, A. D. Panopoulos, A. Herrerías, F. H. Gage, and J. C. Izpisua-Belmonte, "High-efficient generation of induced pluripotent stem cells from human astrocytes," *PLoS One*, vol. 5, no. 12, article e15526, 2010.
- [24] C. Tian, Y. Wang, L. Sun, K. Ma, and J. C. Zheng, "Reprogrammed mouse astrocytes retain a "memory" of tissue origin and possess more tendencies for neuronal differentiation than reprogrammed mouse embryonic fibroblasts," *Protein & Cell*, vol. 2, no. 2, pp. 128–140, 2011.
- [25] D. Hicks and Y. Courtois, "The growth and behaviour of rat retinal Müller cells in vitro. 1. An improved method for isolation and culture," *Experimental Eye Research*, vol. 51, no. 2, pp. 119–129, 1990.
- [26] C. Gaudin, V. Forster, J. Sahel, H. Dreyfus, and D. Hicks, "Survival and regeneration of adult human and other mammalian photoreceptors in culture," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 37, no. 11, pp. 2258–2268, 1996.
- [27] A. Slembrouck-Brec, C. Nanteau, J.-A. Sahel, O. Goureau, and S. Reichman, "Defined xeno-free and feeder-free culture conditions for the generation of human iPSC-derived retinal cell models," *Journal of Visualized Experiments*, no. 139, article e57795, 2018.
- [28] A. Terray, V. Fort, A. Slembrouck et al., "Establishment of an induced pluripotent stem (iPS) cell line from dermal fibroblasts of an asymptomatic patient with dominant PRPF31 mutation," *Stem Cell Research*, vol. 25, pp. 26–29, 2017.

- [29] J. A. Brzezinski and T. A. Reh, "Photoreceptor cell fate specification in vertebrates," *Development*, vol. 142, no. 19, pp. 3263–3273, 2015.
- [30] S. Wang and C. L. Cepko, "Photoreceptor fate determination in the vertebrate retina," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 57, no. 5, pp. ORSFe1–ORSFe6, 2016.
- [31] C. B. Stevens, D. A. Cameron, and D. L. Stenkamp, "Plasticity of photoreceptor-generating retinal progenitors revealed by prolonged retinoic acid exposure," *BMC Developmental Biology*, vol. 11, no. 1, p. 51, 2011.
- [32] K. Kruczek, A. Gonzalez-Cordero, D. Goh et al., "Differentiation and transplantation of embryonic stem cell-derived cone photoreceptors into a mouse model of end-stage retinal degeneration," *Stem Cell Reports*, vol. 8, no. 6, pp. 1659–1674, 2017.
- [33] A. Hamon, J. E. Roger, X.-J. Yang, and M. Perron, "Müller glial cell-dependent regeneration of the neural retina: an overview across vertebrate model systems," *Developmental Dynamics*, vol. 245, no. 7, pp. 727–738, 2016.
- [34] D. Goldman, "Müller glial cell reprogramming and retina regeneration," *Nature Reviews. Neuroscience*, vol. 15, no. 7, pp. 431–442, 2014.
- [35] N. L. Jorstad, M. S. Wilken, W. N. Grimes et al., "Stimulation of functional neuronal regeneration from Müller glia in adult mice," *Nature*, vol. 548, no. 7665, pp. 103–107, 2017.
- [36] K. Yao, S. Qiu, Y. V. Wang et al., "Restoration of vision after de novo genesis of rod photoreceptors in mammalian retinas," *Nature*, vol. 560, no. 7719, pp. 484–488, 2018.
- [37] J. M. Polo, S. Liu, M. E. Figueroa et al., "Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells," *Nature Biotechnology*, vol. 28, no. 8, pp. 848–855, 2010.
- [38] K. Kim, R. Zhao, A. Doi et al., "Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells," *Nature Biotechnology*, vol. 29, no. 12, pp. 1117–1119, 2011.
- [39] M. Kajiwara, T. Aoi, K. Okita et al., "Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no. 31, pp. 12538–12543, 2012.
- [40] F. Rouhani, N. Kumasaka, M. C. de Brito, A. Bradley, L. Vallier, and D. Gaffney, "Genetic background drives transcriptional variation in human induced pluripotent stem cells," *PLoS Genetics*, vol. 10, no. 6, article e1004432, 2014.
- [41] A. Kyttälä, R. Moraghebi, C. Valensisi et al., "Genetic variability overrides the impact of parental cell type and determines iPSC differentiation potential," *Stem Cell Reports*, vol. 6, no. 2, pp. 200–212, 2016.
- [42] D. Hiler, X. Chen, J. Hazen et al., "Quantification of retinogenesis in 3D cultures reveals epigenetic memory and higher efficiency in iPSCs derived from rod photoreceptors," *Cell Stem Cell*, vol. 17, no. 1, pp. 101–115, 2015.
- [43] M. Eiraku, N. Takata, H. Ishibashi et al., "Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture," *Nature*, vol. 472, no. 7341, pp. 51–56, 2011.
- [44] A. Gonzalez-Cordero, E. L. West, R. A. Pearson et al., "Photoreceptor precursors derived from three-dimensional embryonic stem cell cultures integrate and mature within adult degenerate retina," *Nature Biotechnology*, vol. 31, no. 8, pp. 741–747, 2013.
- [45] J. Assawachananont, M. Mandai, S. Okamoto et al., "Transplantation of embryonic and induced pluripotent stem cell-derived 3D retinal sheets into retinal degenerative mice," *Stem Cell Reports*, vol. 2, no. 5, pp. 662–674, 2014.
- [46] M. Völkner, M. Zschätzsch, M. Rostovskaya et al., "Retinal organoids from pluripotent stem cells efficiently recapitulate retinogenesis," *Stem Cell Reports*, vol. 6, no. 4, pp. 525–538, 2016.
- [47] A. Hendrickson, K. Bumsted-O'Brien, R. Natoli, V. Ramamurthy, D. Possin, and J. Provis, "Rod photoreceptor differentiation in fetal and infant human retina," *Experimental Eye Research*, vol. 87, no. 5, pp. 415–426, 2008.
- [48] A. Hoshino, R. Ratnapriya, M. J. Brooks et al., "Molecular anatomy of the developing human retina," *Developmental Cell*, vol. 43, no. 6, pp. 763–779.e4, 2017.
- [49] J. Icha, C. Kunath, M. Rocha-Martins, and C. Norden, "Independent modes of ganglion cell translocation ensure correct lamination of the zebrafish retina," *The Journal of Cell Biology*, vol. 215, no. 2, pp. 259–275, 2016.
- [50] A. R. Tufford, J. R. Onyak, K. B. Sondereker et al., "Melanopsin retinal ganglion cells regulate cone photoreceptor lamination in the mouse retina," *Cell Reports*, vol. 23, no. 8, pp. 2416–2428, 2018.
- [51] R. Amini, M. Rocha-Martins, and C. Norden, "Neuronal migration and lamination in the vertebrate retina," *Frontiers in Neuroscience*, vol. 11, p. 742, 2018.
- [52] S. M. Raymond and I. J. Jackson, "The retinal pigmented epithelium is required for development and maintenance of the mouse neural retina," *Current Biology*, vol. 5, no. 11, pp. 1286–1295, 1995.
- [53] G. A. Hyatt, E. A. Schmitt, J. M. Fadool, and J. E. Dowling, "Retinoic acid alters photoreceptor development in vivo," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no. 23, pp. 13298–13303, 1996.
- [54] G. Alfano, I. Conte, T. Caramico et al., "Vax2 regulates retinoic acid distribution and cone opsin expression in the vertebrate eye," *Development*, vol. 138, no. 2, pp. 261–271, 2011.
- [55] S. da Silva and C. L. Cepko, "Fgf8 expression and degradation of retinoic acid are required for patterning a high-acuity area in the retina," *Developmental Cell*, vol. 42, no. 1, pp. 68–81.e6, 2017.
- [56] K. C. Eldred, S. E. Hadyniak, K. A. Hussey et al., "Thyroid hormone signaling specifies cone subtypes in human retinal organoids," *Science*, vol. 362, no. 6411, p. eaau6348, 2018.



**Figure S1: Additional characterization of human MGC-derived iPSC lines**

**(A-B)** Histological analysis of teratomas observed in NSG mouse after subcutaneous injection of iPSC-5f; (■) bone; (\*) neural tube, (\*\*) intestinal epithelium, (#) muscular

fiber. **(C)** Karyotype analysis of human iPSC-5f. **(D)** Absence of Sendai viral ARN expression in human iPSC-5f cell line. One-week infected-MGCs were used as a positive control and data are normalized to uninfected MGCs. **(E)** SNP array analysis of human MGCs (hMGCs) and human iPSC lines (hiPSC\_5f). Data are presented as the weighted log<sub>2</sub> ratio of the copy number (Y-axis on left panels) or B allele frequency (Y-axis on right panels) and the chromosome number (X-axis).

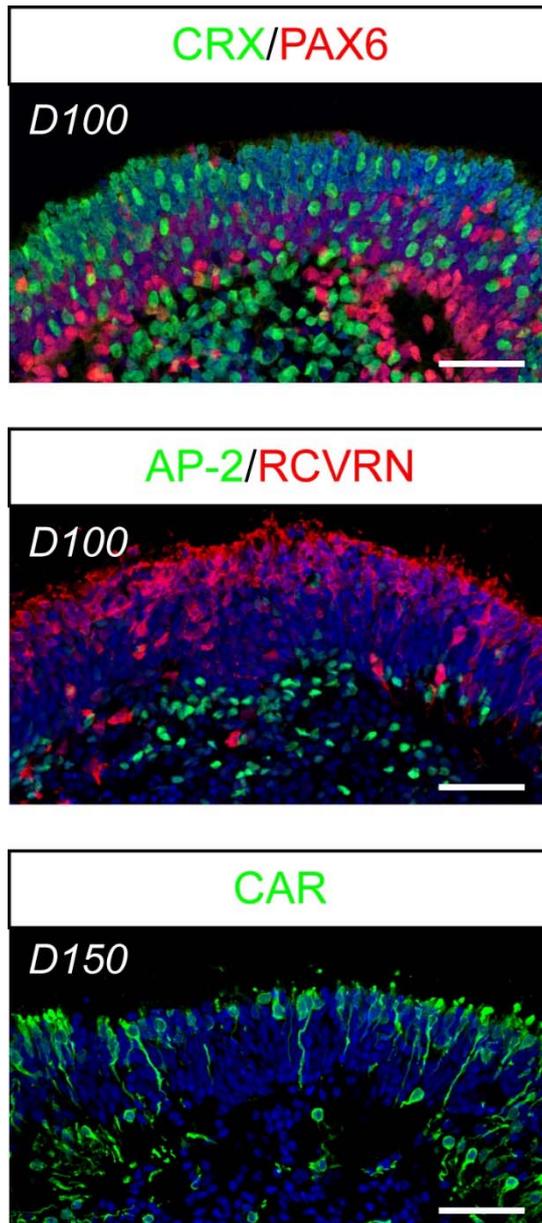


Figure S2: Reproducibility of retinal organoid lamination and photoreceptor differentiation with a human iPSC line derived from fibroblasts.

Immunofluorescence staining with PAX6 (ganglion cells, amacrine/horizontal cells), AP-2 (amacrine cells), CRX and RCVRN (photoreceptors) and CAR (cones) of cryosections from D56 and D100 retinal organoids differentiated from human fibroblast-derived iPSCs (hiPSC-2 clone) in ProB27 medium supplemented with 10%FCS and 2mM Glutamax. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). (Scale bars: 50 $\mu$ m).

Movie S1: Movie of a D175 retinal organoid labelled with anti-CRX (white) and Cone arrestin (red). Scale bar = 300µm. (related to Figure 5).

**Table S1:** List of antibodies used for immunohistochemistry analysis

<b>Antigen</b>	<b>Species</b>	<b>Dilution</b>	<b>Source</b>
AP-2	Mouse monoclonal	1:100	DSHB
ARL-13B	Rabbit polyclonal	1:100	Proteintech
BESTROPHIN	Mouse monoclonal	1:1000	Novus Biologicals
BRN3A	Mouse monoclonal	1:250	Merck/Millipore
CD18	Mouse monoclonal	1:100	Bio-Rad/Serotec
CONE ARRESTIN	Rabbit polyclonal	1:2000	Merck/Millipore
CRX	Mouse monoclonal	1:1000	Abnova
EZRIN	Mouse monoclonal	1:250	Sigma-Aldrich
GLUTAMIN SYNTHASE	Mouse monoclonal	1:500	Merck/Millipore
IBA1	Rabbit polyclonal	1 :100	WAKO
KI67	Mouse monoclonal	1:200	BD Pharmagen
LHX1 (LIM1)	Mouse monoclonal	1:20	DSHB
MITF	Mouse monoclonal	1:200	DAKO
OCT4	Rabbit monoclonal	1:100	Cell Signaling Tech.
OPSIN Blue	Rabbit polyclonal	1:500	Merck/Millipore
OPSIN R/G	Rabbit polyclonal	1:500	Merck/Millipore
PAX6	Rabbit polyclonal	1:1000	Merck/Millipore
PKC $\alpha$	Rabbit polyclonal	1:5000	Santa-Cruz
RAX/RX	Rabbit polyclonal	1:5000	Abcam
RHODOPSIN	Mouse monoclonal	1:500	Merck/Millipore
RECOVERIN	Rabbit polyclonal	1:5000	Merck/Millipore
SSEA4	Mouse monoclonal	1:200	Cell Signaling Tech.
SOX2	Rabbit monoclonal	1:400	Cell Signaling Tech.
TRA1-81	Mouse monoclonal	1:100	Cell Signaling Tech.
VIMENTIN	Mouse monoclonal	1:200	Merck/Millipore
VSX2 (CHX10)	Goat polyclonal	1:2000	Santa Cruz
ZO1	Rabbit polyclonal	1:250	ThermoFischer Sci.

**Table S2:** List of TaqMan® Gene Expression ID Assays used for RT-qPCR

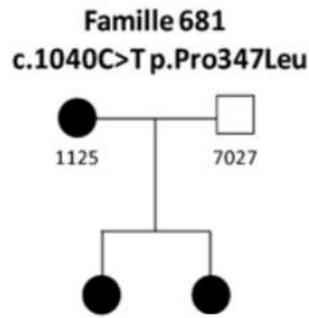
<b>Gene Symbols</b>	<b>Assays IDs (LifeTechnologies)</b>
18S	18S-Hs99999901_s1
BEST1	BEST1-00188249_m1
CRX	CRX-Hs00230899_m1
DKK1	DKK1-Hs00183740_m1
DNMT3B	DNMT3B-Hs00171876_m1
EN1	EN1- Hs00154977_m1
GAD2	GAD2-Hs00609534_m1
GDF3	GDF3-Hs00220998_m1
HAND1	HAND1-Hs00231848_m1
LHX2	LHX2-Hs00180351_m1
LIN28A	LIN28A-Hs00702808_s1
MERTK	MERTK-Hs01031973_m1
MITF	MITF-Hs01117294_m1
NANOG	NANOG-Hs02387400_g1
NEUROD1	NEUROD1-Hs00159598_m1
NKX2-1	NKX2-1- Hs00968940_m1
NODAL	NODAL-Hs00415443_m1
NOGGIN	NOG-Hs00271352_s1
NRL	NRL-Hs00172997_m1
PAX6	PAX6-Hs00240871_m1
PDEF	SERPINF1-Hs01106934_m1
POU5F1 (OCT4)	POU5F1-Hs00999632_g1
RAX	RAX-Hs00429459_m1
RPE65	RPE65-Hs01071462_m1
SIX3	SIX3-Hs00193667_m1
SOX2	SOX2-Hs01053049_s1
TDGF1	TDGF1- Hs02339497_g1
TERT	TERT-Hs00972656_m1
VSX2	VSX2-Hs00766959_s1
ZFP42	ZFP42- Hs01938187_s1



## **2. Validation de l'approche de modélisation, basée sur l'utilisation d'organoïdes dérivés de cellules iPS de patients atteints de RP, à partir d'une mutation bien caractérisée dans le gène *RHODOPSINE*.**

La compréhension des mécanismes à l'origine des maladies humaines et l'élaboration de stratégies optimales pour leur traitement requièrent des modèles de maladies humaines. Les modèles neurodégénératifs actuels dérivés des cellules iPS humaines ont la capacité de récapituler les processus cellulaires et moléculaires menant à la maladie (Okano et Yamanaka, 2014). La technologie iPS est particulièrement utile dans la modélisation des RP, formes les plus communes de dystrophies rétiniennes héréditaires affectant les photorécepteurs avec une prévalence comprise entre 1:3000 et 1:7000 pour un total de 1,5 million de personnes affectées. Il existe environ 60 gènes avec plus de 3100 mutations connues causant des phénotypes de RP non syndromiques (Verbakel et al., 2018). Étant donné que des mutations dans différents gènes peuvent aboutir à un phénotype relativement similaire, et inversement des défauts dans un seul gène peuvent conduire à des phénotypes distincts, les cellules rétiniennes dérivées de cellules iPS de patients atteints de RP peuvent être utilisées pour confirmer le diagnostic clinique et génétique de la RP et explorer les mécanismes moléculaires et cellulaires de mutations génétiques spécifiques.

Nous nous sommes dans un premier temps appuyés sur une mutation bien caractérisée, dans le gène *RHODOPSINE* (*RHO*), afin de valider l'utilisation de notre modèle organoïde pour la compréhension des différentes formes de RP. Ce gène code le pigment protéique absorbant la lumière, qui initie la cascade de transmission de signal dans les photorécepteurs à bâtonnets. Selon la littérature, la prévalence des mutations dans *RHO* varie de 2 % à 50 % des cas de RP autosomiques dominantes dans les cohortes de diverses origines géographiques, avec plus de 16 % en France (Audo et al., 2010). Différentes classifications des mutations du gène *RHO* ont été réalisées en fonction de leur manifestation clinique et de leur comportement biochimique et cellulaire, comme le mauvais repliement, la rétention dans le reticulum endoplasmique, le trafic post-Golgi ou un défaut d'adressage dans les segments externes (Mendes et al., 2005 ; Athanasiou et al., 2018). Dans ce contexte, nous visons à modéliser la RP causée par la mutation c.1040C>T (p.P347L), la plus répandue en Europe, en utilisant les lignées de cellules iPS de patients précédemment établies et caractérisées au sein de l'équipe (**Figure 35**).

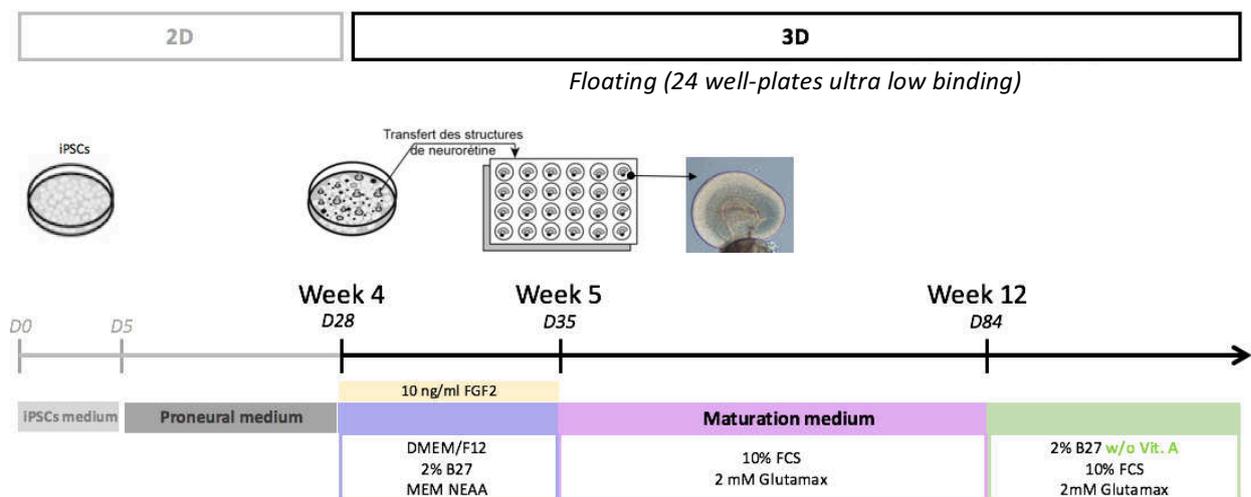


**Figure 35. Pédigrée du patient sélectionné atteint d'une RP causée par une mutation dans le gène RHO.**

La mutation substitutive 1040C>T dans le gène *RHODOPSINE* engendre le remplacement de la Proline, en position 347, par une Leucine (P347L). C'est une mutation de classe I, associée à un défaut de transport de la protéine. Le patient sélectionné pour cette étude est le 1125. Le concubin non-porteur de la mutation (7027) sert de contrôle.

**Carré** homme ; **rond** femme ; **noir** symptomatique porteur de la mutation ; **blanc** asymptomatique non porteur de la mutation.

Les cellules iPS ont été différenciées en organoïdes rétiniens en utilisant le protocole préalablement établi et optimisé au sein de l'équipe (Reichman et al., 2017 ; Slembrouck-Brec et al., 2019). Après 28 jours de culture avec un milieu proneural N2, les structures issues des cellules iPS sont repiquées manuellement et cultivées en suspension dans un milieu de maturation riche en glucose et supplémenté en sérum (**Figure 36**). La culture à long terme des organoïdes rétiniens générés, entre 150 et 200 jours, permet la maturation des photorécepteurs à bâtonnet et à cône caractérisés notamment par la formation de structures semblables aux segments externes (Slembrouck-Brec et al., 2019).



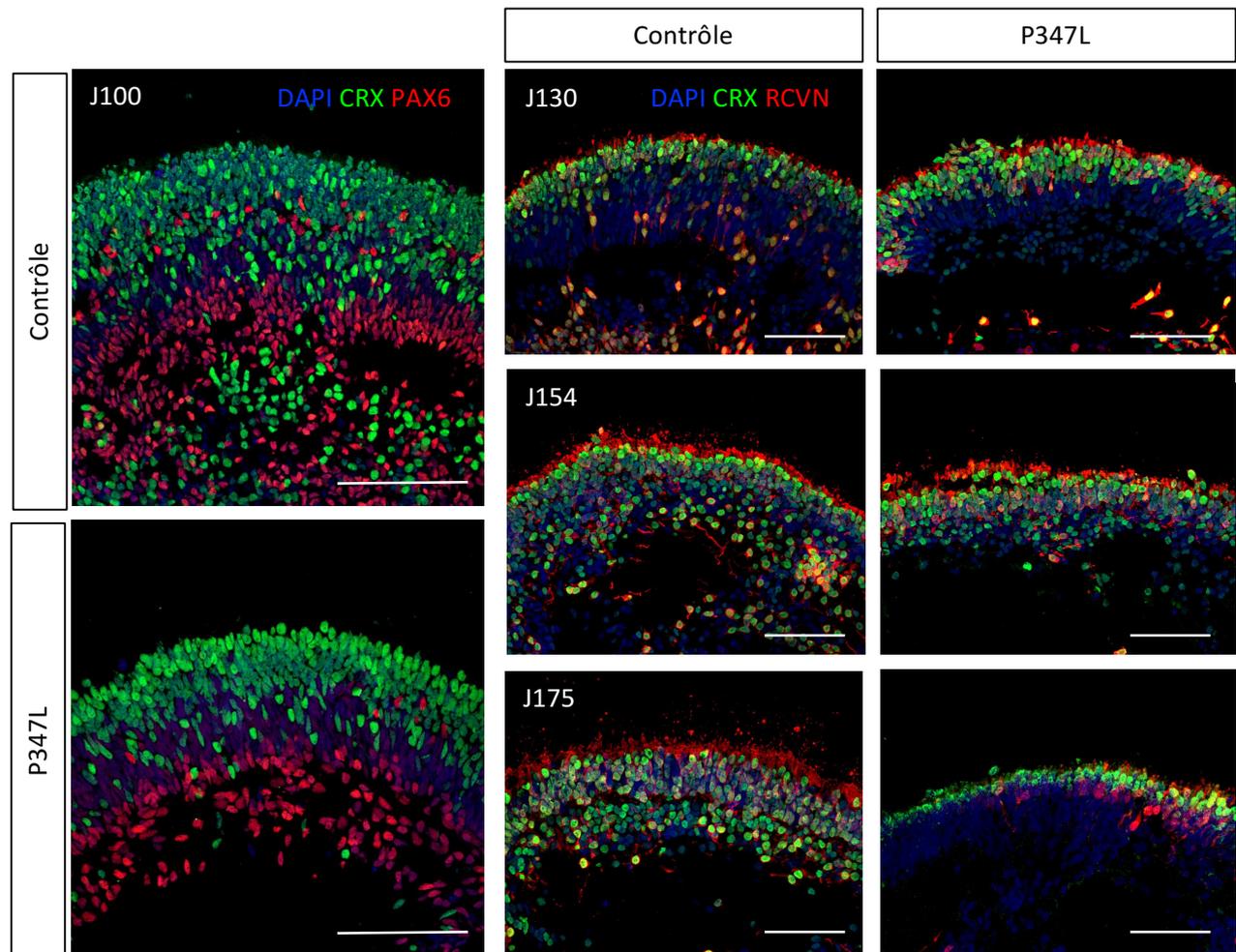
**Figure 36. Représentation schématique du protocole de différenciation des cellules iPS humaines en organoïdes rétiniens pseudo-laminés.**

L'image en fond clair représente un organoïde après 42 jours de culture. Adapté de Reichman et al., 2017.

Pour chaque expérience, les organoïdes rétiniens porteurs de la mutation P347L ont été cultivés en parallèle des organoïdes témoins correspondants (sans mutation), et fixés à différents temps de culture (J90, J100, J130, J154, et J175) afin d'étudier la différenciation, la maturation et l'éventuelle dégénérescence des photorécepteurs par immunofluorescence sur des cryosections d'organoïdes.

Les marquages immunohistochimiques avec des anticorps spécifiques des photorécepteurs (immatures et matures) tels que CRX, et des cellules non-photoréceptrices comme PAX6 (marqueur des progéniteurs rétiniens, cellules ganglionnaires, amacrines et horizontales), mettent en évidence la présence de deux couches cellulaires distinctes au sein des organoïdes porteurs ou non de la mutation (**Figure 37**). Ainsi, à J100, les cellules CRX positives (photorécepteurs) forment une couche nucléaire extérieure au sein de l'organoïde, tandis que les cellules PAX 6 positives (non photoréceptrices) forment une couche nucléaire plus interne. La présence de cellules CRX positives dans les organoïdes P347L suggère que la mutation n'empêche pas l'émergence et la différenciation précoce des cellules photoréceptrices. La différenciation des photorécepteurs a été étudiée de plus près en réalisant un co-marquage de protéines spécifiques des photorécepteurs, CRX (marquage nucléaire) et RECOVERINE (marquage cytoplasmique) à des stades de maturation différents et plus tardifs (**Figure 37**).

Chez le contrôle comme chez le mutant (P347L), les photorécepteurs sont présents aux 3 stades observés et s'organisent sous forme de couche à l'extérieur de l'organoïde. Cependant, dans les stades les plus tardifs (J175), les photorécepteurs semblent moins nombreux dans les organoïdes P347L. Ces résultats préliminaires semblent indiquer une corrélation entre la mort des photorécepteurs et leur stade de maturation.

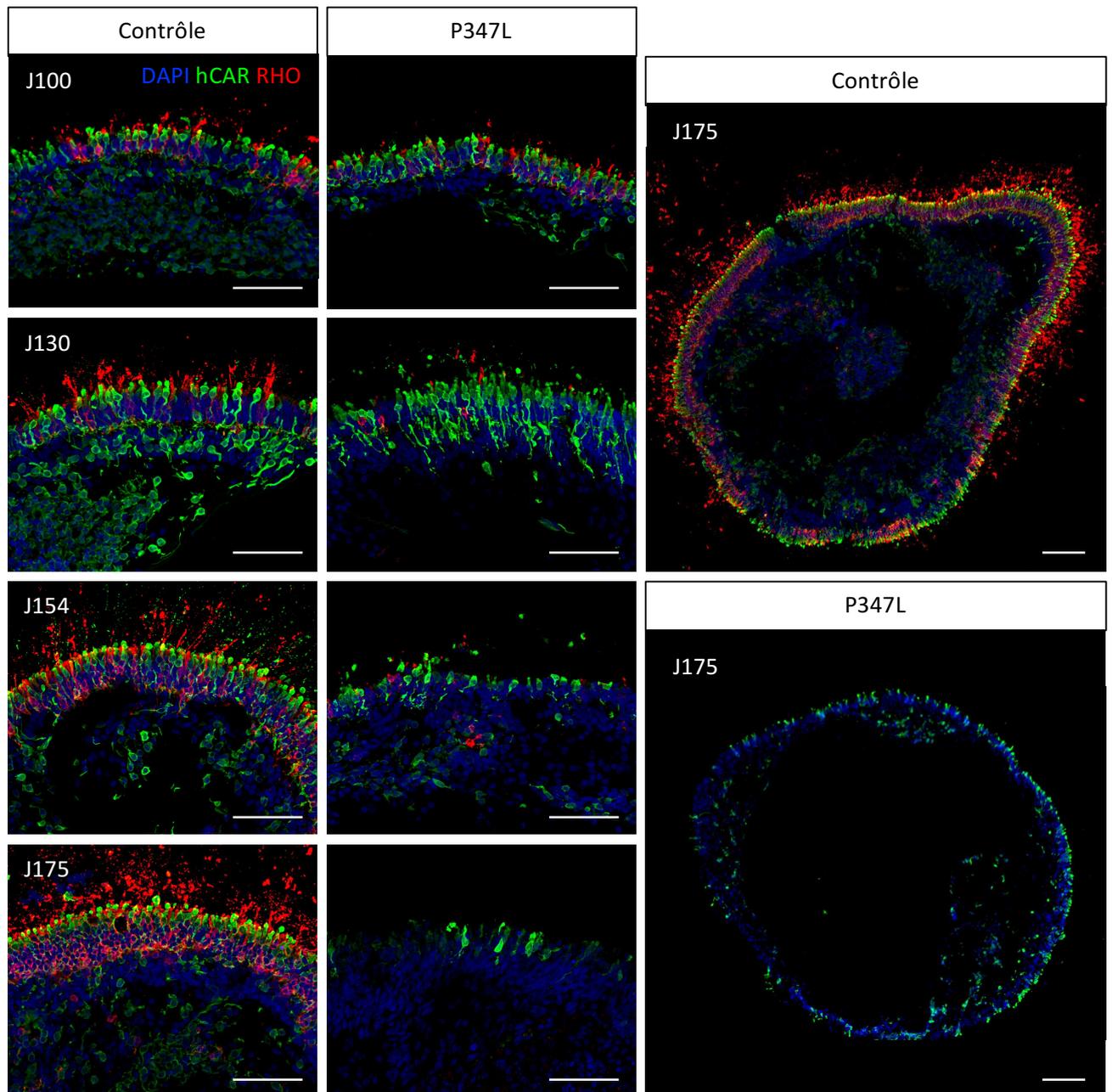


**Figure 37. Caractérisation des photorécepteurs.**

Immunofluorescence de cryosections d'organoïdes rétiniens contrôles ou porteurs de la mutation P347L dans le gène *RHODOPSINE*, à différents stades de différenciation (J100, J130, 154 et J175). *A gauche* : CRX (facteur de transcription spécifique aux photorécepteurs) et PAX6 (facteur de transcription exprimé par les progéniteurs rétiniens, puis les cellules ganglionnaires, amacrines et horizontales). *A droite* : CRX et RCVN (protéine cytoplasmique des photorécepteurs). Les noyaux cellulaires ont été marqués au DAPI (bleu). Barre d'échelle = 100  $\mu$ m.

**CRX** Cone-Rod Homeobox ; **PAX6** Paired Box-6 ; **RCVN** Recoverine ; **DAPI** 4',6-diamidino-2-phénylindole.

Afin de distinguer les deux types de photorécepteurs matures, cône et bâtonnet, les cryosections d'organoïdes témoins (Contrôle) et portant une mutation dans le gène *RHO* (P347L) ont été marquées avec les anticorps RHODOPSINE (RHO) et human CONE ARRESTINE (hCAR), spécifique des bâtonnets et des cônes respectivement (**Figure 38**). À J100, les bâtonnets et les cônes sont présents dans les organoïdes indépendamment de la présence de la mutation P347L. À partir de J130, une diminution du nombre de bâtonnets associée à une légère désorganisation des cônes semblent s'opérer dans les organoïdes P347L. Aux stades plus tardifs J154 et J175, les bâtonnets sont quasi absents des structures portant la mutation P347L dans le gène *RHO*, en comparaison avec les structures contrôles aux mêmes stades. De manière consécutive, les cônes semblent aussi drastiquement diminués au sein des organoïdes P347L, et présentent une structure altérée avec notamment l'absence de segment externe. Cette baisse marquée du nombre de photorécepteurs matures intervenant uniquement à partir des stades tardifs de différenciation des organoïdes rétiniens semblent confirmer que la mutation n'empêche pas la différenciation des précurseurs rétiniens en photorécepteurs, mais induit la dégénérescence progressive des photorécepteurs matures telle qu'elle a lieu *in vivo* dans le contexte des RP.

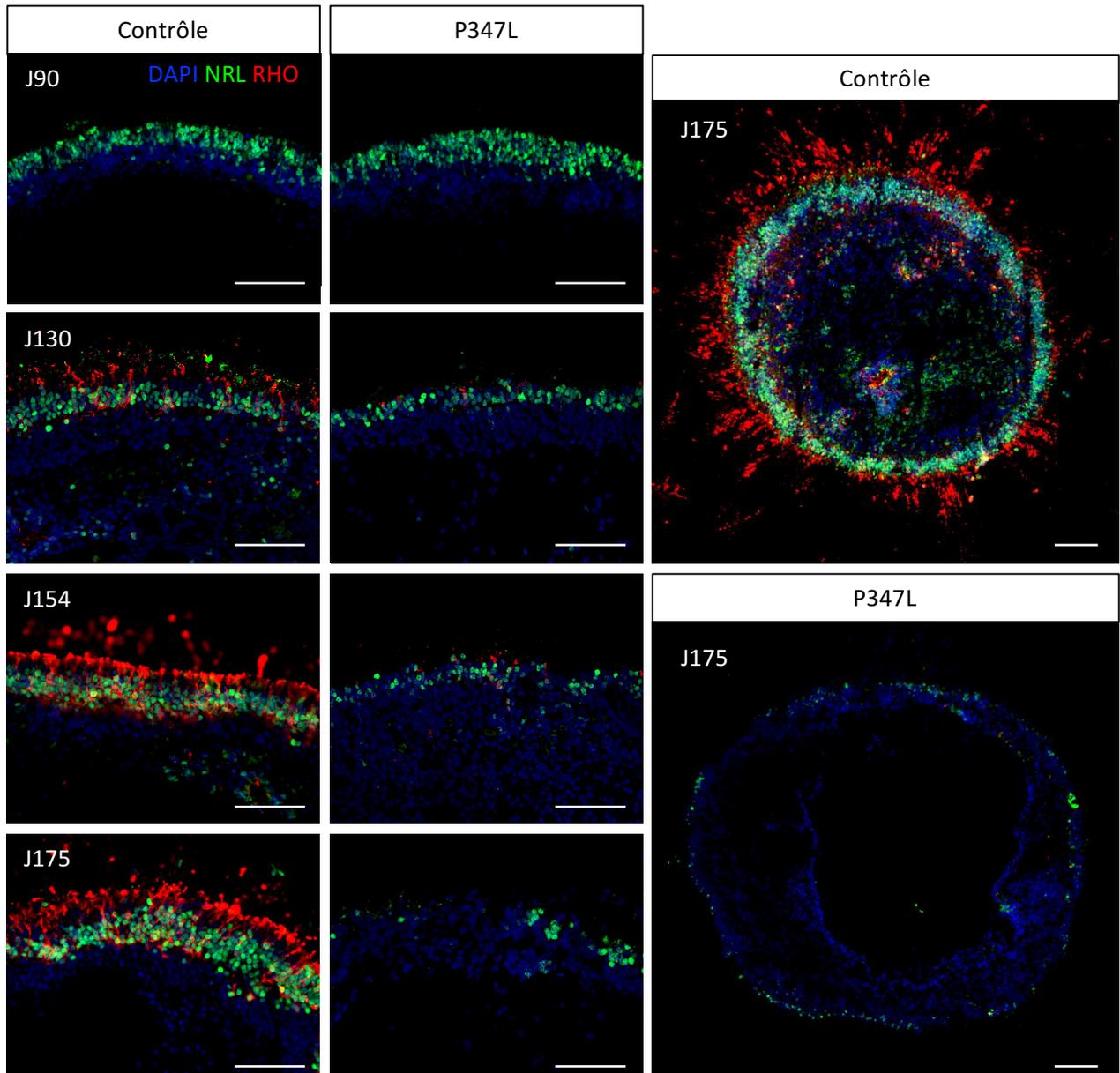


**Figure 38. Caractérisation des photorécepteurs matures.**

Immunofluorescence sur des cryosections d'organoïdes rétiniens contrôles ou porteurs de la mutation P347L dans le gène *RHODOPSINE*, à différents stades de maturation (J100, J130, J154 et J175). RHO (récepteur couplé aux protéines G des bâtonnets) et hCAR (arrestine exprimé dans les cônes). Les noyaux cellulaires ont été marqués au DAPI (bleu). Barre d'échelle = 100  $\mu$ m.

**RHO** Rhodopsin ; **hCAR** human Cone Arrestin ; **DAPI** 4',6-diamidino-2-phénylindole.

Si la quasi-absence de bâtonnets mûres observée dans les organoïdes P347L aux stades tardifs répond uniquement à un défaut de maturation des précurseurs des photorécepteurs, cela implique que les bâtonnets mûres n'apparaissent jamais au cours de la culture cellulaire. Les immunofluorescences avec le marqueur RHO ont permis de démontrer le contraire, notamment dans les organoïdes à un stade "jeune" (J100). En revanche, deux hypothèses restent envisageables pour expliquer le faible nombre de bâtonnets mûres au sein des organoïdes portant la mutation dans le gène *RHO* : la quantité initiale de précurseurs des bâtonnets est plus faible dans ces structures, ou la mutation entraîne une dégénérescence rapide des bâtonnets dès l'expression de la Rhodopsine lors de leur maturation. Afin de vérifier ces hypothèses, une immunofluorescence combinant un marqueur plus précoce des bâtonnets (NRL) et le marquage des bâtonnets mûres (RHO) a été réalisée (**Figure 39**). À J90, il ne semble pas y avoir de différence entre le nombre de cellules NRL-positives au sein des structures contrôles et des structures P347L. Les bâtonnets mûres, cellules RHO-positives, apparaissent à partir de J130 dans les deux conditions mais semblent associés chez le mutant avec une première diminution du nombre de cellules NRL-positives par rapport au contrôle. Cette différence s'intensifie nettement dans les stades J154 et J175, où la majorité des cellules NRL-positives sont des bâtonnets mûres et plus des précurseurs. L'ensemble de ces observations suggère que chez le mutant P347L, il existe bien une dégénérescence rapide des bâtonnets dès leur maturation.

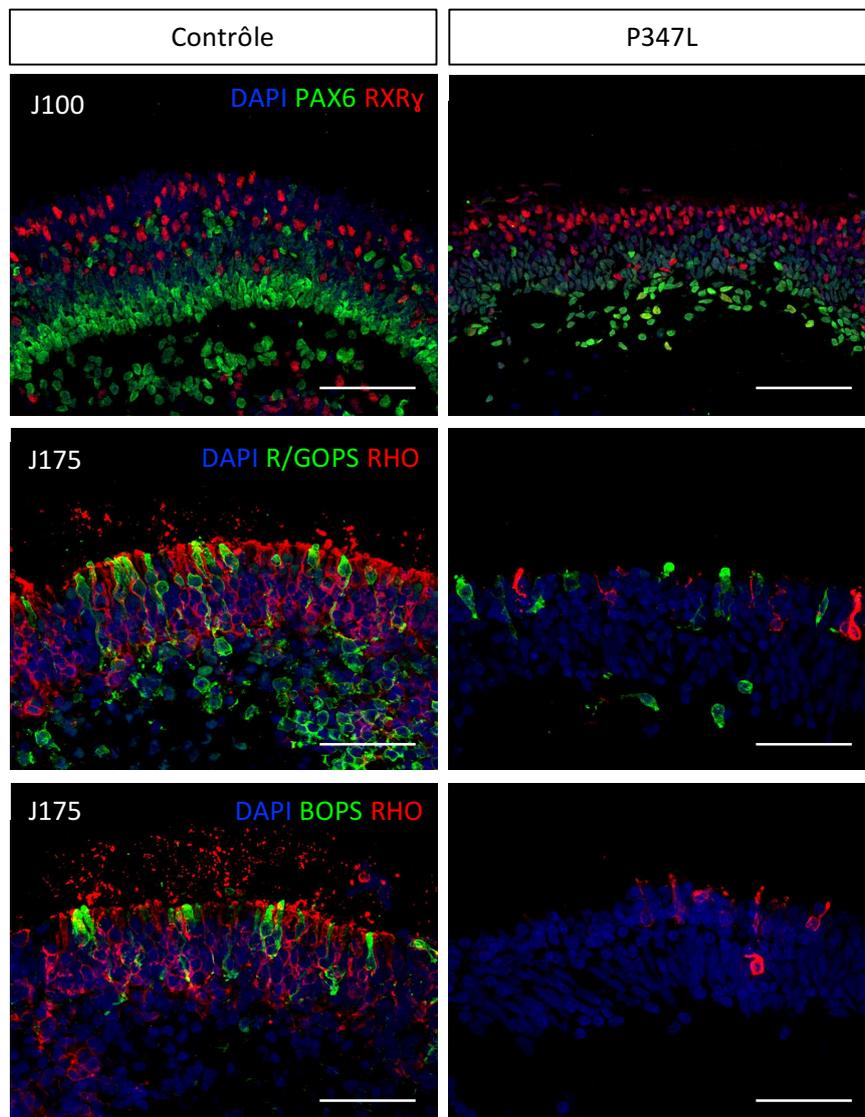


**Figure 39. Caractérisation des bâtonnets.**

Immunofluorescence sur des cryosections d'organoïdes rétiniens contrôles ou porteurs de la mutation P347L dans le gène *RHODOPSINE* à différents stades de maturation (J100, J130, J154 et J175). NRL (facteur de transcription spécifique du lignage des bâtonnets) et RHO (récepteur couplé à la protéine G des bâtonnets). Les noyaux cellulaires ont été marqués au DAPI (bleu). Barre d'échelle = 100  $\mu$ m.

*NRL* Neural Retina Leucine Zipper ; *RHO* Rhodopsin ; *DAPI* 4',6-diamidino-2-phénylindole.

En parallèle, la maturation des cônes a été suivie et évaluée par des marqueurs exprimé dans les précurseurs des cônes tel que le récepteur nucléaire RXR $\gamma$  (aussi exprimé dans les cellules ganglionnaires), ou spécifiques des cônes matures comme l'opsine bleue (BOPS) et l'opsine rouge/verte (R/GOPS) (**Figure 40**). Afin de distinguer les précurseurs des cônes des cellules ganglionnaires, peu nombreuses dans les organoïdes à J100, le marquage RXR $\gamma$  a été couplé au marquage PAX6 qui permet d'identifier les cellules ganglionnaires. Ainsi, les précurseurs des cônes sont uniquement les cellules RXR $\gamma$  positives PAX6 négatives (RXR $\gamma$  + / PAX6-). Dès J100, les précurseurs de cônes (RXR $\gamma$  + / PAX6-) sont présents et s'organisent de manière similaire dans la couche extérieure de l'organoïde, dans les structures contrôles et P347L. Cela suggère que la différence observée pour les cônes matures mise en évidence à partir de J130 (*Figure 38*, marquage hCAR) ne semble pas due à une absence initiale de précurseurs au sein des organoïdes portant la mutation P347L du gène *RHO*. Les marqueurs plus tardifs des cônes, identifiés sur des cryosections d'organoïdes à J175, ont permis de montrer que les cônes rouges et verts (cellules présentant un marquage R/GOPS) semblent plus nombreux que les cônes bleus (cellules BOPS positives), reproduisant la proportion des cônes dans la rétine *in vivo*. Comme attendu, très peu de cônes matures exprimant ces opsines sont observés dans les structures P347L. Ces résultats sont en accord avec les résultats préalablement obtenus, et renforcent l'idée d'une dégénérescence des cônes matures, consécutive dans le temps à la perte des bâtonnets, dans les organoïdes rétiniens portant la mutation P347L du gène de la RHODOPSINE.



**Figure 40. Caractérisation des cônes.**

Immunofluorescence sur des cryosections d'organoïdes rétiniens contrôles ou porteurs de la mutation P347L dans le gène *RHODOPSINE* à J100 et J175. *En haut* : *RXR* $\gamma$  (récepteur nucléaire exprimé dans les cellules ganglionnaires et les cônes) et *PAX6* (facteur de transcription exprimé par les progéniteurs rétiniens, puis les cellules ganglionnaires, amacrines et horizontales). *Au milieu* : *R/GOPS* (récepteur couplé aux protéines G des cônes verts et rouges) et *RHO* (récepteur couplé aux protéines G des bâtonnets). *En bas* : *BOPS* (récepteur couplé aux protéines G des cônes bleus) et *RHO*. Les noyaux cellulaires ont été marqués au DAPI (bleu). Barre d'échelle = 100  $\mu$ m.

*RXR* $\gamma$  Retinoid X Receptor  $\gamma$  ; *PAX6* Paired Box-6 ; *RHO* Rhodopsin ; *R/GOPS* Red-Green Opsin ; *BOPS* Blue Opsin ; *DAPI* 4',6-diamidino-2-phénylindole.

L'étude phénotypique par immunofluorescence des organoïdes de rétines différenciés à partir de cellules iPS portant la mutation P347L dans le gène *RHO*, a permis de mettre en évidence une dégénérescence des photorécepteurs matures, avec dans un premier temps la perte des bâtonnets, suivie par celle des cônes. La capacité à récapituler le phénotype pathologique observé *in vivo* chez les patients laisse à penser que les organoïdes rétiniens dérivés de cellules iPS humaines sont un outil véritablement adapté à la modélisation des dystrophies rétiniennes, notamment les RP.



### **3. Modélisation d'une forme de RP, liée à une mutation du gène *PRPF31*, à partir de cellules iPS humaines et développement d'une stratégie de thérapie génique.**

Tandis que la majorité des gènes responsables de RP sont spécifiquement ou principalement exprimés dans les photorécepteurs et/ou les cellules de l'EPR, d'autres codent pour des protéines ubiquitaires, comme le facteur d'épissage PRPF31. Les mutations dans le gène *PRPF31* sont la deuxième cause la plus fréquente des formes autosomiques dominantes de RP, représentant jusqu'à 10% des cas (Rose et al., 2017). Actuellement, les raisons expliquant pourquoi les mutations de ce gène affectent uniquement la rétine, malgré une expression et une nécessité ubiquitaires, et le ou les types cellulaires rétiniens premièrement affectés n'ont pas été clairement identifiés.

En différenciant des cellules iPS humaines, issues de patients portant différentes mutations du gène *PRPF31*, en cellules de l'EPR et en photorécepteurs, nous sommes parvenus à récapituler le phénotype de la maladie observé *in vivo*. Les cellules de l'EPR présentent une désorganisation caractérisée par un manque d'adhérence et d'adhésion cellule-cellule, qui se traduit également par une moindre résistance transépithéliale, et un défaut de la polarité apico-basale. Ces altérations morphologiques sont également associées à une atteinte fonctionnelle visualisée par une diminution de la phagocytose des segments externes des photorécepteurs. Au sein des organoïdes rétiniens pseudo-laminés, nous avons pu mettre en évidence une dégénérescence des photorécepteurs matures qui affecte dans un premier temps les bâtonnets, puis entraîne dans un second temps la perte des cônes. La morphologie des segments externes et des terminaisons synaptiques des photorécepteurs semblent particulièrement ciblés par ce processus de dégradation.

L'étude transcriptomique approfondie a permis d'identifier des transcrits différenciellement exprimés et ou/épissés, dans les cellules rétiniennes différenciées, en lien direct avec les altérations phénotypiques observées à l'échelle cellulaire (adhésion, développement visuel, ..) et la fonction du gène *PRPF31* (RNA processing).

Le phénotype observé dans ces deux types cellulaires a pu être corrélé avec un niveau d'expression moins élevé de la protéine PRPF31, en accord avec l'hypothèse d'un mécanisme d'haploinsuffisance à la base du développement de la maladie. Pour confirmer cette hypothèse, deux stratégies d'augmentation génique ont été entreprises : insertion par CRISPR/Cas9 d'une

copie saine du gène *PRPF31* dans le locus AAVS1 de cellules iPS de patients RP, et transduction d'organoïdes rétiniens différenciés à partir de cellules iPS portant une mutation dans le gène *PRPF31* avec un vecteur AAV contenant une copie saine de *PRPF31*. Ces deux stratégies ont permis de rétablir le niveau d'expression de la protéine PRPF31 et ainsi de réverser le phénotype « malade » observé dans les cellules de l'EPR et dans les organoïdes, restaurant la fonctionnalité et préservant la viabilité des cellules rétiniennes obtenues.

L'ensemble de ces résultats est présenté dans l'article ci-après, intitulé « Modeling PRPF31 retinitis pigmentosa using iPSC-derived retinal organoids and retinal pigmented epithelium, and rescue by gene augmentation strategy » par A. Rodrigues et al., *en cours de soumission*.

**Modeling PRPF31 retinitis pigmentosa using iPSC-derived retinal organoids and retinal pigmented epithelium and rescue by gene augmentation strategy**

Amélie Rodrigues<sup>1</sup>, Amélie Slembrouck-Brec<sup>1</sup>, Céline Nanteau<sup>1</sup>, Angélique Terray<sup>1</sup>, Yelyzaveta Tymoshenko<sup>2</sup>, Yvrick Zagar<sup>1</sup>, Sacha Reichman<sup>1</sup>, José-Alain Sahel<sup>1,3,4</sup>, Gael Orioux<sup>1</sup>, Emeline F Nandrot<sup>1</sup>, Leah C Byrne<sup>3</sup>, Isabelle Audo<sup>1,4</sup>, Jérôme E Roger<sup>2</sup> and Olivier Goureau<sup>1\*</sup>

1 Institut de la Vision, Sorbonne Université, INSERM, CNRS, 75012 Paris, France

2 Paris-Saclay Institute of Neuroscience, CERTO-Retina France, CNRS, Université Paris-Saclay, 91400 Saclay, France

3 Department of Ophthalmology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA 15213, USA.

4 Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts, Centre de référence maladies rares REFERET, INSERM-DHOS CIC 1423, 75012 Paris, France

Contact information: \* Olivier Goureau

Institut de la Vision, 17, Rue Moreau 75012 Paris, France.

Email: [olivier.goureau@inserm.fr](mailto:olivier.goureau@inserm.fr)

## ABSTRACT

Mutations in the ubiquitously expressed pre-mRNA processing factor (PRPF) 31, one of the most common cause of dominant form of Retinitis Pigmentosa (RP), lead to retina-specific phenotype. It is uncertain which retinal cell types are affected and the mechanisms by which *PRPF31* mutations cause retinal degeneration are still unclear. To address these questions, we used the induced pluripotent stem (iPS) cell technology to generate RP patient-specific retinal organoids and retinal pigment epithelial (RPE) cells. We demonstrated that *PRPF31* mutations affect both RPE cells and photoreceptors. RPE cells present several important morphological changes, such an impaired polarization and functional changes with an altered transepithelial resistance and reduced phagocytic activity. 3D laminated retinal organoids present a classical RP phenotype, with a rod photoreceptor cell death followed by a loss of cones. The low level of PRPF31 expression may explain the defective phenotypes of *PRPF31*-mutated RPE and photoreceptor cells, which were not observed in cells derived from asymptomatic patients or after correction of the pathogenic mutation by CRISPR/Cas9. Transcriptome profiles revealed differentially expressed genes and particularly mis-spliced genes belonging to pathways in line with the observed defective phenotypes. Finally, the rescue of photoreceptor degeneration by AAV-driven *PRPF31* gene augmentation, provide the proof of concept for future therapeutic strategy.

## INTRODUCTION

Rod-cone dystrophies also called retinitis pigmentosa (RP) is the leading cause of blindness or visual impairment in the young adult population with an estimated prevalence of one in 3500 individuals and more than one million people affected worldwide<sup>1,2</sup>. RP forms a clinically and genetically heterogeneous group of inherited retinal disorders where rod photoreceptors and retinal pigment epithelial (RPE) cells are usually the first cells to degenerate, followed by secondary degeneration of cone photoreceptors. When the cone dysfunctions occur, progressive visual field constriction and loss of central vision may be observed. The disease can progress to very severe forms of visual impairment, even blindness with no effective treatment. Mutations in over 80 genes have been identified and nearly 3100 mutations have been reported to date<sup>2,3</sup>. Mutations in the pre-mRNA processing factors (PRPFs), such as *PRPF3*, *PRPF4*, *PRPF6*, *PRPF8* and *PRPF31* are described as the second most common cause of autosomal dominant RP (adRP) after mutations in *RHODOPSIN*<sup>2,3</sup>. Among these factors, mutation in *PRPF31* are the most common with a prevalence ranging from 5 to 8% in adRP cohorts from various geographical origins<sup>4-10</sup>. Nearly 65 different mutations have been identified throughout the gene sequence, most commonly in exons 6 to 10<sup>10-13</sup>. The majority of reported *PRPF31* mutations are presumed loss-of-function variants including frameshift, splice site, nonsense or large-scale insertions or deletions, which are predicted to lead to complete loss of protein expression from the mutated allele. A consistent feature of *PRPF31*-associated RP is the incomplete penetrance with the presence of unaffected carriers, that could be explained by an haploinsufficiency mechanism, in which occurrence of the disease depends on higher or lower expressivity of the inherited normal allele<sup>12,14-19</sup>. *PRPF31* encodes an ubiquitously expressed splicing factor essential for the spliceosome activity<sup>20</sup> and it remains unclear why mutations in this gene have an impact only on retinal specific cells. A high alternative splicing rate in the retina has been proposed to explain the enhanced sensitivity of these cells to spliceosome disturbance<sup>21,22</sup>. So far, the specific retinal cell type(s) affected by these mutations has not been clearly identified. Studies on *Prpf31* +/- mice reported a morphological change in the aging RPE, but not in the neural retina<sup>23</sup> and showed a loss of RPE adhesion and a deficiency in

phagocytosis of photoreceptor outer segments (POS)<sup>24</sup>. Therefore, these animal models are insufficient and there is a critical need of human models recapitulating the RP clinical phenotype to understand the mechanism underlying the disease, as well as the cellular origin of the disease. The development of human induced pluripotent stem cells (iPSCs) reprogrammed from somatic cells has opened new and powerful tools to model diseases, to study underlying cellular and molecular mechanisms and to test new therapeutics. Many data have indicated that hiPSCs can be differentiated into the different retinal cell types<sup>25–28</sup> including RPE cells and photoreceptors, that are affected in RP. Moreover, the advantage of patient iPSC-derived retinal cells is that they recapitulate the disease-causing mutation and patient's genetic complexity, essential for complex and late-onset diseases. Recent large-scale transcriptomic analysis using *PRPF31* patient-derived RPE and photoreceptors showed that mis-splicing of genes mainly involved in ciliogenesis can lead to ultrastructural and functional abnormalities observed in these cells<sup>29,30</sup>, in agreement with siRNA *PRPF31* knockdown approaches performed in human organotypic or cell line cultures<sup>24,31–33</sup>.

In this study, we present a substantial iPSC resource from both clinically asymptomatic carriers and affected *PRPF31* patients caused by two different mutations as well as isogenic controls, developed to study *PRPF31*-associated RP and therapeutic response. Based on a robust retinal differentiation protocol established in our laboratory<sup>34,35</sup>, we clearly demonstrate a defective RPE phenotype and a photoreceptor cell death in 3D retinal organoids linked to the presence of *PRPF31* mutation, both of which can be prevented by *PRPF31* gene supplementation using CRISPR/Cas9 strategy. We further demonstrate that the AAV-mediated gene therapy could effectively rescue the *PRPF31* mutation-induced photoreceptor cell death.

## RESULTS

### Derivation and characterization of PRPF31-iPSCs.

We derived fibroblasts from skin biopsies of two patients with genotype and phenotype-confirmed RP who harboured mutations in *PRPF31*, either duplication in exon 8 (c.709\_734dup) referred as Cys247X or a deletion in exon 4 (c.269\_273del) referred to as Tyr90CysfsX21, both causing premature termination<sup>10</sup> (Supplementary Fig. 1A and 2A). To establish control iPSC lines, skin biopsy from an unaffected Cys247X family-related member was processed in parallel. Dermal fibroblasts were reprogrammed using non-integrative Sendai viruses expressing the reprogramming factors *OCT4*, *KLF4*, *SOX2* and *C-MYC*. Specific Sanger sequencing of generated iPSCs confirmed the presence of the mutation in the *PRPF31* gene for RP patients and homozygous reference sequence in the control (Supplementary Fig. 1A and 2A). Expanded hiPSC colonies displayed typical ES cell-like colony morphology, developed alkaline phosphatase activity (Supplementary Fig. 1C) and expressed pluripotency markers OCT4, SSEA4, NANOG and TRA1-60 (Supplementary Fig. 1D and 2D). These iPSCs did not exhibit any genomic abnormalities (Supplementary Fig. 1E and 2C) and showed complete silencing of transgenes (Supplementary Fig. 1F). Finally, both patient-specific (Cys247X and Tyr90CysfsX21) and control iPSCs were able to differentiate into the three embryonic germ or cell layers evaluated by teratoma assay (Supplementary Fig. 1G) or *in vitro* differentiation (Supplementary Fig. 2E).

In order to generate an isogenic iPSC line, we repaired the c.709\_734dup mutation (Cys247X) by CRISPR/Cas9 genome editing. A single-guide RNA (sgRNAs) targeting the duplication in exon 8 and an ssODN template with the reference sequence were designed with homology arms on each side of the mutation region (Supplementary Fig. 3A). Around three hundred iPSC clones were selected and tested by PCR and eleven candidates identified by PCR (Supplementary Fig. 3B) were sequenced to confirm gene editing of *PRPF31*. To rule out any major chromosomal rearrangements that might have resulted from nucleofection or single-cell culture, we assessed the genomic integrity of the corrected iPSCs at mutational hotspots by the iCS-digital Pluri test, and selected one corrected iPSC clone that retained

normal genomic stability (Supplementary Fig. 3C and 3D). This clone referred to as Cys247X-Isogenic expressed pluripotency-associated markers OCT4, NANOG, SSEA4 and TRA-1-60 (Supplementary Fig. 3E). We also excluded potential off-target effects (Supplementary Data 1).

**RPE cells derived from clinically affected *PRPF31* patient cells have structural abnormalities and functional defects.**

IPSCs were differentiated into RPE cells using our previously reported retinal differentiation protocol<sup>34</sup>. For each experiment, RPE cells carrying *PRPF31* mutations (Cys247X and Tyr90CysfsX21) were grown for the same period of time and passaged in parallel with RPE cells derived from the unaffected family-related member (Control) and from the isogenic control (Cys247X-isogenic). Control and Cys247X-Isogenic iPSC-derived RPE (iRPE) cells formed after 30 days a confluent cell monolayer that displayed the classical honeycomb morphology with characteristic polygonal and pigmented cells (Figure 1a). However, iRPE cells from RP patients (Cys247X and Tyr90CysfsX21) did not properly proliferate, had less cell-to-cell contacts, and seemed to be less adhesive leading to the appearance of many cell-free areas in the dish (Figure 1a). Immunolabeling for tight-junction zonula occludens (ZO1) showed an irregular staining and revealed a discontinuous pattern of the tight junctions in Cys247X and Tyr90CysfsX21 iRPE cells, whereas Control and Cys247X-Isogenic iRPE cells showed a typical epithelial morphology with a clear discerned labelling in the cell membrane tight junctions (Figure 1b). *PRPF31*-mutated iRPE cells displayed an impaired polarization with the mis-localization of both apical protein EZRIN and the basolateral protein BEST1 that did not appear restricted to their normal localization (Figure 1c). Ultrastructural study by TEM and SEM revealed that both Control and Cys247X iRPE cells had basal nuclei, apical microvilli, melanin granules, and tight junctions between adjoining cells near the apical part of the cells. However, no clear desmosomes and the absence of basal membranes were observed only in Cys247X iRPE cells (Figure 1d). To address a fundamental aspect of RPE cell function we assessed the ability of cells to carry out phagocytosis of FITC-labelled POS. A pronounced defect was observed in Cys247X and Tyr90CysfsX21 iRPE cells, with a 2-fold decreased in POS internalization compared to

Control and Cys247X-Isogenic iRPE cells (Figure 5e, 5f). RPE cells carrying *PRPF31* mutations also displayed an impaired capacity to establish a tight epithelial barrier. Indeed, no significant transepithelial electrical resistance (TER) was recorded for Cys247X and Tyr90CysfsX21 iRPE cells during the 13 weeks of cultures (Figure 1g), as expected due to the morphological appearance of the mutated RPE monolayer (Figure 1a). Western blot analysis showed a 5-fold decrease in *PRPF31* protein expression in Cys247X and Tyr90CysfsX21 iRPE cells compared to Control and Cys247X-Isogenic iRPE cells (Figure 1h, 1i), suggesting that a very low protein level of *PRPF31* could explain the defective phenotype observed in *PRPF31*-mutated iRPE cells.

### ***PRPF31* haploinsufficiency leads to RPE phenotype**

Haploinsufficiency has been suggested as a potential pathogenic mechanism to explain the incomplete penetrance of the *PRPF31*-associated phenotype<sup>12,16,36</sup>. It has been hypothesized that asymptomatic mutation carriers might express higher expression of the normal *PRPF31* allele depending on the nature of both mutant and normal inherited alleles<sup>12</sup>. To test this hypothesis, we used an iPSC line previously derived from fibroblasts of an asymptomatic patient harbouring the *PRPF31* c.709\_734dup mutation, referred to as Cys247X-Asymptomatic<sup>37</sup>. Furthermore, to investigate whether a higher level of *PRPF31* expression might be sufficient to reverse the phenotype, we engineered by CRISPR/Cas9 Knock-In iPSC lines into the PPP1R12C locus (referred to as AAVS1 site), in which a normal copy of the human *PRPF31* under the control of CAG ubiquitous promoter was inserted in both *PRPF31*-mutated iPSC lines Cys247X and Tyr90CysfsX21 (Supplementary Fig. 4A). For each *PRPF31*-mutated iPSC line, we selected a puromycin-resistant clone, carrying only one copy of the insert in the AAVS1 locus (Supplementary Fig. 4B). These clones referred to as Cys247X-KI and Tyr90CysfsX21-KI showed normal morphology (Supplementary Fig. 4C), absence of major chromosomal rearrangements (Supplementary Fig. 4D) and expressed pluripotency-associated markers OCT4, NANOG, SSEA4 and TRA-1-60 (Supplementary Fig. 4E).

Both Cys247X-Asymptomatic, Cys247X-KI and Tyr90CysfsX21-KI iPSCs subjected to RPE cell differentiation formed a confluent cell monolayer displaying the classical RPE morphology (Figure 2a) with clear cell membrane tight junctions identified by ZO-1 immunolabeling (Figure 2b). POS phagocytosis assay, showed similar internalisation of POS in Cys247X-asymptomatic iRPE cells as in control cells. Both Cys247X-KI and Tyr90CysfsX21-KI iRPE cells presented normal POS internalization compared to their related *PRPF31*-mutated cells, with also a significant improvement in POS binding (Figure 2c, 2d). Recurrent measurements taken over three months showed a significant increase in TER for the Cys247X-Asymptomatic iRPE cells (near 150 ohm/cm<sup>2</sup>) after 8 weeks of differentiation, in contrast to Cys247X iRPE cells that presented no significant TER (Figure 2e). A TER value of the same order of magnitude as the one observed in control iRPE cells can be recorded in *PRPF31* knock-in (Cys247X-KI and Tyr90CysfsX21) iRPE cells (Figure 2e), suggesting the requirement of sufficient threshold of *PRPF31* to maintain RPE functionality. Indeed, western blot analysis confirmed a significantly higher level of *PRPF31* protein expression in Cys247X-Asymptomatic and in both Cys247X-KI and Tyr90CysfsX21-KI iRPE cells (Figure 2f, 2g).

### **Progressive photoreceptor degeneration in retinal organoids derived from clinically affected *PRPF31* patient cells.**

Different iPSCs carrying *PRPF31* mutation (Cys247X and Tyr90cysfsX21), related control (unaffected family-related member) and isogenic control (Cys247X-Iso) were differentiated into pseudo-laminated retinal organoids using our recently optimized retinal differentiation protocol<sup>35</sup> in order to follow photoreceptor cell maturation and/or cell death between 100 and 200 days of culture. In early retinal organoids, no significant difference was observed for NRL (Figure 3a) nor human cone arrestin (hCAR) labelling (Figure 3d) respectively after 100 and 130 days of culture, suggesting that *PRPF31* mutations did not affect rod and cone photoreceptor differentiation. However, a striking decrease of NRL staining occurred after D130 in Cys247X and Tyr90CysfsX21 retinal organoids (Figure 3a), with a decrease in the number of NRL-positive rods reaching less than 10% in these structures at D175 (Figure 3c). A

similar degenerative profile of rods was observed with rhodopsin staining (Figure 3a, 3d), showing also a severe alteration of rod morphology in particular outer segment and synaptic terminal regions in the presence of *PRPF31* mutations (Figure 3b). A significant decrease in hCAR-positive cones was observed by immunostaining at D175 and D200 in Cys247X and Tyr90CysfsX21 retinal organoids compared to organoids derived from control and isogenic corrected iPSCs (Figure 3d, 3f). The relatively late morphological changes in cone photoreceptors (Figure 3e) and their later cell death suggest that cones may undergo a degenerative process following rod cell death as observed in RP patients. Importantly, the similar profile of rod and cone maturation and the absence of photoreceptor cell degeneration in Cys247X-Isogenic and Control organoids confirmed that the RP phenotype observed in *PRPF31*-mutated organoids is solely due to the presence of the *PRPF31* mutation. Western blot analysis performed at D130 showed a strong decrease in PRPF31 protein expression in Cys247X and Tyr90CysfsX21 organoids compared to Control and Cys247X-Isogenic organoids (Figure 4a, 4b). This suggest that the typical RP phenotype observed in *PRPF31*-mutated retinal organoids is related to a significant lower level of PRPF31 protein, which was detected before the photoreceptor degeneration became too severe. Positive staining for the cleaved Caspase-3 (Cleaved CASP-3) confirmed the presence of apoptotic cells through the Outer Nuclear Layer-like of *PRPF31*-mutated retinal organoids (Cys247X) (Figure 4c). Regarding the other cell types present in retinal organoids, immunolabeling with bipolar cell (VSX2, PKC $\alpha$ ) and Müller glial cell (CRALBP) markers revealed no differences between *PRPF31*-mutated and Control retinal organoids (Figure 4d), thus confirming that the retinal degeneration due to *PRPF31* mutations is restricted to photoreceptors.

### **RP-like phenotype observed in retinal organoids is due to PRPF31 haploinsufficiency**

As for previously reported RPE phenotype, we have investigated if an haploinsufficiency mechanism could explain PRPF31-related photoreceptor degeneration using Cys247X-Asymptomatic and PRPF31-KI iPSCs. Early- and late-stage retinal organoids were immunostained with early and mature rod markers NRL and RHO, respectively and with the cone marker hCAR (Figure 5a, 5b). From D130 to

D175, when rod degeneration is observed in Cys247X retinal organoids, the percentage of NRL-positive rods was significantly higher in Cys247X-Asymptomatic, Cys247X-KI and Tyr90CysfsX21-KI retinal organoids than in Cys247X organoids (Figure 5c). The same observation was made for cone photoreceptors at D200, where retinal organoids derived from unaffected carrier of PRPF31 mutation (Cys247X-Asymptomatic) or with a supplementary copy of wildtype *PRPF31* (Cys247X-KI and Tyr90CysfsX21-KI) displayed around 50% more hCAR-positive cells (Figure 5d). The absence of this RP phenotype in retinal organoids derived from Cys247X-Asymptomatic and PRPF31-KI (Cys247X-KI and Tyr90CysfsX21-KI) iPSCs was linked to a significant higher level of PRPF31 protein expression. Indeed, Western blot analysis demonstrated a 5- to 7-fold increase in PRPF31 expression between Cys247X and Cys247X-Asympto, Cys247X and Cys247-KI, and Tyr90CysfsX21 and Tyr90CysfsX21-KI D130 retinal organoids (Figure 5e, 5f).

#### **AAV-driven PRPF31 gene augmentation improves photoreceptor cell survival**

From the observations obtained with the KI approach by CRISPR/Cas9 approach, we tested whether AAV-mediated *PRPF31* gene augmentation can rescue this degenerative phenotype in retinal organoids. The variant AAV-7m8 was chosen for its high transduction efficiency and long-lasting expression after infection without compromising cell viability when applied to iPSC-derived retinal organoids<sup>38,39</sup>. The optimal balance between high efficiency and viability was determined using AAV2-7m8-GFP (AAV-GFP), by transducing retinal organoids at D85, a stage before photoreceptor degeneration. The clear GFP staining detected on D175 retinal organoid cryosections confirmed that this approach was particularly efficient to transduce the ONL-like structure from retinal organoids (Supplementary Figure 5) where photoreceptors are mainly located. In addition, no toxicity effects or morphological changes were observed. Using AAV2-7m8-*PRPF31* vector (AAV-*PRPF31*) on retinal organoids carrying *PRPF31* mutation (Cys247X or Tyr90CysfsX21), we were able to rescue both rod and cone degeneration that was normally clearly observed at D175 (Figure 6a, 6b). Quantification of rods and cones demonstrated that AAV-*PRPF31*-transduced retinal organoids displayed around 40% of NRL-

positive and 20% of hCAR-positive cells at D175, allowing the presence of 75% and 50% more rods and cones respectively than untreated organoids (Figure 6c, 6d). Western blot analysis confirmed that after AAV treatment, PRPF31 expression increased 10- to 15-fold compared to endogenous PRPF31 expression. These results demonstrated that increasing PRPF31 expression levels directly in retinal organoids is efficient and sufficient to prevent photoreceptor degeneration.

### **Whole transcriptome analysis from iRPE cells reveals altered expression of genes related to cell adhesion and extracellular matrix.**

In order to assess the transcriptional changes associated with the defective RPE phenotype observed in iRPE cells carrying the *PRPF31* mutation, we performed whole transcriptome sequencing using biological triplicates from Control, Cys247X-Asymptomatic (Cys247X-As) and Cys247X iRPE cells. Analysis of the expression level of well-known RPE-specific genes first confirmed the identity of iRPE cells (Supplementary Figure 6). Filtering of the differentially expressed genes (DEGs) with a fold change (FC) greater or lesser than 2, an FDR (False Discovery Rate) lower than 0.05 and a minimum expression of five TPM led to the identification of 190 DEGs for Cys247X vs Control and 545 DEGs for Cys247X vs Cys247X-As (Figure 7a). Hierarchical clustering based on *z-score* allowed the selection of 6 clusters where genes are differentially expressed between Cys247X and both Control and Cys247X-As RPE cells (Figure 7b). These 6 clusters encompassed 337 DEGs including several adhesion molecules such as protocadherins/cadherins, which were found among the most differentially expressed in iRPE cells carrying a *PRPF31* mutation (Figure 7a and Supplementary Data 2). Pathway enrichment analysis of the selected DEGs confirmed a large deregulation of extracellular matrix genes and genes related to cell adhesion, which could be related to the defective adhesion phenotype (Figures 1 and 2). Other identified pathways related to transport, pigment cell differentiation, and cytoskeleton were also in line with our cellular observations (Figure 7c). Circular visualization based on the calculated *z-score* indicated that most of enriched pathways included up-regulated DEGs in Cys247X iRPE cells, including some genes belonging to apoptotic cleavage of cellular proteins (Figure 7d). Genes related to the

extracellular matrix were mostly downregulated (11/16). Based on our whole transcriptome analysis, the differential expression on few selected genes belonging to the most relevant enrichment pathways, were confirmed by qRT-PCR (Figure 7e). Importantly, expression of these 9 deregulated genes was back to control levels in the isogenic Cys247X iRPE cells confirming the deregulation of their expression is due to the presence of *PRPF31* mutations. Interestingly, expression of these genes in iRPE cells from unaffected carrier (Cys247X-As) was very similar to the control, which agrees with the lack of disease observed in asymptomatic carriers.

### **Whole transcriptome analysis from retinal organoids reveals altered expression of genes related to cell adhesion, photoreceptor outer segment and cilia.**

To detect early transcriptional changes prior photoreceptor degeneration, we also performed whole transcriptome sequencing on D100 retinal organoids derived from Control, Cys247X-Asymptomatic (Cys247X-As) and Cys247X iPSCs. Filtering of the DEGs with a FC greater or lesser than 2, a *P-value* lower than 0.05 and a minimum expression of five TPM in one group led to the identification of 567 DEGs for Cys247X vs Control, 704 DEGs for Cys247X vs Cys247X-As and 547 DEGs for Cys247X vs Cys247X-Isogenic (Figure 8a). Hierarchical clustering based on *z-score* allowed the selection of 7 clusters in which the 322 identified DEGs showed similar expression levels between Cys247X-Iso and Control as well as Cys247X-As but a different one in Cys247X (Figure 8b and Supplementary Data 3). Pathway enrichment analysis of the selected DEGs revealed significant deregulation of genes related to visual perception, eye development, POS and cilia (Figure 8c). They also encompassed 14 genes coding for crystallin family members, known to be induced following retinal stress/injury<sup>40</sup>. Circular visualization of selected enriched pathways of interest indicated that a vast majority of them included up-regulated DEGs in Cys247X based on the calculated *z-score* (Figure 8d). The only pathway with a positive *z-score* included genes coding for proteins located in the POS indicating that *PRPF31* mutations led to the downregulation of genes involved in the phototransduction. Based on our whole transcriptome analysis, the differential expression on few selected genes related to the most relevant

identified pathways in retinal organoids were confirmed by qRT-PCR (Figure 8e). Altogether our results suggest that the early defects caused by *PRPF31* mutations concerned genes related to photoreceptor homeostasis and particularly outer segment formation/maintenance and cilia.

### **Splicing defects in iRPE cells and retinal organoids carrying *PRPF31* mutations.**

Based on the role of *PRPF31* as a splicing factor, we used our whole transcriptome data from iRPE cells and retinal organoids at D100 to identify differences in splicing events between Cys247X patients (affected) and others (control, asymptomatic carrier and isogenic corrected). Using rMATS software and filtering parameters of a minimum PSI value of 10%, a deltaPSI of 10% and an FDR value lower than 0.05, we identified 2233 splicing events in iRPE cells for Cys247X vs Control, 760 for Cys247X vs Cys247X-As and 1660 for Cys247X-As vs Control (Figure 9a). We selected significant splicing events occurring in both comparisons for Cys247X vs Control, and Cys247X vs Cys247X-As but not in Cys247X-As vs Control. Such approach led to the identification of 230 splicing events altering a total of 152 unique genes (Supplementary Data 4). More than half of them corresponded to exon skipping events and around 22% to mutually exclusive exons (Figure 9b). GO enrichment analysis of biological process, cell compartment and molecular function showed that Cys247X iRPE cells had significant differential exon usage for transcripts involved in cytoskeleton (actin filament-based process, sarcomere, actin cytoskeleton, cell adhesion and actin binding) (Figure 9c). These observations corroborate with the defective RPE phenotype observed in Cys247X iRPE cells. Interestingly, alternative splicing occurred also on transcripts related to mRNA processing including four Ribosomal Binding Motif protein-family members suggesting a role of the *PRPF31* splicing factor in the regulation of the mRNA processing machinery. Using Sashimi plots (Figure 9d), we confirmed splicing defects for *ITGA6* (skipped exon) and *BEST1* (alternative 5' splice sites), important genes associated with RPE homeostasis<sup>41</sup>.

For retinal organoids, we used the same filtering parameters on rMATS data to compare cells derived from affected patient (Cys247X) and isogenic corrected (Cys247X-Iso) iPSCs. We also filtered out genes with a TPM value lower than 5 in one group to keep splicing events on genes expressed at a significant

level in the target cells. As such, we identified 1049 differential splicing events corresponding to 600 unique genes (Figure 10a and Supplementary Data 5). Among the 5 types of events detected, a large majority corresponded either to exon skipping (38%) or to mutually exclusive exons (42%). GO enrichment analysis of biological process, showed that Cys247X retinal organoids had significant differential exon usage for transcripts involved in cytoskeleton (microtubule cytoskeleton organization, actin filament), cilia (cilium assembly) and mRNA regulation (ribonucleoprotein complex biogenesis, mRNA transport, translation) (Figure 10b, c). Identified GO enrichment analysis for cell compartment and molecular function confirmed the splicing alteration for transcripts related to previously identified biological processes. Using Sashimi plots (Figure 10d), we confirmed splicing defects for the integrin *CCDC66* (MXE) and *CDHR1* (skipped exon), genes which mutations have been associated with retinopathies<sup>42,43</sup>.

Overall, exon usage analysis in iRPE cells and retinal organoids led to the identification of altered transcripts belonging to common pathways related to cytoskeleton and mRNA regulation. In retinal organoids, we specifically identified splicing defects occurring in transcripts coding for ciliary protein.

## DISCUSSION

Due to the ubiquitous nature of RNA splicing, there is much debate regarding the underlying disease mechanism by which mutations in *PRPF31*, lead to a retinal specific phenotype. Several studies using human post-mortem retinas or patient lymphoblast cell lines showed the absence of specific *PRPF31* isoforms in the retina and both steady-state levels of snRNAs and processed pre-mRNAs highest in the retina, indicating the requirement of a particularly elevated splicing activity in the retina<sup>22</sup>. Furthermore, the identification of which retinal cell type (RPE and/or photoreceptors) is primarily affected by mutations in the RNA splicing factors lead to a scientific debate<sup>13,44</sup>. To gain insights into *PRPF31*-related RP, we characterized the cellular phenotype of RPE cells and retinal organoids derived from both clinically asymptomatic carriers and affected *PRPF31* patients carrying two different

mutations. We demonstrated that *PRPF31* mutations affect both RPE cells and photoreceptors, suggesting that photoreceptor degeneration could be due to a combination of photoreceptor-specific autonomous mechanism and a consequence of RPE alteration.

The different *PRPF31*-mutated iPSCs generated in our study expressed pluripotent markers and presented classical properties of human pluripotent stem cells, indicating that mutations in the ubiquitous *PRPF31* gene did not affect reprogramming of pluripotent state *per se*. Furthermore, we were able to generate RPE cells and pseudo laminated retinal organoids from several iPSC lines carrying different *PRPF31* mutations, confirming that the differentiation process is not impaired, as recently reported for different *PRPF8* and *PRPF31* iPSCs<sup>29,30,45</sup>.

However, the RPE cells differentiated from *PRPF31*-mutated iPSC lines revealed several important morphological changes including disorganized cell-to-cell contact, absence of desmosomes and basal membranes, and impaired polarization that could explain their altered TER and reduced phagocytic activity. These observations are consistent with adhesion defects and significant decrease in phagocytosis reported in primary RPE cultures of *Prpf31 +/-* mice and in a human RPE cell line in which *PRPF31* expression was repressed by RNA silencing<sup>24</sup>. Interestingly, previous work using iPSCs carrying different *PRPF31* mutations<sup>29,30</sup>, revealed the same defects in polarity and phagocytosis but only in RPE cells derived from iPSCs of patient with mild clinical severity<sup>29</sup>. The incomplete penetrance of *PRPF31*-related RP could explain these correlations between cellular phenotype and genotype but further investigations by including more patients are required to validate this hypothesis.

All the *PRPF31*-mutated iPSC lines used in this study successfully generated 3D laminated retinal organoids with rod and cone photoreceptors. Strikingly, we observed a significant decrease in the number of photoreceptors, first of rods after 100 days of differentiation, followed by a decrease in the number of cones after 150 days, with a disorganization and thinning of the presumptive ONL in all organoids derived from affected *PRPF31* patients iPSCs. The presence of relatively early NRL-positive rods, cone arrestin-positive cones, and other late-onset cellular markers such as PKC $\alpha$ -positive bipolar

cells and Müller glial cells up to 200 days of differentiation, confirms that it is not linked to a developmental delay, but actually reflects the expected human RP phenotype (degeneration of rods followed by secondary loss of cones). Our iPSC-derived disease model is the first that is remarkably similar to splicing factors-related RP. A relatively similar photoreceptor degenerative phenotype has only been reported in the zebrafish by interfering with *Prfp31* expression<sup>46</sup>, while no defective photoreceptor phenotype was reported in different mouse models of splicing factors-linked RP<sup>23,24,44</sup>. It is not known why *Prpf31* mutant mice have only an RPE degenerative phenotype and do not present the key phenotype of *PRPF31*-related RP patients, *i.e.* the photoreceptor cell death. The higher level of *Prpf31* expression in murine RPE cells than in the neural retina could partly explain this observation<sup>47</sup>.

We have generated iPSCs from two patients carrying different *PRPF31* mutations and observed a similar cell phenotype in iRPE cells and retinal organoids for the two mutations. These *PRPF31* mutations lead to the occurrence of a premature stop codon that probably results in null alleles and decreases amounts of functional *PRPF31* protein in affected cells, as we observed by Western blot in RPE cells and retinal organoids. Notably, we generated isogenic CRISPR/Cas9-repaired iPSCs to confirm specificity of the genotype-phenotype relationships. Precise gene repair of *PRPF31* locus (exon 8) generated isogenic clones in which all the cellular and structural deficiencies observed in affected patient-derived RPE cells and retinal organoids were reversed, demonstrating that the phenotypic differences are specific to the presence of *PRPF31* mutation. The *PRPF31* protein expression level in the RPE cells and retinal organoids after correction is identical to that of the control, confirming that a low *PRPF31* expression level can explain the defective phenotypes observed in *PRPF31*-mutated cells. Haploinsufficiency due to the loss of function of the mutated protein or degradation of mutant mRNA nonsense-mediated decay has been proposed as the major cause of RP linked to *PRPF31* mutations<sup>16,17,48</sup>. Investigation of *PRPF31* protein abundance in lymphoblastoid cell lines derived from patients carrying different mutations showed a decrease in its expression level<sup>17,48</sup>. Our results demonstrated for the first time that the level of *PRPF31* protein is significantly reduced in the retinal

cell types of patients compared to those derived from control patients, and that defective phenotypes observed in RPE cells and retinal organoids is correlated to this reduced PRPF31 expression level. This was corroborated by phenotype analysis of retinal derivatives from asymptomatic patient iPSCs, demonstrating the absence of a defective phenotype in both RPE cells and retinal organoids.

Since most of the currently identified mutations in *PRPF31* cause disease via haploinsufficiency, one of the most obvious potential therapeutic strategy is gene augmentation, which has the advantage of not being mutation-specific and can therefore address the large number of mutations described for *PRPF31*<sup>13</sup>. Our CRISPR/Cas9 knock-in approach in patient iPSCs demonstrated that insertion of a functional copy of *PRPF31* into a specific safe locus of iPSCs from PRPF31 RP patients restored the expression level of the PRPF31 protein and totally prevented the defective phenotype of RPE cells and photoreceptors in retinal organoids. Although CRISPR/Cas9-mediated *in situ gene* editing is becoming a popular methodology, we also achieved a more conventional approach for future clinical trials using AAV vectors. The use of AAV2-7m8 variant optimized for photoreceptor transduction<sup>38,49</sup> restored the PRPF31 protein expression level and thus prevented rod and cone photoreceptor degeneration in mature retinal organoids transduced before the first signs of degeneration. This result opens up new perspectives for the treatment of *PRPF31*-related RP. It would be interesting to determine whether this strategy is also effective at later stages of the disease, when photoreceptor degeneration has already been initiated, in order to identify a time window for future gene therapy intervention. As the same rescue effect was recently reported in RPE cells<sup>30</sup>, the use of an AAV vector targeting both photoreceptors and RPE cells, such as the 7m8 variant<sup>49</sup> presented here, may be advantageous to simultaneously target both affected cell types by subretinal injection. Establishing a safe dose range for PRPF31 overexpression is an important future milestone prior moving to the clinic, since it is conceivable that higher ratios of PRPF31 production could affect adversely the splicing machinery and potentially photoreceptor homeostasis and survival.

Ultimately, knowledge of the molecular pathways affected by mutations in *PRPF31* in iPSC-derived retinal cells should help developing therapies to slow or reverse RP. In this context, the in-depth

transcriptomic study of iPSC-derived RPE cells and retinal organoids allowed us to identify differentially expressed and/or spliced transcripts correlated with the phenotypic alterations observed at the cellular level. Mainly genes involved in cytoskeleton organization, focal adhesion, cell-cell adhesion, or extracellular matrix for RPE cells; and visual perception pathways, photoreceptor outer segments, cilia or apoptosis mechanisms for retinal organoids. Notably, impaired splicing events are observed in different genes involved in RNA processing pathways including the splicing program itself, suggesting that exacerbation of splicing deficiencies contributes to the defective phenotype observed in both iPSC-derived RPE cells and retinal organoids and thus probably in *PRPF31*-related RP patients. These results are in agreement with those obtained previously in RPE cells and retinal organoids derived from iPSCs of patients carrying different *PRPF31* mutations<sup>29</sup>, or on human retinal explants where *PRPF31* has been silenced<sup>31</sup>. Identification of the mis-spliced transcripts responsible for the defective phenotype associated with *PRPF31* mutations in iPSC retinal derivatives could also help to develop pharmacological therapies to slow or reverse RP.

In summary our study provides insights into the use of iPSC-derived cells and organoids for retinal disease modelling, with a phenotype related to mutations in splicing factors and in an effort to identify potential pathomechanisms of retinal degeneration. Furthermore, we highlighted how the restoration of *PRPF31* expression can reverse this phenotype, paving the way of a potential mutation-independent AAV-based gene therapy for the treatment of *PRPF31*-related RP.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to Dr S. Mohand-Said and D. Dagostinoz (CIC1423, Hôpital des Quinze-Vingts) for their help in patient recruitments. We acknowledge V. Bazin and G. Toutirais from the electron microscopy facility (Sorbonne Université) for performing SEM and TEM analysis, C. Condroyer for sequencing analysis and E. Vanoni for her help with the phagocytosis assay. We thank N. Oudrhiri and A. Bennaceur (GHU Paris-Sud APHP) for the conventional cytogenetic analysis, Dr. O. Feraud and Prof. F. Griscelli

(ESTeam Paris Sud/U935 INGESTEM ANR Programme Investissement d'Avenir) for the teratoma assay and Dr. C. Craft (Mary D. Allen Laboratory for Vision Research, USC ROSKI Eye Institute) for the cone arrestin antibody. This study was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Sorbonne Université, LABEX LifeSenses (ANR-10-LABX-65), IHU FOReSIGHT (ANR-18-IAHU-01), ANR grants (ANR-15-RHUS-001 and ANR-17-CE18-0004-01), Fondation Maladies Rares and Retina France association and by the Foundation Fighting Blindness (Individual Investigator Award to LCB).

#### **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

A.R: conception and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing. A.S-B: conception and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation. C.N: collection and assembly of data, data analysis and interpretation. A.T, Y.T: collection and assembly of data. Y.R, S.R, J-A.S, G.O,: provision of study material, data analysis and interpretation. EF.N, LC. B, I.A: provision of study material, collection and assembly of data, data analysis and interpretation and contribution to manuscript writing. J.R: collection and assembly of data, data analysis and interpretation and manuscript writing. O.G: conception and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing and financial support. All authors approved the final version of the manuscript

#### **COMPETING INTERESTS STATEMENT**

The authors have no disclosures.

## **METHODS**

### **Human subjects**

The patients from this study were recruited following informed consent under the approval by French regulatory agencies: CPP Ile de France (2012-A01333–40; P12-02) and the French Agency for the Safety of Health Products (ANSM) (B121362-32).

### **Human fibroblast cultures and reprogramming**

Human fibroblasts were cultured and reprogrammed using the CytoTune Sendai reprogramming vectors Oct4, Klf4, Sox2 and c-Myc (Thermo Fisher Scientific) as previously reported<sup>37</sup>. The emergent iPSC colonies were picked under a stereomicroscope and expanded onto mitomycin human foreskin feeder layers. After generation of a frozen stocks, iPSCs were preferentially adapted and cultured in feeder-free conditions<sup>34</sup>. After ten passages, the clearance of the exogenous reprogramming factors and Sendai virus genome was confirmed by qPCR following the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific). Absence of mycoplasma contamination was verified by the MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (selective biochemical test of mycoplasma enzymes) according to the manufacturer's instructions (Lonza).

### **iPSC culture**

Human iPSCs were routinely cultured on truncated recombinant human vitronectin (rhVTN-N)-coated dishes with mTeSR™1 medium (StemCell™ Technologies) at 37°C in a standard 5% CO<sub>2</sub> / 95% air incubator with a daily medium change. iPSCs were passaged once a week with the enzyme-free Gentle cell dissociation reagent (StemCell™ Technologies) at RT for 6 min. Detached cell aggregates were collected in mTeSR™1 medium and carefully pipetted up and down to obtain uniform suspensions of cell aggregates that are transferred to fresh rhVTN-coated plates in a 1:10 to 1:60 ratio. iPSCs can be cryopreserved with CryoStor CS10 cell freezing medium (StemCell™ Technologies).

### **Karyotype analysis**

Actively growing hiPSC colonies (80% confluency) were treated with colchicin (20 mg/ml; Eurobio) for 90 min at 37°C. Cells were dissociated with 0.05% trypsin-EDTA and incubated in 75 mM KCl (Sigma-Aldrich) for 10 min at 37 °C, before fixation with 3:1 methyl alcohol/glacial acetic acid. Fixed cells were hybridized overnight at 37°C with a denatured “cocktail painting mFISH” probe (Meta-Systems). Slides were washed in successive baths of 1X SSC and 0.4X SSC, and nuclei were stained with 250 ng/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Biotinylated probes were revealed using a Cy5 MetaSystems B-tect detection kit (MetaSystems). 10 to 20 metaphases were captured using a Zeiss Z1 fluorescence microscope equipped with a UV HBO 100-W lamp coupled to an AxioCam camera (Carl Zeiss). All of the analysed metaphases were karyotyped using the MetaSystems Isis software (MetaSystems).

### ***In vitro* and *in vivo* three germ layer differentiation**

To validate the pluripotency of hiPSC lines, a teratoma-formation assay was performed as previously described<sup>50</sup> with slight modifications. Briefly,  $1 \times 10^6$  to  $2 \times 10^6$  cells were injected in the rear leg muscle of 6-week-old NOD Scid gamma (NSG) mice (Charles River). Animals were killed according to the recommendations of our local ethical and animal care committee (Authorization #75-865 delivered on April 30<sup>th</sup>, 2010 by the Ministry of Agriculture). After 9–10 weeks, teratomas were dissected and fixed in 4% paraformaldehyde. Samples were then embedded in paraffin, and sections were stained with hematoxylin/eosin.

Pluripotent state of iPSCs was also assessed *in vitro* using the STEMdiff<sup>TM</sup> trilineage differentiation kit (StemCell<sup>TM</sup> Technologies) according to the manufacturer's instructions. Briefly, iPSCs were dissociated into single cells using a combination of Gentle Cell Dissociation Reagent (StemCell<sup>TM</sup> Technologies) for 7 min at 37°C and Accutase (Gibco) for 4 min at RT. Cells were plated at a density of 50 cells/cm<sup>2</sup> (mesoderm lineage) or 200 cells/cm<sup>2</sup> (endoderm and ectoderm lineages) on rhVTN-N-coated 12-well plates containing mTeSR<sup>TM</sup>1 medium supplemented with RevitaCell<sup>TM</sup> Supplement. After 24 h, media were aspirated and cells were cultured with appropriate STEMdiff<sup>TM</sup> trilineage medium for 5

(mesoderm and endoderm lineages) or 7 days (ectoderm lineage) with a daily medium change, before cell fixation and assessment of differentiation for each germ layer by immunofluorescence using specific markers (Supplementary Data 6).

### **Mutation screening**

Genomic DNA from control and patients iPSCs were extracted using the Nucleospin Tissue Kit (Macherey-Nagel) following the manufacturer's instructions. PCR amplification flanking *PRPF31* mutations in exons 4 or 8 (Supplementary Data 6) was performed using HOT FIRE Pol DNA Polymerase (Solis BioDyne). PCR products were sequenced using BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) on a 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems).

### **CRISPR/Cas9 correction of the Cys247X *PRPF31* mutation**

Correction of *PRPF31* mutation in the Cys247X iPSCs was achieved by using the CRISPR/ Cas9 system in combination with ssODN as homologous template covering the mutation site. The CRISPOR website tool (<http://crispor.tefor.net>) was used to design the sgRNA sequences and predict off-targets. The sgRNA (Supplementary Data 6), which targets only the mutated sequence and predicted to have low off-targets, was chosen and synthesized using Alt-R guide RNA modifications (Integrated DNA Technologies). The ssODN template with wild-type *PRPF31* sequence was designed manually with 91 bp homology arms on each side of the mutation region (Supplementary Data 6). The Cas9 ribonucleoprotein (RNP) was prepared by incubating Alt-R Cas9 enzyme (Integrated DNA Technologies) with the sgRNA at RT for 15 min following the manufacturer's instructions and the RNP complex was co-transfected in iPSCs carrying the Cys247X mutation in *PRPF31*, by using the Lipofectamine Stem Reagent (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions. ssODN was added 24 h later using the Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Three days after the transfection, iPSCs were dissociated in single cells using a combination of Gentle Cell Dissociation Reagent for 7 min at 37°C and Accutase for 4 min at

RT. Cells were plated at a density of 200, 400 or 600 cells/cm<sup>2</sup> on a rhVTN-N-coated 10-cm diameter culture dish containing 10 ml of mTeSR<sup>TM</sup>1 medium supplemented with RevitaCell<sup>TM</sup> Supplement. After one week, colonies were manually picked up and transferred to a cell culture 96-well cell culture plate. Sub-confluent iPSCs were split in two 96-well plates to allow further culture expansion and DNA isolation using QuickExtract<sup>TM</sup> DNA Extraction Solution (Lucigen). The PCR was composed of 32 cycles including three successive steps at 95°C, 60°C, and 72°C, respectively, for 30 s, 30 s, and 2 min. The genotype was finally visualized after migration of the DNA in a 3% agarose gel (Supplementary Data 6). After validation by sequencing, corrected iPSC lines were selected, pluripotent status was validated by immunostaining for pluripotency markers, and the genomic stability was assessed by detection of recurrent genetic abnormalities using the iCS-digital<sup>TM</sup> PSC test by Stem Genomics (Montpellier, France).

Off-target sequences were predicted using the website tool CRISPOR tool (<http://crispor.tefor.net>). sgRNA off-target sequence was blasted against the human genome reference (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Capture intervals of predicted off target sites were expanded by ~500 bp in both the 5' and 3' directions to design specific primers ensuring accurate detection of any genetic lesion occurring at or near the selected sites. The PCR products were then sequenced to check the off-target effects of sgRNA (Supplementary Data 6).

### **Generation of the AAVS1::CAG-P PRPF31 iPSC line**

To construct a donor plasmid for the expression of PRPF31 under the control of the CMV early enhancer/chicken  $\beta$  actin (CAG) promoter from the AAVS1 locus, AAVS1-cAGGS-EGFP (Addgene #22212)<sup>51</sup> containing the puromycin-resistant gene and EGFP under the control of a CAG promoter between AAVS1 homology arms of 800 bp each (HA-L and HA-R) was modified. The sequence of human *PRPF31* cDNA (NM\_015629) was subcloned by a XbaI/MluI digestion between AAVS1 homology arms of 800 bp each (HA-L and HA-R). We used pX330-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9 (addgene#42230)<sup>52</sup> to construct the CRISPR/Cas9 vector by annealing and ligating in BbsI sites an oligonucleotide pair (5'-

CACCGGGGCCACTAGGGACAGGAT-3' /3'-CCCCGGTGATCCCTGTCCTACAAA-5') encoding a 20-nt AAVS1 guide sequence according to Ran et al.<sup>53</sup>. Plasmids are prepared using a Plasmid MidiPrep kit (Macherey-Nagel) and verified by restriction digestion and gel electrophoresis for identity and integrity, and concentrations determined by NanoDrop detection (Thermo Fisher Scientific) before storage at 1-2 µg/µl in sterile Tris buffer (pH 8.0). The generation of stable cell clones was performed as previously described<sup>54</sup>. hiPSC lines carrying *PRPF31* mutations were grown for 24 h in 6-well plates before overnight transfection at 37°C with CRISPR/Cas9 and donor plasmids using FuGene HD (ratio 1:1:5; Promega). Two days after transfection, selection of recombinant cells was started in the presence of 0.25 µg/ml puromycin (Thermo Fisher Scientific) for the first 48 h and the concentration of puromycin was then increased to 0.5 µg/ml until picking of single colonies. Genomic DNA from puromycin-resistant clones was extracted with NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer instruction. Correct reporter integration was evaluated by PCR using a forward primer upstream to the left arm of AAVS1 of recombination and a reverse primer either within the reporter cassette or in the AAVS1 right homologous arm. The PCR was composed of 32 cycles including three successive steps at 95°C, 60°C, and 72°C, respectively, for 30 s, 30 s, and 2 min. The genotype was finally visualized after migration of the DNA in a 1.2% agarose gel. After validation by sequencing heterozygous integrated iPSC lines were selected, pluripotent status was validated by immunostaining for pluripotency markers, and the genomic stability was assessed by detection of recurrent genetic abnormalities using the iCS-digital<sup>TM</sup> PSC test by Stem Genomics.

### **Retinal differentiation of hiPSCs**

Retinal cell differentiation was carried out as previously described<sup>34,35</sup>. Briefly, iPSCs were expanded to 70-80 % confluence in 6cm diameter culture dishes coated with rhVTN-N in mTeSR<sup>TM</sup>1 medium. At this time, defined as day 0 (D0), iPSC colonies were cultured in the chemically defined TeSR<sup>TM</sup>-E6<sup>TM</sup> medium (StemCell<sup>TM</sup> Technologies). After 2 days, the medium was switched to E6N2 medium composed of

TeSR™-E6 medium, 1% N2 supplement-A (StemCell™ Technologies), 10 units/ml penicillin and 10 µg/ml streptomycin (Thermo Fisher Scientific). The medium was changed every 2-3 days.

#### *Retinal organoids*

On D28, identified self-formed retinal organoids were isolated, using a needle, with the surrounding cells and cultured in ultra-low attachment 24-well-plates (Corning) as floating structures in the ProB27 medium supplemented with 10 ng/ml of animal-free recombinant human FGF2 (Peprotech) and half of the medium was changed every 2-3 days. The ProB27 medium is composed of chemically defined DMEM:Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12, 1:1, L-Glutamine), 1% MEM non-essential amino acids (Thermo Fisher Scientific), 2% B27 supplement (Thermo Fisher Scientific), 10 units/ml penicillin and 10 µg/ml Streptomycin. At D35, retinal organoids were cultured in the absence of FGF2 in the ProB27 medium with 10% FBS (Thermo Fisher Scientific) and 2 mM of Glutamax (Thermo Fisher Scientific) for the next several weeks. To evaluate maturation of photoreceptors, at D84, the retinal organoids were cultured in the ProB27 medium with 2% B27 supplement without vitamin A (Thermo Fisher Scientific) until D200.

#### *Retinal pigment epithelium*

On D28 after retinal organoids isolation, the medium of 6-cm diameter dishes was switched to DMEM:Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12, 1:1, L-Glutamine), with 1% N2-supplement-A, 1% MEM non-essential amino acids, and 10 units/ml penicillin and 10 µg/ml streptomycin (RPE medium). The medium was changed every 2-3 days until the apparition of regions of pigmented cells. Identified patches of pigmented cells were then picked up with a needle, replated onto new cell dishes previously coated with Geltrex® (Thermo Fisher Scientific) and expanded in the RPE medium. At confluency, iPSC-derived RPE cells can be dissociated using TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific) and plated in new coated dishes for amplification or banking.

### **Cell or tissue fixation and cryosection**

RPE cells were fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde (PFA) at 4°C and then washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) before immunostaining. Retinal organoids were fixed for 15 min in 4% PFA at 4°C and then washed twice in PBS. Structures were incubated at 4°C in PBS/30% sucrose (Sigma- Aldrich) until they all sank to the bottom of the well. Structures were embedded in PBS, 7.5% porcine skin gelatine (Sigma-Aldrich), 10% sucrose solution, frozen in isopentane at -70°C and stored at -80°C. 10 µm-thick cryosections were collected (Microm Cryostat) and stored at -80°C.

### **Immunostaining, imaging and cell counting**

Immunofluorescence was performed either on fixed cells or on retinal organoid cryosections. Slides were then incubated for 1 h with a blocking solution (PBS, 0.2% gelatine and 0.1% Triton X-100) at RT (RT). Incubation with the primary antibody (Supplementary Data 6), appropriately diluted in blocking solution, was performed alternatively for 1 h at RT or either overnight at 4°C. Slides were washed four times in PBT (PBS with 0.1% Tween-20) and then incubated for 1 h at RT with appropriate secondary antibody conjugated with either AlexaFluor 488, 594 or 647 (Interchim) diluted at 1:600 in the blocking solution. To counterstain the nuclei, slides were washed twice in PBT, and incubated with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) diluted at 1:1000 in PBS. Finally, slides were washed two times in PBS before mounting with Fluoromount-G (Southern Biotech).

Fluorescent staining signals were captured with a DM6000 microscope (Leica microsystems) equipped with a CDD CoolSNAP-HQ camera (Roper Scientific) or using an Olympus FV1000 confocal microscope equipped with 405, 488 and 515 and 635 pulsing lasers. Acquisitions were done with a variable step size according to objective magnification (1.64 µm at ×20; 0.61 µm at ×40; 0.48 µm at ×60). Images were analysed with the FIJI/ImageJ software, and each illustration corresponds to a Z-projection of all X-Y optical sections.

Quantification of the number of cells immunoreactive for specific markers was performed by manual counting using the FIJI/ImageJ software. A minimum of 9 retinal organoids from 3 independent

differentiation experiments were counted for each condition. The counted areas corresponded to one quarter of the area of the retinal organoid cryosection.

### **Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM).**

RPE cells cultured on transwell (Corning) were fixed with 2% glutaraldehyde (and 1% PFA for TEM-analysed samples) in 0.1M PBS (pH 7.4), for 1h at RT and washed in PBS. For SEM, samples were dehydrated in a graded ethanol series and dried by rinsing with hexamethyldisilazane. Samples were mounted on an aluminium stub with a carbon scotch disc. They were then sputter coated with gold and were observed by the Cambridge Instruments Stereoscan 260 SEM (Leica microsystems). For TEM, samples were post-fixed in 1% osmium-bidistilled water for 1h at RT. After bidistilled water washes, samples were dehydrated in increasing concentrations of ethanol. Samples were then infiltrated in 1:1 ethanol: epon resin for 1h and then 100% epon resin for 48 h at 60°C for polymerization. 70nm-thick sections were cut with an ultracut UCT microtome (Leica microsystems) and picked up on copper rhodium-coated grids. Grids were stained for 2 min in Uranylless (Delta Microscopies) and for 5 min in 0.2 % lead citrate and further analysed on an electron microscope EM 912 OMEGA electron microscope (Carl Zeiss) at 80kV and images were captured with a digital camera (Side-Mounted TEM CCD, Veleta 2kx2k).

### **Western blot analysis**

$1 \times 10^6$  hiPSC-derived RPE cells or 10 retinal organoids were lysed in 100  $\mu$ l of RIPA Lysis Buffer (1% Triton 100X, 1% Sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 50mM HEPES (pH 7,4), 150mM NaCl, 10% Glycerol, 1.5mM  $MgCl_2$ , 1mM EGTA) containing protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich). The mix was then vortexed for 30 min in a cold room. Homogenates were centrifuged (4°C, 10 min, 12000g). Supernatants were then collected to determine protein concentrations using a Bradford protein assay (BPA) with the Infinite M1000 PRO (Tecan). Afterwards, 12  $\mu$ g of proteins were denatured for 5 min at 98°C before migration on an SDS-polyacrylamide gel

(Mini-PROTEAN TGX Precast Gel, Bio-Rad) for 55 min at 150 V and transferred to a nitrocellulose membrane (Trans-blot Turbo Transfer 0.2  $\mu$ m nitrocellulose, Bio-Rad). After transfer, membranes were saturated using a blocking solution (PBS, 0.1% Tween-20 with 5% non-fat powder milk) for 1h at RT, and incubated with the primary antibody (Supplementary Data 6) overnight at 4°C. After 4 washes with PBS-Tween 0.1%, membranes were incubated 1h at RT with the respective anti-HRP mouse or rabbit secondary antibodies (Jackson, 1/10000). Revelation was performed using the Pierce ECL Plus (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's recommendations. Chemiluminescence was detected using the Fusion Fx7 (Vilber Lourmat) and signals were quantified with the ImageJ software.

### **Measurement of the trans-epithelial resistance**

The transepithelial resistance (TER) of iPSC-derived RPE cells seeded at  $10^5$  cells on the porous membrane (Transwell inserts, Corning) coated with Geltrex was performed using an EVOM Epithelial Voltohmmeter (World Precision Instruments) by inserting the shorter and longer tips of the STX2 electrode (World Precision Instruments) in the Transwell apical chamber and in the basolateral chamber respectively. The TER was measured one time per week and values were then reported in  $\Omega$ .cm<sup>2</sup>, resistance reading of the blank (Transwell insert only filled with RPE medium) being subtracted from each RPE cell resistance reading measurements.

### **Phagocytosis assay**

Photoreceptor outer segments (POS) were purified from porcine eyes and covalently labeled with fluorescent dye by incubation with 0.1 mg/ml FITC (isomer-1) according to established procedures<sup>55</sup>. Each well was layered with 100  $\mu$ l of DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific) containing  $1 \times 10^6$  POS particles and was incubated at 37°C for 3 hours before three washes with PBS containing 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.2 mM CaCl<sub>2</sub> (PBS-CM). For exclusive detection of internalized particles, fluorescence of surface-bound FITC-POS was selectively quenched by incubation in 0.2% trypan blue in PBS-CM during 10 min. Cells were then fixed by incubation in ice-cold methanol for 10 min, rehydrated 10 min in PBS-CM, and

incubated with DAPI for 10 min at RT. Fluorescent signals were quantified with the Infinite M1000 Pro (Tecan) microplate reader. The human ARPE-19 cell line was used as a positive control for phagocytic activity and iPSC-derived RPE cells in the absence of POS were used as a negative control.

### **RNA extraction and Taqman assay**

Total RNAs were extracted using the NucleoSpin RNA XS kit (Machery-Nagel), according to the manufacturer's protocol. RNA yields and quality were determined using a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) before storage at -80°C. cDNAs were synthesized from 250 ng of mRNA using the QuantiTect reverse transcription kit (Qiagen) following manufacturer's recommendations. Synthesized cDNAs were diluted 1:20 in DNase-free water before performing quantitative PCR. qRT-PCR analyses were performed on Applied Biosystems real-time PCR systems (7500 Fast System) using a custom TaqMan® Gene expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific). All primers and MGB probes labelled with FAM for amplification were purchased from Thermo Fisher Scientific (Supplementary Data 6). The plates were run according to the following thermal cycling conditions: 2 min at 50°C, 10 min at 95°C; 40 repeats of melting 15 sec at 95°C and annealing/extension 1 min at 60°C. All samples were normalized against the 18S housekeeping gene. Quantification of gene expression was based on the  $\Delta$ Ct Method. Average values were obtained from at least 3 independent biological experiments and 2 technical replicates.

### **Whole transcriptome sequencing (RNA-Seq) and data analysis.**

Total RNAs were extracted using the NucleoSpin RNA XS kit according to the manufacturer's protocol. RNA yields and quality were determined using a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer and an Agilent 2100 Bioanalyzer. RNA-seq analysis was performed for patients from the Cys247X family as triplicate biological repeats (3 different differentiations) in iPSC-derived RPE cells (Control, Cys247X and Cys247X-Asymptomatic) and iPSC-derived retinal organoids at D100 (Control, Cys247X, Cys247X-Isogenic and Cys247X-Asymptomatic).

For RPE cells, RNA-seq libraries were constructed from 1 µg of total RNA using the TruSeq Stranded mRNA Sample Prep (Illumina) and paired-end sequencing of 75 bases length was performed on a HiSeq 4000 system (Illumina). For retinal organoids, RNA-seq libraries were constructed from 1 µg of total RNA using the NEB Next Ultra II Directional RNA (New England Biolabs) and paired-end sequencing of 100 bases length was performed on a Novaseq system (Illumina). Image analysis and base calling is performed using the Illumina Real Time Analysis (3.4.4) software with default parameters. Pass-filtered reads were mapped using STAR 2.7.3a<sup>56</sup> and aligned to Ensembl genome assembly GRCh38 (release 98). This annotation includes cDNA, miRNA, long non-coding RNA, pseudogenes and gene predictions. For differential expression analysis, a count table of the gene features was obtained using FeatureCounts<sup>57</sup>. For gene level analysis, EdgeR was used for normalization, differential expression analysis and to compute TPM (Transcripts Per Million) values<sup>58</sup>. A TPM filtering cutoff of 5 in at least one of the samples was applied.

Alternate splicing analysis was performed using rMATS<sup>59</sup>, allowing the analysis of differential exon usage for distinct type of events (skipped exons, alternative 5' and 3' splice sites, retained introns and mutually exclusive exons). For each comparison being made, sorted BAM files produced by STAR (two-pass) were used to run rMATS with default settings. The identified splicing changes were filtered out using a minimum count of 2 for at least one sample, a false discovery rate (FDR) of less than 0.05 and a change in inclusion-level difference of more than 10%.

Comprehensive gene list analysis, enriched biological pathways, and gene annotation from differential expression and alternate splicing analysis were based on the Gene Ontology classification system using Metascape<sup>60</sup>. R packages were used for data mining, including GOPlot for pathway data graphical representation<sup>61</sup>.

## **AAV production**

To construct the pAAV-CAG-hPRPF31 rescue vector, the human *PRPF31* coding sequence was obtained from NCBI, gene fragments were synthesized (Integrated DNA Technologies) and cloned into a pAAV-CAG backbone. AAV7m8 vectors carrying human *PRPF31* cDNA or GFP were produced in 293AAV cells (Cell Biolabs) using a triple transfection method<sup>62</sup>. Recombinant AAVs were purified by iodixanol gradient ultracentrifugation, buffer exchanged and concentrated with Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (#UFC8100) in D-PBS and titered by quantitative PCR relative to a standard curve using ITR-binding primers<sup>63</sup>.

## **Infection of retinal organoids with AAV**

Retinal organoids at D85 were placed one per well in a 96-well plate containing 50  $\mu$ l of ProB27 medium with 10% FBS and 2 mM of Glutamax and were single-time infected at  $4.10^9$  vg per organoid by direct addition in the culture medium. AAV used presented an engineered capsid, AAV2-7m8<sup>49</sup>, carrying the human *PRPF31* cDNA under the control of the CAG promoter. One day post-infection, 50  $\mu$ l of fresh medium was added per well. As control, infections with AAV2-7m8-CAG-GFP were carried out in the same manner as mentioned above. All infections were performed in sextuplicate, and all data presented is representative of five independent experiments.

## **Statistical analysis**

n corresponds to the number of organoids or images from each independent differentiation; N indicates the number of independent experiments performed (e.g. the number of independent retinal differentiations). Statistical analyses represent the mean of at least three independent experiments. Data were averaged and expressed with means  $\pm$  SD. Statistical analysis was performed using Prism 7 (GraphPad software) with appropriate multiple comparisons with the Kruskal–Wallis test. Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

## REFERENCES

1. Hartong, D. T., Berson, E. L. & Dryja, T. P. Retinitis pigmentosa. *Lancet* **368**, 1795–809 (2006).
2. Verbakel, S. K. *et al.* Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Prog. Retin. Eye Res.* **66**, 157–186 (2018).
3. Daiger, S. P., Sullivan, L. S. & Bowne, S. J. Genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Clin. Genet.* **84**, 132–141 (2013).
4. Pan, X. *et al.* Mutation analysis of pre-mRNA splicing genes in Chinese families with retinitis pigmentosa. *Mol. Vis.* **20**, 770–779 (2014).
5. Saini, S., Robinson, P. N., Singh, J. R. & Vanita, V. A novel 7 bp deletion in PRPF31 associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa with incomplete penetrance in an Indian family. *Exp. Eye Res.* **104**, 82–88 (2012).
6. Sullivan, L. S. *et al.* Prevalence of Mutations in eyeGENE Probands With a Diagnosis of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**, 6255–6261 (2013).
7. Waseem, N. H. *et al.* Mutations in the Gene Coding for the Pre-mRNA Splicing Factor, PRPF31 , in Patients with Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**, 1330–1334 (2007).
8. Sato, H. *et al.* Mutations in the Pre-mRNA Splicing Gene, PRPF31, in Japanese Families With Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Am. J. Ophthalmol.* **140**, 537–540 (2005).
9. Martínez-Gimeno, M. *et al.* Mutations in the pre-mRNA splicing-factor genes PRPF3, PRPF8, and PRPF31 in Spanish families with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 2171–2177 (2003).
10. Audo, I. *et al.* Prevalence and novelty of PRPF31 mutations in French autosomal dominant rod-cone dystrophy patients and a review of published reports. *BMC Med. Genet.* **11**, 145 (2010).

11. Utz, V. M., Beight, C. D., Marino, M. J., Hagstrom, S. A. & Traboulsi, E. I. Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa Secondary to Pre-mRNA Splicing-Factor Gene PRPF31 (RP11): Review of Disease Mechanism and Report of a Family with a Novel 3-Base Pair Insertion. *Ophthalmic Genet.* **34**, 183–188 (2013).
12. Rose, A. M. & Bhattacharya, S. S. Variant haploinsufficiency and phenotypic non-penetrance in PRPF31 -associated retinitis pigmentosa. *Clin. Genet.* **90**, 118–126 (2016).
13. Wheway, G., Douglas, A., Baralle, D. & Guillot, E. Mutation spectrum of PRPF31, genotype-phenotype correlation in retinitis pigmentosa, and opportunities for therapy. *Exp. Eye Res.* **192**, 107950 (2020).
14. Frio, T. R., Civic, N., Ransijn, A., Beckmann, J. S. & Rivolta, C. Two trans-acting eQTLs modulate the penetrance of PRPF31 mutations. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3154–3165 (2008).
15. Frio, T. R. *et al.* A single-base substitution within an intronic repetitive element causes dominant retinitis pigmentosa with reduced penetrance. *Hum. Mutat.* **30**, 1340–1347 (2009).
16. Rivolta, C. *et al.* Variation in retinitis pigmentosa-11 ( PRPF31 or RP11 ) gene expression between symptomatic and asymptomatic patients with dominant RP11 mutations. *Hum. Mutat.* **27**, 644–653 (2006).
17. Rio Frio, T. *et al.* Premature termination codons in PRPF31 cause retinitis pigmentosa via haploinsufficiency due to nonsense-mediated mRNA decay. *J. Clin. Invest.* **118**, 1519–1531 (2008).
18. Venturini, G., Rose, A. M., Shah, A. Z., Bhattacharya, S. S. & Rivolta, C. CNOT3 Is a Modifier of PRPF31 Mutations in Retinitis Pigmentosa with Incomplete Penetrance. *PLoS Genet.* **8**, e1003040 (2012).
19. Rose, A. M. *et al.* Dominant PRPF31 Mutations Are Hypostatic to a Recessive CNOT3 Polymorphism in Retinitis Pigmentosa: A Novel Phenomenon of “Linked Trans -Acting Epistasis”. *Ann. Hum. Genet.* **78**, 62–71 (2014).

20. Vithana, E. N. *et al.* A human homolog of yeast pre-mRNA splicing gene, PRP31, underlies autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19q13.4 (RP11). *Mol. Cell* **8**, 375–381 (2001).
21. Cao, H. *et al.* Temporal and Tissue Specific Regulation of RP-Associated Splicing Factor Genes PRPF3, PRPF31 and PRPC8—Implications in the Pathogenesis of RP. *PLoS One* **6**, e15860 (2011).
22. Tanackovic, G. *et al.* PRPF mutations are associated with generalized defects in spliceosome formation and pre-mRNA splicing in patients with retinitis pigmentosa. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 2116–2130 (2011).
23. Graziotto, J. J. *et al.* Three Gene-Targeted Mouse Models of RNA Splicing Factor RP Show Late-Onset RPE and Retinal Degeneration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 190–198 (2011).
24. Farkas, M. H. *et al.* Mutations in Pre-mRNA Processing Factors 3, 8, and 31 Cause Dysfunction of the Retinal Pigment Epithelium. *Am. J. Pathol.* **184**, 2641–2652 (2014).
25. Meyer, J. S. *et al.* Optic Vesicle-like Structures Derived from Human Pluripotent Stem Cells Facilitate a Customized Approach to Retinal Disease Treatment. *Stem Cells* **29**, 1206–1218 (2011).
26. Reichman, S. *et al.* From confluent human iPS cells to self-forming neural retina and retinal pigmented epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 8518–8523 (2014).
27. Zhong, X. *et al.* Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs. *Nat. Commun.* **5**, 4047 (2014).
28. Kuwahara, A. *et al.* Generation of a ciliary margin-like stem cell niche from self-organizing human retinal tissue. *Nat. Commun.* **6**, 6286 (2015).
29. Buskin, A. *et al.* Disrupted alternative splicing for genes implicated in splicing and ciliogenesis causes PRPF31 retinitis pigmentosa. *Nat. Commun.* **9**, 4234 (2018).
30. Brydon, E. M. *et al.* AAV-mediated gene augmentation therapy restores critical functions in mutant iPSC-derived PRPF31+/- cells. *Mol Ther Methods Clin Dev* **15**, 392–402 (2019).

31. Azizzadeh Pormehr, L., Ahmadian, S., Daftarian, N., Mousavi, S. A. & Shafieezadeh, M. PRPF31 reduction causes mis-splicing of the phototransduction genes in human organotypic retinal culture. *Eur. J. Hum. Genet.* (2019). doi:10.1038/s41431-019-0531-1
32. Whewey, G. *et al.* An siRNA-based functional genomics screen for the identification of regulators of ciliogenesis and ciliopathy genes. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1074–1087 (2015).
33. Nazlamova, L. *et al.* A CRISPR and high-content imaging assay compliant with ACMG/AMP guidelines for clinical variant interpretation in ciliopathies. *Hum. Genet.* **140**, 593–607 (2021).
34. Reichman, S. *et al.* Generation of Storable Retinal Organoids and Retinal Pigmented Epithelium from Adherent Human iPS Cells in Xeno-Free and Feeder-Free Conditions. *Stem Cells* **35**, 1176–1188 (2017).
35. Slembrouck-Brec, A. *et al.* Reprogramming of Adult Retinal Müller Glial Cells into Human-Induced Pluripotent Stem Cells as an Efficient Source of Retinal Cells. *Stem Cells Int.* **2019**, 1–13 (2019).
36. Vithana, E. N. *et al.* Expression of PRPF31 mRNA in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa: a molecular clue for incomplete penetrance? *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 4204–4209 (2003).
37. Terray, A. *et al.* Establishment of an induced pluripotent stem (iPS) cell line from dermal fibroblasts of an asymptomatic patient with dominant PRPF31 mutation. *Stem Cell Res.* **25**, 26–29 (2017).
38. Khabou, H. *et al.* Noninvasive gene delivery to foveal cones for vision restoration. *JCI Insight* **3**, (2018).
39. Garita-Hernandez, M. *et al.* AAV-Mediated Gene Delivery to 3D Retinal Organoids Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 994 (2020).
40. Kannan, R., Sreekumar, P. G. & Hinton, D. R. Novel roles for  $\alpha$ -crystallins in retinal function and disease. *Prog. Retin. Eye Res.* **31**, 576–604 (2012).

41. Lakkaraju, A. *et al.* The cell biology of the retinal pigment epithelium. *Prog. Retin. Eye Res.* **78**, 100846 (2020).
42. Gerding, W. M. *et al.* Ccdc66 null mutation causes retinal degeneration and dysfunction. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 3620–3631 (2011).
43. Stingl, K. *et al.* CDHR1 mutations in retinal dystrophies. *Sci. Rep.* **7**, 6992 (2017).
44. Yang, C. *et al.* Pre-mRNA Processing Factors and Retinitis Pigmentosa: RNA Splicing and Beyond. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 700276 (2021).
45. Arzalluz-Luque, Á. *et al.* Mutant PRPF8 Causes Widespread Splicing Changes in Spliceosome Components in Retinitis Pigmentosa Patient iPSC-Derived RPE Cells. *Front. Neurosci.* **15**, 636969 (2021).
46. Linder, B. *et al.* Systemic splicing factor deficiency causes tissue-specific defects: a zebrafish model for retinitis pigmentosa<sup>†</sup>. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 368–377 (2011).
47. Valdés-Sánchez, L. *et al.* Retinal pigment epithelium degeneration caused by aggregation of PRPF31 and the role of HSP70 family of proteins. *Mol. Med.* **26**, 1 (2020).
48. Deery, E. C. *et al.* Disease mechanism for retinitis pigmentosa (RP11) caused by mutations in the splicing factor gene PRPF31. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 3209–3219 (2002).
49. Dalkara, D. *et al.* In Vivo-Directed Evolution of a New Adeno-Associated Virus for Therapeutic Outer Retinal Gene Delivery from the Vitreous. *Sci. Transl. Med.* **5**, 189ra76-189ra76 (2013).
50. Tosca, L. *et al.* Genomic instability of human embryonic stem cell lines using different passaging culture methods. *Mol. Cytogenet.* **8**, 30 (2015).
51. Hockemeyer, D. *et al.* Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* **27**, 851–857 (2009).
52. Cong, L. *et al.* Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science (80-. ).* **339**, 819–823 (2013).
53. Ran, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8**, 2281–2308 (2013).

54. Gagliardi, G. *et al.* Characterization and Transplantation of CD73-Positive Photoreceptors Isolated from Human iPSC-Derived Retinal Organoids. *Stem Cell Reports* **11**, 665–680 (2018).
55. Finnemann, S. C., Bonilha, V. L., Marmorstein, A. D. & Rodriguez-Boulan, E. Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires alpha(v)beta5 integrin for binding but not for internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 12932–12937 (1997).
56. Dobin, A. *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21 (2013).
57. Liao, Y., Smyth, G. K. & Shi, W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**, 923–930 (2014).
58. Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139–140 (2010).
59. Shen, S. *et al.* MATS: a Bayesian framework for flexible detection of differential alternative splicing from RNA-Seq data. *Nucleic Acids Res.* **40**, e61–e61 (2012).
60. Zhou, Y. *et al.* Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat. Commun.* **10**, 1523 (2019).
61. Walter, W., Sánchez-Cabo, F. & Ricote, M. GOplot: an R package for visually combining expression data with functional analysis: Fig. 1. *Bioinformatics* **31**, 2912–2914 (2015).
62. Grieger, J. C., Choi, V. W. & Samulski, R. J. Production and characterization of adeno-associated viral vectors. *Nat. Protoc.* **1**, 1412–1428 (2006).
63. Aurnhammer, C. *et al.* Universal Real-Time PCR for the Detection and Quantification of Adeno-Associated Virus Serotype 2-Derived Inverted Terminal Repeat Sequences. *Hum. Gene Ther. Methods* **23**, 18–28 (2012).

## LEGENDS OF FIGURE

**Figure 1. Characterization of RPE cells derived from *PRPF31*-mutated iPSCs revealed morphological and functional abnormalities related to a lower level of *PRPF31* protein expression.**

**a** Bright-field images of human iPSC-derived RPE cells from unaffected family-related member (Control), *PRPF31*-mutated (Cys247X and Tyr90CysfsX21) and isogenic control (Cys247X-Isogenic), after 30 days of differentiation. Scale bar = 100  $\mu$ m. **b** Immunostaining for tight junction protein ZO-1. Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bar = 10  $\mu$ m. **c** Orthogonal projection of immunostaining for apical protein EZRIN and basolateral channel BESTROPHIN (BEST1). **d** Transmission and scanning electronic microscopy images of control and Cys247X iRPE cells illustrating different RPE features (apical microvilli, basal nuclei, tight junctions, desmosomes, and basal membrane). Scale bar = 1  $\mu$ m; except for middle-right panel (scale bar = 10 $\mu$ m). **e-f** Representative images and quantitative analysis of the RPE cell phagocytic activity: ratios of FITC/DAPI fluorescence evaluated after a 3-hour incubation with FITC-labelled POS. Values are mean  $\pm$  SD, n = 9 samples from N = 3 independent differentiations. Statistical significance assessed using the Kruskal-Wallis test (\* $P$  < 0.05; \*\* $P$  < 0.01). Scale bar = 10 $\mu$ m. **g** Trans-epithelial resistance time course analysis of RPE cells between 1 and 13 weeks of culture on Transwell filters. **h-i** Representative image and quantitative analysis of Western blots showing *PRPF31* protein level relative to GAPDH expression. Values are mean  $\pm$  SD, n = 6 samples from N = 3 independent differentiations. Statistical significance assessed using Kruskal-Wallis test (\*\* $P$  < 0.01).

**Figure 2. Defective RPE phenotype due to *PRPF31* mutations is not observed in asymptomatic carrier and can be prevented by gene augmentation strategy.**

**a** Bright-field images of human iPSC-derived RPE cells from an affected patient carrying *PRPF31*-mutation (Cys247X), an unaffected patient carrying the same mutation (Cys247X-asymptomatic), affected patient carrying one *PRPF31* mutation and a supplementary WT copy of *PRPF31* in the AAVS1 locus (Cys247X-KI and Tyr90CysfsX21-KI), after 30 days of differentiation. Scale bar = 100  $\mu$ m. **b** Immunostaining for the tight junction protein ZO-1. Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bar =

10  $\mu\text{m}$ . **c-d** Representative images and quantitative analysis of RPE cell phagocytic activity: ratios of FITC/DAPI fluorescence evaluated after a 3-hours incubation with FITC-labelled POS. Values are mean  $\pm$  SD,  $n = 9$  samples from  $N = 3$  independent differentiations. Statistical significance assessed using the Kruskal-Wallis test ( $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ;  $****P < 0.0001$ ). Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ . **e** Trans-epithelial resistance time course analysis of RPE cells between 1 and 13 weeks of cultured on Transwell filters. **f-g** Representative image and quantitative analysis of Western blots showing PRPF31 protein level relative to GAPDH expression. Values are mean  $\pm$  SD,  $n = 6$  samples from  $N = 3$  independent differentiations. Statistical significance assessed using Kruskal-Wallis test ( $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ ).

**Figure 3. Mutations in *PRPF31* lead to successive rod and cone photoreceptor degeneration in iPSC-derived retinal organoids.**

**a** Immunofluorescence staining of retinal organoid cryosections derived from unaffected family-related member (Control), *PRPF31*-mutated (Cys247X and Tyr90CysfsX21) and isogenic control (Cys247X-Isogenic) iPSCs after 100, 130, 154 and 175 days of differentiation (D100, D130, D154 and D175) using rod photoreceptor markers NRL and RHODOPSIN (RHO). Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ . **b** Higher magnification of one representative rod cell stained with the RHO marker of control (left) and *PRPF31*-mutated (right) retinal organoids at D154. **c** Quantification of the percentage of NRL-positive cells in retinal organoids after different differentiation times. Each data point represents manual counting of NRL-positive cells relative to DAPI-positive cells performed on one quarter of a representative cross-section of one organoid. Values are mean  $\pm$  SD, for each time point  $n = 9$  independent retinal organoids from  $N \geq 3$  independent differentiations. Statistical significance assessed using the Kruskal-Wallis test ( $*P < 0.05$ ;  $***P < 0.001$ ). **d** Immunofluorescence staining of cryosections from retinal organoids at D130, D154, D175 and D200 using rod (RHO) and cone (human cone arrestin: hCAR) markers. Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bar = 100 $\mu\text{m}$ . **e** Higher magnification of one representative cone cell stained with hCAR marker of control (left) and *PRPF31*-mutated (right) retinal organoids at D200. **f** Quantification of the percentage of hCAR-positive

cells in retinal organoids after different differentiation times. Each data point represents manual counting of hCAR-positive cells relative to DAPI-positive cells performed on one quarter of a representative cross-section of one organoid. Values are mean  $\pm$  SD, for each time point  $n = 9$  independent retinal organoids from  $N \geq 3$  independent differentiations. Statistical significance assessed using the Kruskal-Wallis test (\*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

**Figure 4. PRPF31-related retinal degeneration is correlated with lower levels of PRPF31 protein expression and does not affect bipolar or Müller glial cells.**

**a-b** Representative images and quantitative analysis of Western blots showing PRPF31 protein level relative to GAPDH expression in D130 retinal organoids. Values are mean  $\pm$  SD,  $n = 6$  samples from  $N = 3$  independent differentiations. Statistical significance assessed using the Kruskal-Wallis test (\*\* $P < 0.01$ ). **c** Immunofluorescence staining of cryosections from control and *PRPF31*-mutated (Cys247X) retinal organoids after 154 days of differentiation (D154) using marker for the active form of the apoptotic factor Caspase-3 (cleaved CASP-3). **d** Immunolabeling of cryosections from D175 retinal organoids using markers for Müller glial (CRALBP) and bipolar (PKC $\alpha$ , VSX2) cells. **c-d** Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bar = 100  $\mu$ m.

**Figure 5. Photoreceptor degeneration is not observed in retinal organoids derived from an asymptomatic carrier and can be prevented by gene augmentation strategy.**

**a** Immunofluorescence staining of retinal organoid cryosections derived from an affected patient carrying mutation (Cys247X), an unaffected patient carrying the same mutation (Cys247X-Asymptomatic) and *PRPF31*-KI (Cys247X-KI and Tyr90CysfsX21-KI) iPSCs after 130 and 175 days of differentiation (D130, and D175) using rod photoreceptor markers NRL and RHODOPSIN (RHO). **b** Immunofluorescence staining of retinal organoid cryosections at D130 and D175 using markers for rod (RHO) and cone (hCAR) photoreceptors. **a-b** Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bar = 100  $\mu$ m. **c** Quantification of the percentage of NRL-positive cells in retinal organoids after different

differentiation times (D100, D130, D154 and D175). **d** Quantification of the percentage of hCAR-positive cells in retinal organoids after different differentiation times (D130, D154, D175 and D200). **c-d** Each data point represents manual counting of NRL or hCAR-positive cells relative to DAPI-positive cells performed on one quarter of a representative cross-section of one organoid. Values are mean  $\pm$  SD, for each time point  $n = 9$  independent retinal organoids from  $N \geq 3$  independent differentiations. Statistical significance assessed using the Kruskal-Wallis test ( $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ ;  $****P < 0.0001$ ). **e-f** Representative image and quantitative analysis of Western blots showing PRPF31 protein levels relative to GAPDH expression in retinal organoids at D130. Values are mean  $\pm$  SD,  $n = 6$  samples from  $N = 3$  independent differentiations. Statistical significance assessed using the Kruskal-Wallis test ( $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ ).

**Figure 6. Photoreceptor degeneration phenotype can be rescued by AAV-driven PRPF31 overexpression.**

**a-b** Immunofluorescence staining of cryosections of *PRPF31*-mutated (Cys247X) retinal organoids and *PRPF31*-mutated retinal organoids transduced with PRPF31-AAV (Cys247X +AAV-PRPF31) at D175 using markers for rod (NRL and RHO) and cone (hCAR) photoreceptors. Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bar = 100  $\mu$ m. **c-d** Quantification of the percentage of NRL or hCAR-positive cells in D175 retinal organoids. Each data point represents manual counting of NRL or hCAR-positive cells relative to DAPI-positive cells performed on one quarter of a representative cross-section of one organoid. Values are mean  $\pm$  SD, for each time point  $n \geq 9$  independent retinal organoids from  $N \geq 3$  independent differentiations. Statistical significance assessed using the Kruskal-Wallis test ( $****P < 0.0001$ ). **e-f** Representative image and quantitative analysis of Western blots showing PRPF31 protein levels relative to GAPDH expression in retinal organoids at D130. Values are mean  $\pm$  SD,  $n = 6$  samples from  $N = 3$  independent experiments. Statistical significance assessed using the Kruskal-Wallis test ( $***P < 0.001$ ).

**Figure 7. Identification of genes and pathways deregulated in iPSC-derived RPE cells from *PRPF31* patients using whole transcriptome analysis.**

**a** Volcano plots of differentially expressed genes for Cys247X vs Control (left panel) and Cys247X vs Cys247X-As (right panel). Difference in gene expression (FC) is plotted on the x-axis (log<sub>2</sub> scale), and False Discovery Rate (FDR) adjusted significance is plotted on the y-axis (log<sub>10</sub> scale). Genes significantly up- or down-regulated are indicated in orange and blue, respectively. **b.** Hierarchical clustering analysis of the DEGs between all groups with genes up- or down- regulated by a factor  $\geq 2$  with  $FDR \leq 0.05$  between Control, Cys247X-As and Cys247X patient-derived iPSC cells. The z-score was derived from the average of the triplicates for each experimental group. Blue: low expression; orange: high expression. The left column represents the 15 clusters. Selected clusters used for further pathway analysis are in red. **c** Table of the over-represented GO pathways of interest identified with Metascape using the DEGs from the selected clusters. The different categories of pathways are BP, Biological Process; CC, Cell Compartment; KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; MF, Molecular Function. **d** Circular visualization of selected GO enriched pathways. Down-regulated genes (blue dots) and up-regulated genes (red dots) within each GO pathway are plotted based on log<sub>2</sub>FC. z-score bars indicate if an entire biological process is more likely to be increased or decreased based on the genes it comprises. Green, Biological Process; orange, Cell Compartment; blue, Molecular Function. **e** Differential expression analysis by RT-qPCR of *CADHERIN1*, *FMO2*, *PCDHB8*, and *DAPL11* (upper panel) and of *DSP*, *APOC1*, *DRD4*, *NCAM2* and *CHADL* (lower panel) in Control, Cys247X-As, Cys247X and Cys247X-Iso iPSC cells. Fold expression is relative to Cys247X-Iso. Values are mean  $\pm$  SD, n = 3 samples of  $1.10^6$  iPSC cells from N = 3 independent differentiations. Data were normalized against the geometric average  $\Delta$ Ct of the 18S housekeeping gene. Statistical significance assessed using the Kruskal-Wallis test (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

**Figure 8. Identification of genes and pathways deregulated in iPSC-derived retinal organoids from *PRPF31* patients using whole transcriptome analysis.**

**a** Volcano plots of differentially expressed genes for Cys247X vs Control (left panel), Cys247X vs Cys247X-As (middle panel) and Cys247X-Iso vs Cys247X (right panel). Difference in gene expression (FC) is plotted on the x-axis (log<sub>2</sub> scale), and P-value (Pval) significance is plotted on the y-axis (log<sub>10</sub> scale). Genes up- or down-regulated are indicated in orange and blue, respectively. **b** Hierarchical clustering analysis of the 322 DEGs between Cys247X-Iso and Cys247X with genes up- or down-regulated by a factor  $\geq 2$  with Pval  $\leq 0.05$  in D100 retinal organoids. The *z-score* was derived from the average of the replicates for each experimental group. Blue: low expression; orange: high expression. The top row represents the 14 clusters. Selected clusters used for further pathway analysis are in red. **c** Table of the over-represented GO pathways of interest identified with Metascape using the DEGs from the selected clusters. The different categories of pathways are BP, Biological Process; CC, Cell Compartment; KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; MF, Molecular Function. **d** Circular visualization of selected GO enriched pathways. Down-regulated genes (blue dots) and up-regulated genes (red dots) within each GO pathway of interest are plotted based on logFC. *Z-score* bars indicate if an entire biological process is more likely to be increased or decreased based on the genes it comprises. Green, Biological Process; orange, Cell Compartment; blue, Molecular Function. **e** Differential expression analysis by RT-qPCR of *CRYBA1*, *CRYBB1*, *DNMT3B*, *GDF15*, *PIM* and *LUM* (upper panel) and of *NXLN1*, *GUCY2D*, *SOX7*, *GUCA1B* and *ARR3* (lower panel) in Control, Cys247X and Cys247X-Iso D100 retinal organoids. Fold expression is relative to Cys247X-Iso. Values are mean  $\pm$  SD, n = 3 samples of 10-12 retinal organoids from N = 3 independent differentiations. Data were normalized against the geometric average  $\Delta$ Ct of 18S housekeeping gene. Statistical significance assessed using the Kruskal-Wallis test (\**P* < 0.05; \*\*\**P* < 0.001).

**Figure 9. Identification of alternate splicing in iPSC-derived RPE cells from PRPF31 patients.**

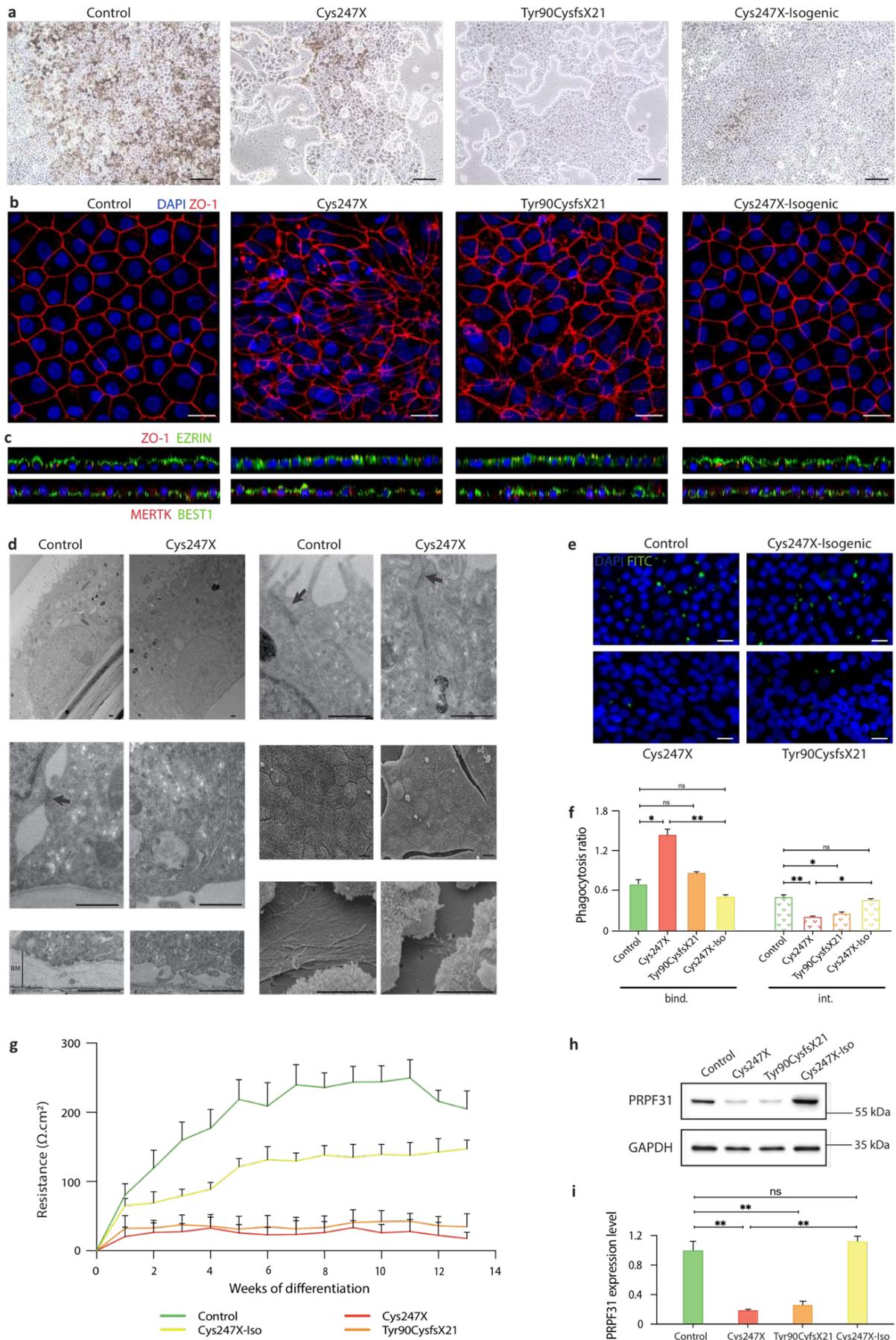
**a** Venn diagrams comparing alternate splicing changes identified in iRPE cells and considered as significant ( $\Delta\text{PSI} \geq 10\%$ ,  $\text{FDR} \leq 0.05$ ) between Cys247X vs Control, Cys247X vs Cys247X-As and Cys247X-As vs Control. The number of alternate splicing events of interest are indicated in red and occurred in 152 genes. **b** Pie chart from rMATS analysis showing that a majority of splicing events corresponded to skipped exons. A5SS and A3SS, alternative 5' and 3' splice sites; SE, skipped exons; RI, retained introns; MXE, mutually exclusive exons. **c** Circular visualization of selected GO enriched pathways from the identified 152 genes with alternative splicing events. Down-regulated genes (blue dots) and up-regulated genes (red dots) within each GO pathway are plotted based on  $\log_{2}\text{FC}$ . *z-score* bars indicate if an entire biological process is more likely to be increased or decreased based on the genes it comprises. Green, Biological Process; orange, Cell Compartment; blue, Molecular Function. The table shows pathway identity number (ID), associated pathway name (Term), gene count from the analyzed dataset and the adjusted P-value (*adj\_pval*). The different categories of pathways are BP, Biological Process; CC, Cell Compartment; MF, Molecular Function. **d** Sashimi plots for the indicated genes representing the alternate splicing events in iRPE cells derived from Control (green), Cys247X-As (blue) and Cys247X (red). Data are representative of the replicates for each experimental group. Orange highlights in the sashimi plots indicate the alternative splicing events and numbers correspond to the number of junction reads for each event. ITG6A: Integrin Subunit Alpha 6; BEST1: Bestrophin-1.

**Figure 10. Identification of alternate splicing in D100 iPSC-derived retinal organoids from PRPF31 patients.**

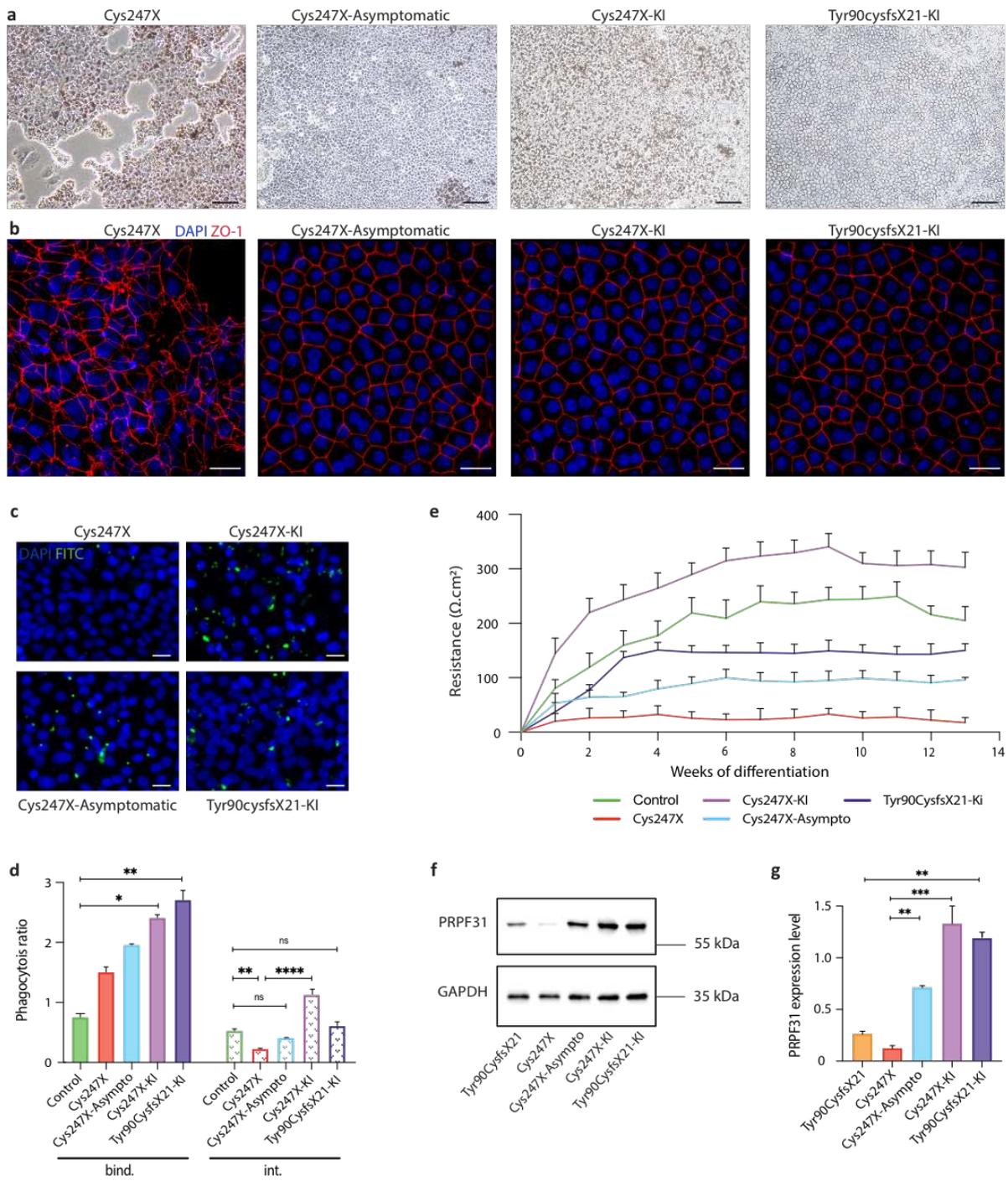
**a** Pie chart from rMATS analysis showing that a majority of splicing events in retinal organoids corresponded to skipped exons and mutually exclusive exons. A5SS and A3SS, alternative 5' and 3' splice sites; SE, skipped exons; RI, retained introns; MXE, mutually exclusive exons. **b** Table showing pathway identity number (ID), associated pathway name (Term), gene count from pathways analysis and the adjusted *P-value* (*adj\_pval*). The different categories of pathways are BP, Biological Process;

CC, Cell Compartment; MF, Molecular Function. **c** Circular visualization of selected GO enriched pathways from the identified 600 genes with alternative splicing events (total of 1049 splicing events) between Cys247X-Iso and Cys247X retinal organoids at D100. Down-regulated genes (blue dots) and up-regulated genes (red dots) within each GO pathway are plotted based on logFC. *Z-score* bars indicate if an entire biological process is more likely to be increased or decreased based on the genes it comprises. Green, Biological Process; orange, Cell Compartment; blue, Molecular Function. **d** Sashimi plots for the indicated genes representing the alternate splicing events in retinal organoids at D100 derived from Control (green), Cys247X-As (blue), Cys247X (red) and Cys247X-Iso (yellow). Data are representative of the replicates for each experimental group. Orange highlights in the sashimi plots indicate the alternative splicing events and numbers correspond to the number of junction reads for each event. CCDC66: Coiled-Coil Domain Containing 66; CDHR1: Cadherin Related Family Member 1.

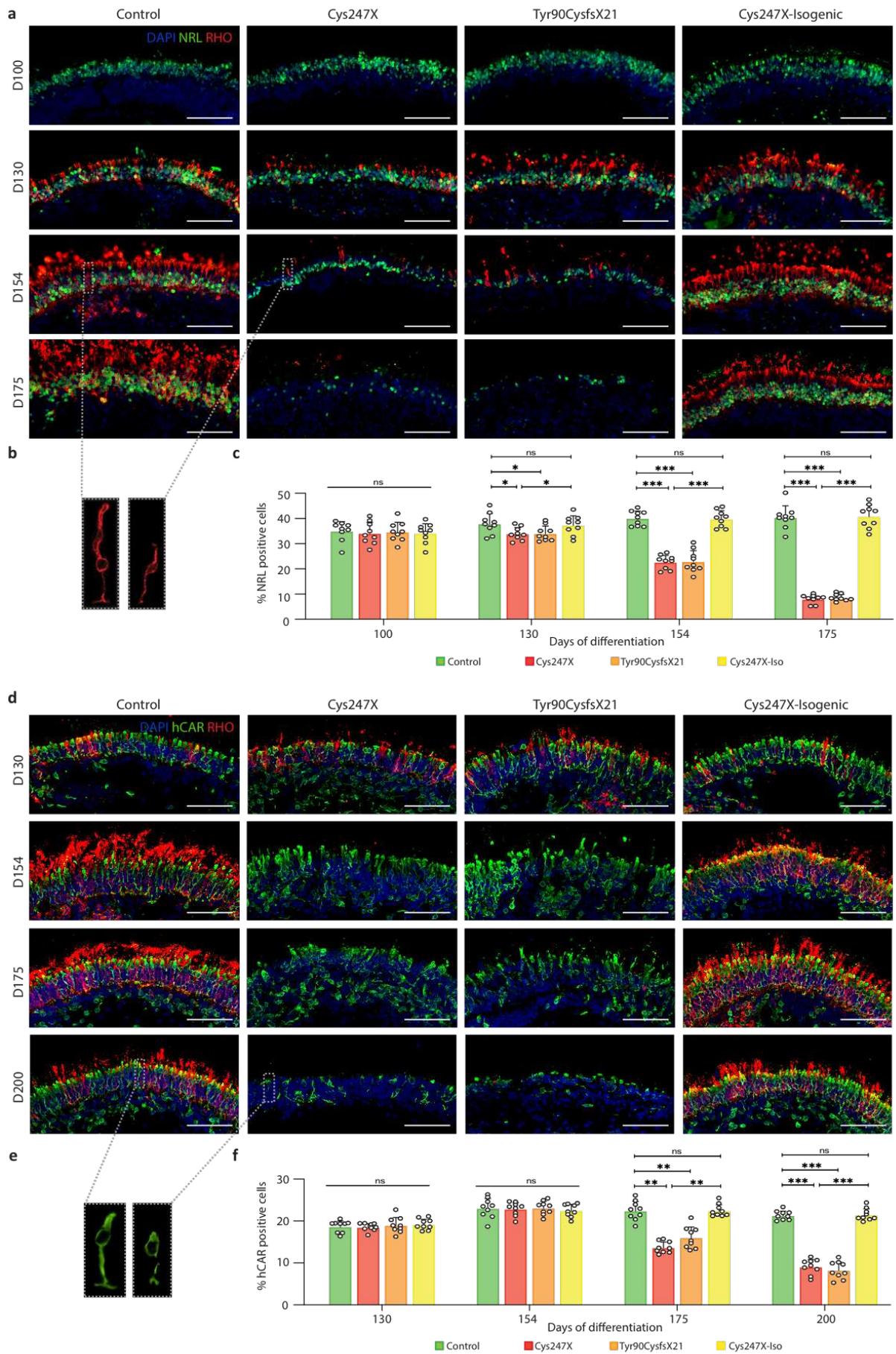
**Figure 1.**



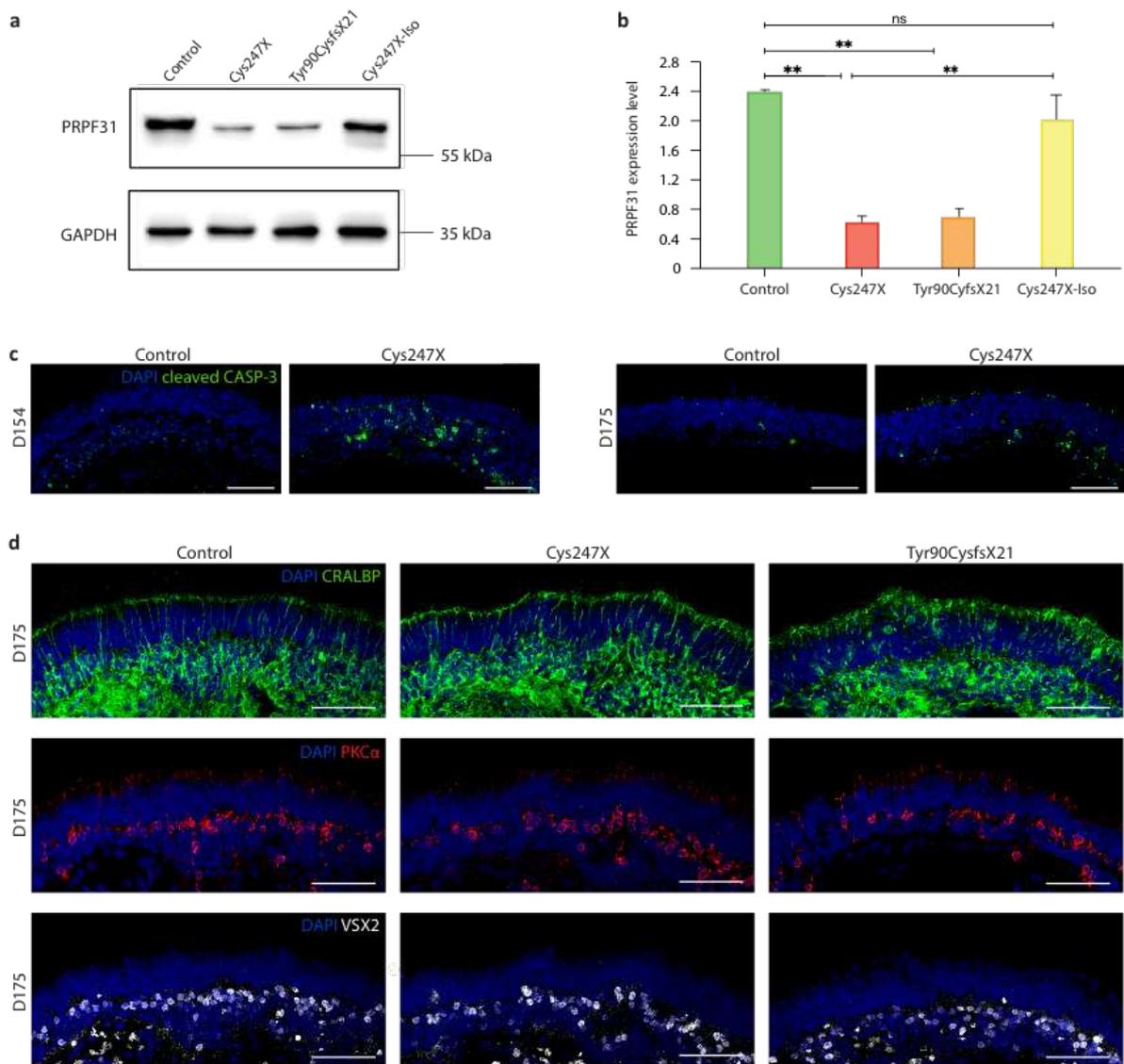
**Figure 2.**



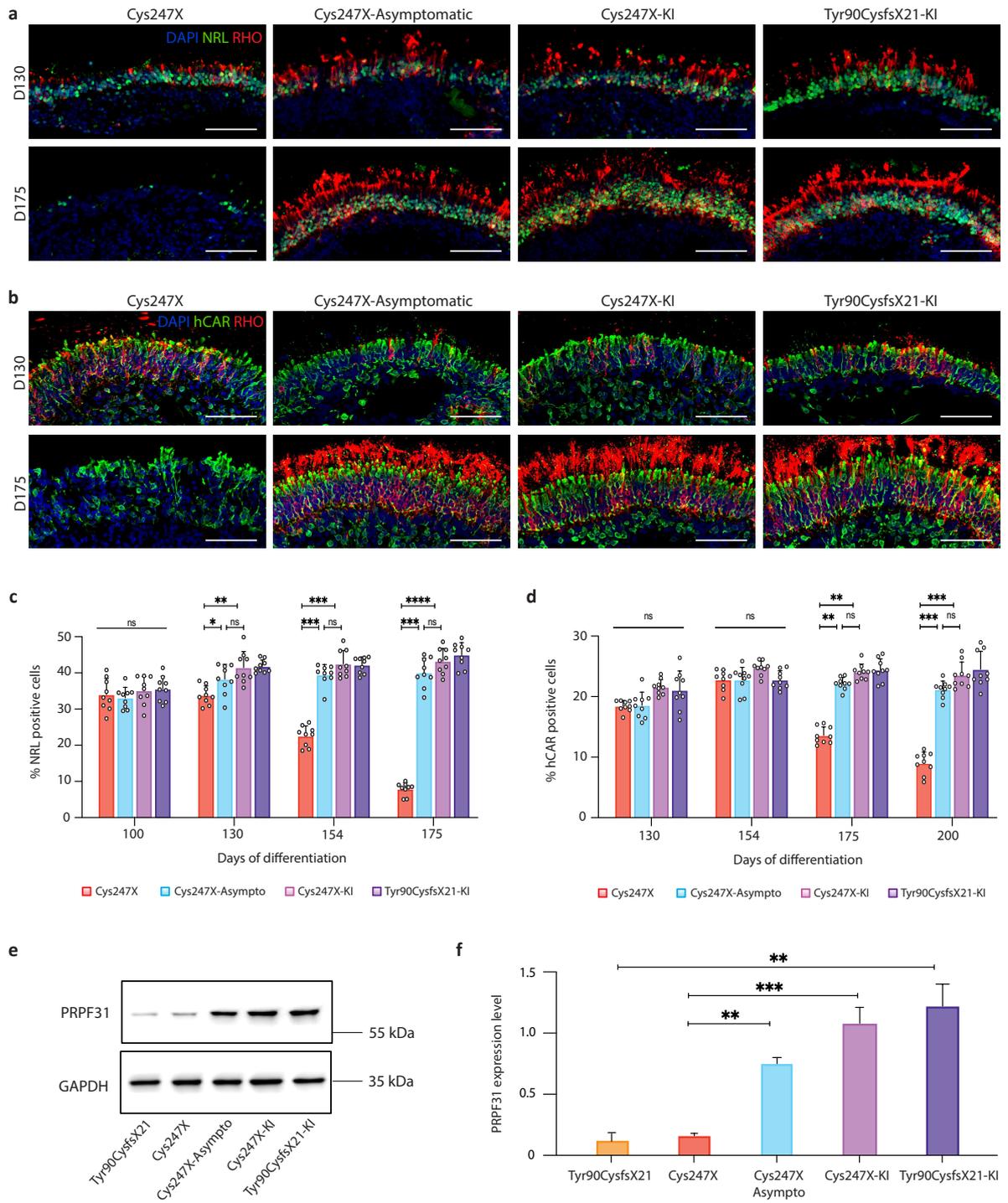
**Figure 3.**



**Figure 4.**



**Figure 5.**



**Figure 6.**

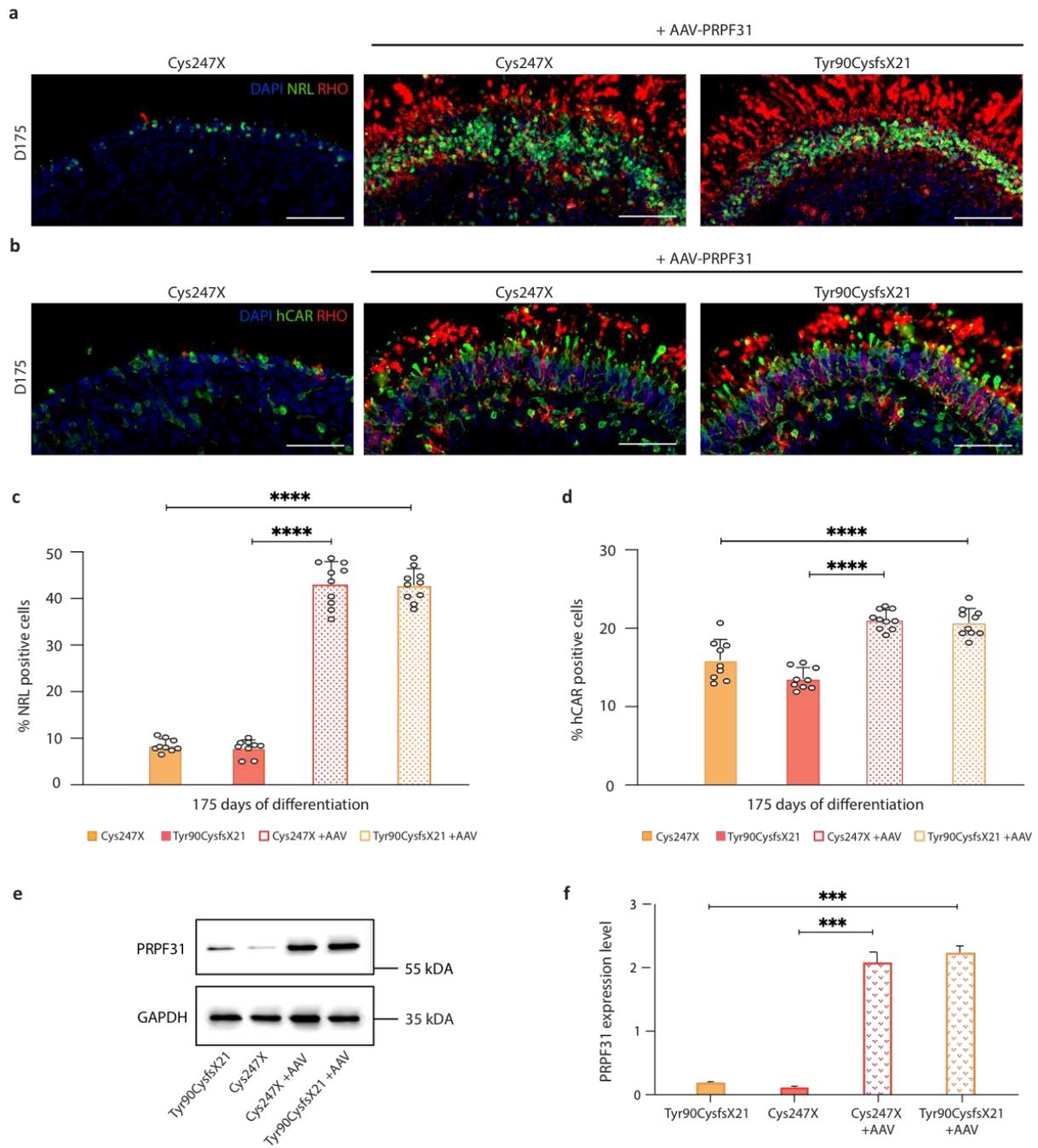


Figure 7.

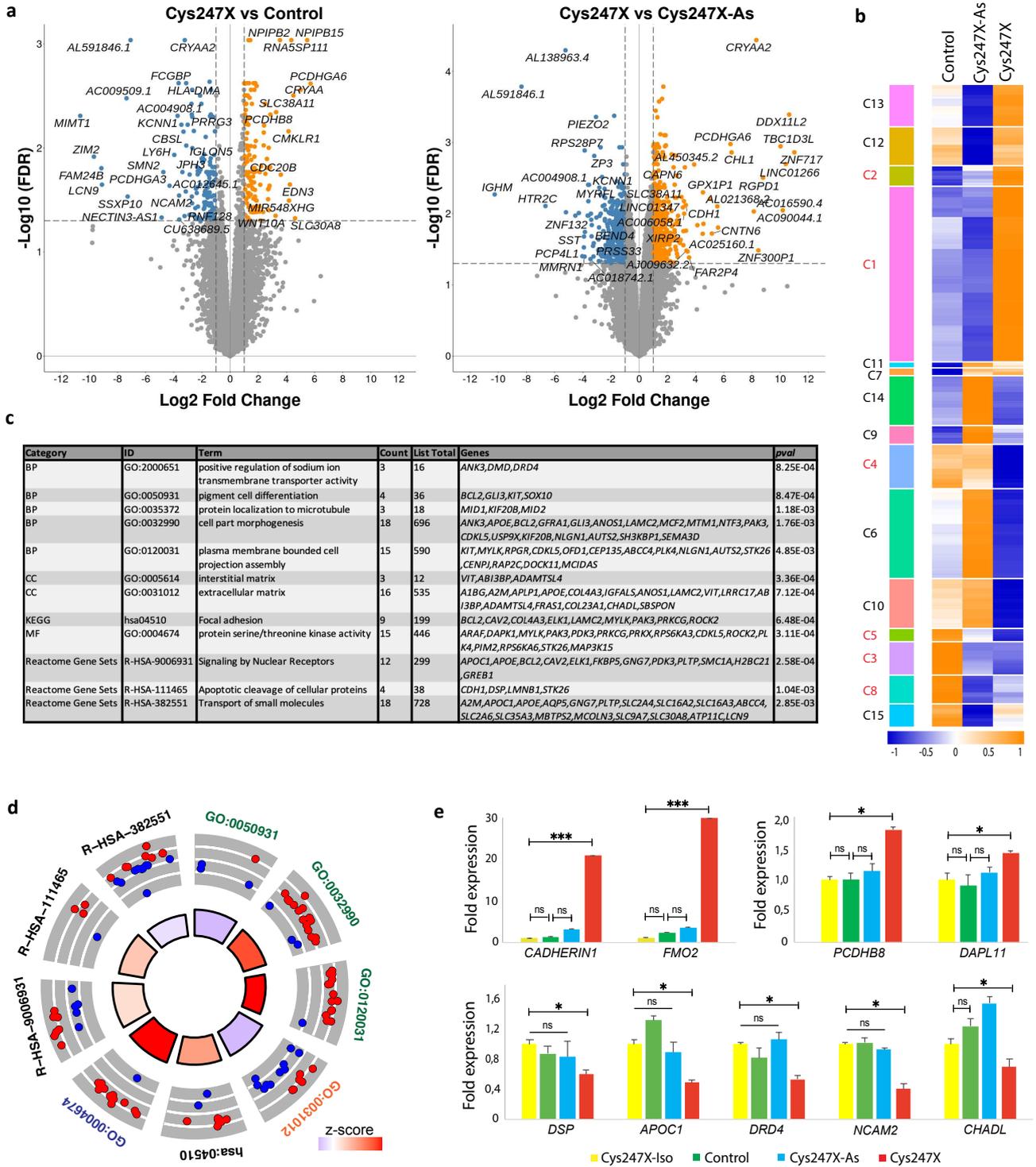
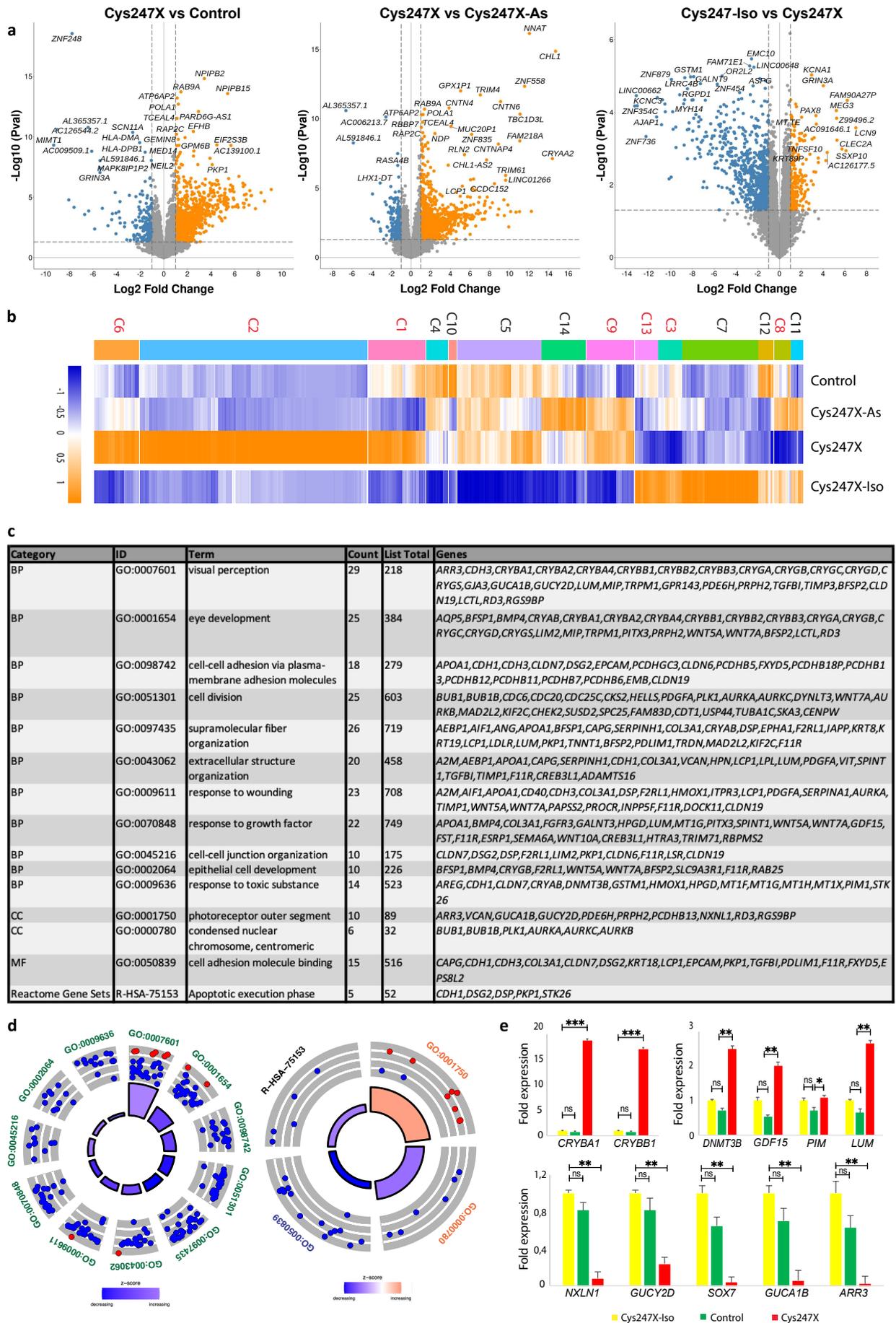


Figure 8.



**Figure 9.**

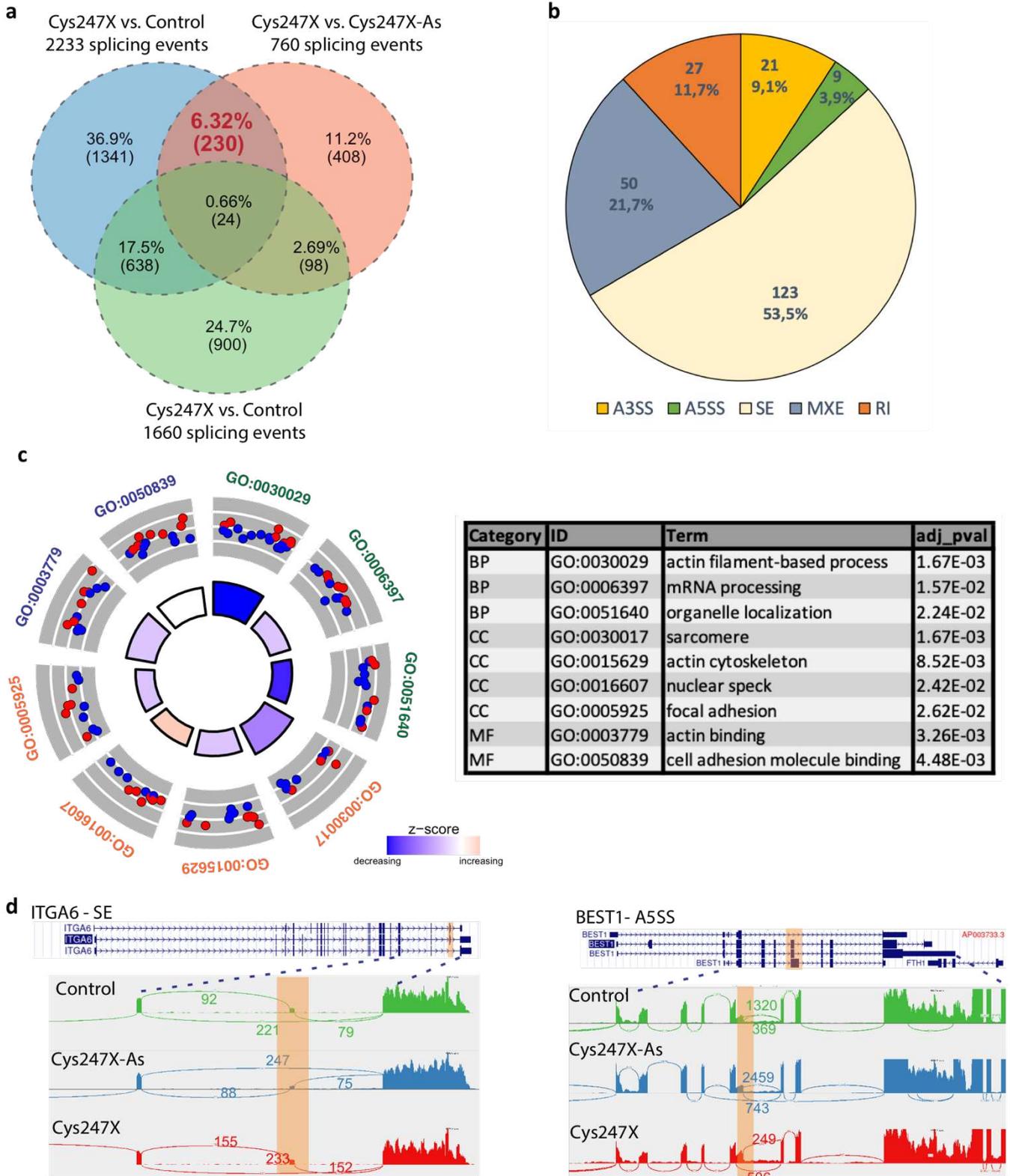
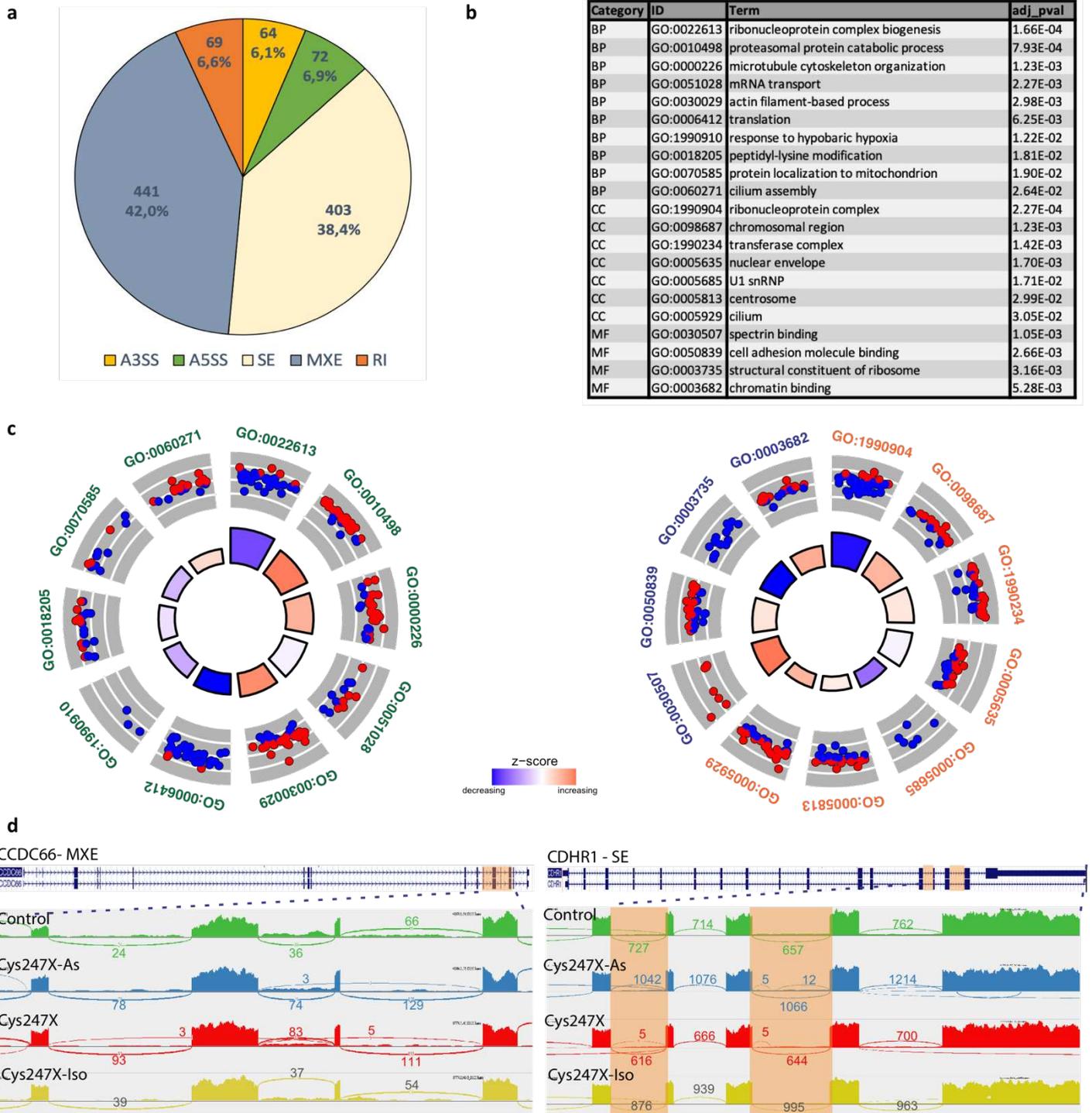


Figure 10



## SUPPLEMENTARY FILES

### Supplementary Figures

Supplementary Figure 1. Derivation and characterization of iPSCs from and RP patient carrying a *PRPF31* mutation and a non-carrier family-related member.

Supplementary Figure 2. Derivation and characterization of a *PRPF31*-mutated (Tyr90CysfsX21) human iPSC line.

Supplementary Figure 3. Generation and characterization of the isogenic control iPSC line by CRISPR/Cas9.

Supplementary Figure 4. Generation and characterization of *PRPF31*-mutated iPSCs expressing a supplementary copy of *PRPF31*.

Supplementary Figure 5. AAV-GFP efficiently transduce iPSC-derived retinal organoids.

Supplementary Figure 6. Heatmap of RPE markers expressed in hiRPE.

Supplementary Figure 7. Selected clusters corresponding to the deregulated genes in hiRPE cells from Cys247X patients.

Supplementary Figure 8. Selected clusters corresponding to the deregulated genes in retinal organoids between Cys247X iPSCs and Cys247X-Isogenic corrected iPSCs.

Supplementary Figure 9. Heatmap of differentially expressed genes in D100 retinal organoids belonging to visual perception and eye development pathways.

### Supplementary Datas

Supplementary Data 1. Off-target site sequencing analysis for gRNA used to correct the Cys247X mutation.

Supplementary Data 2. Differential gene expression in hiRPE cells samples between Cys247X and Cys247X-asymptomatic as well as Control patients (Filtering: FC2, FDR  $\leq$  0.05, TMP  $\geq$  5).

Supplementary Data 3. Differential gene expression in hiPS-derived retinal organoids samples for Cys247X versus Cys247X-Isogenic, Cys247X-Asymptomatic and Control patients (Filtering: FC2, Pval  $\leq$  0.05, TMP  $\geq$  5).

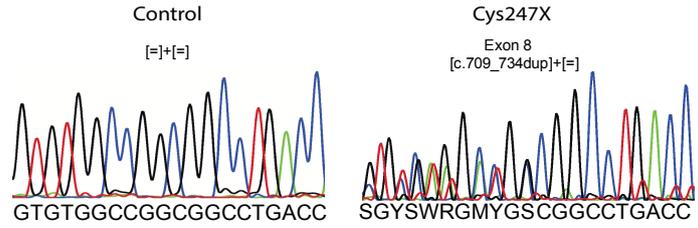
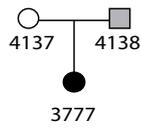
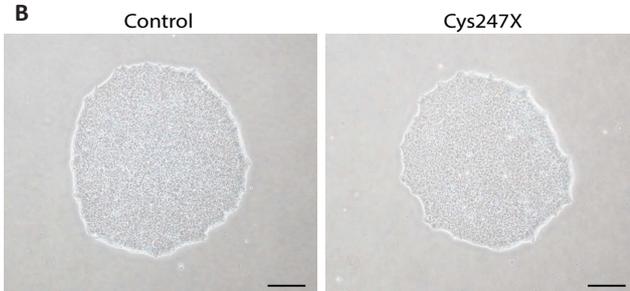
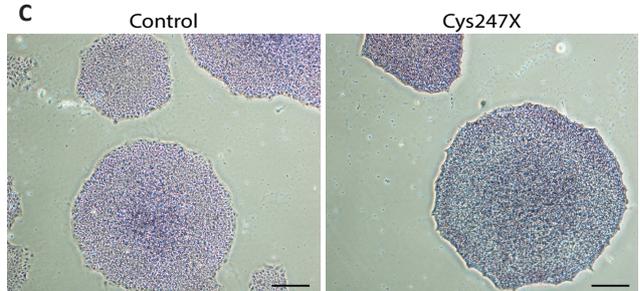
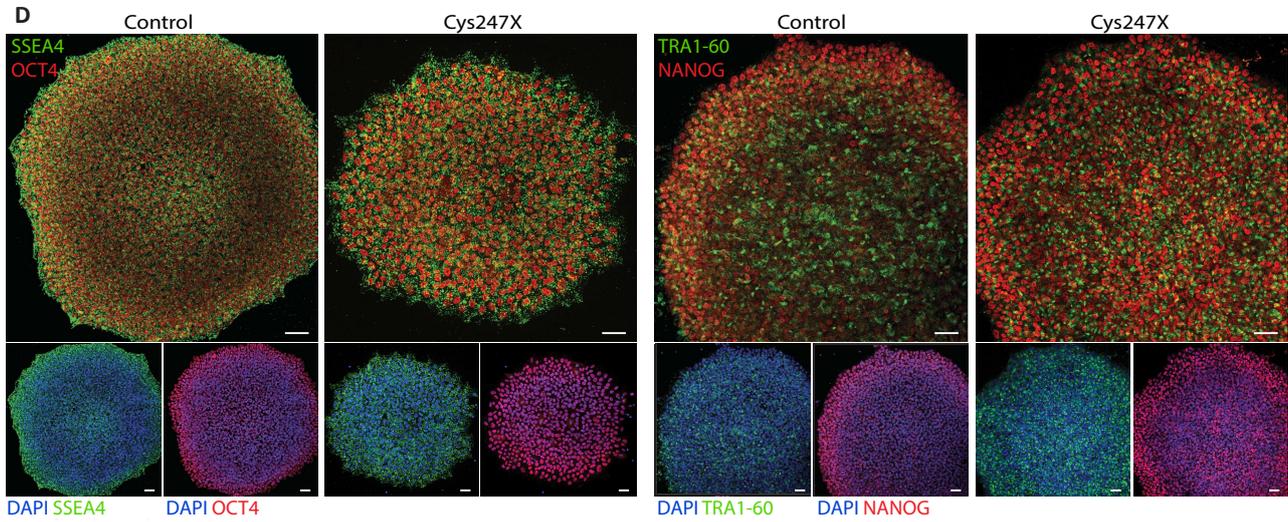
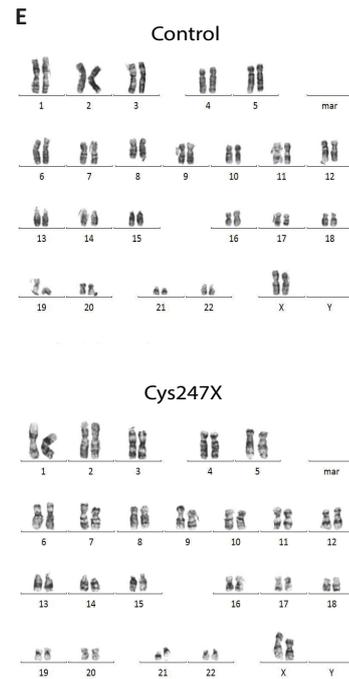
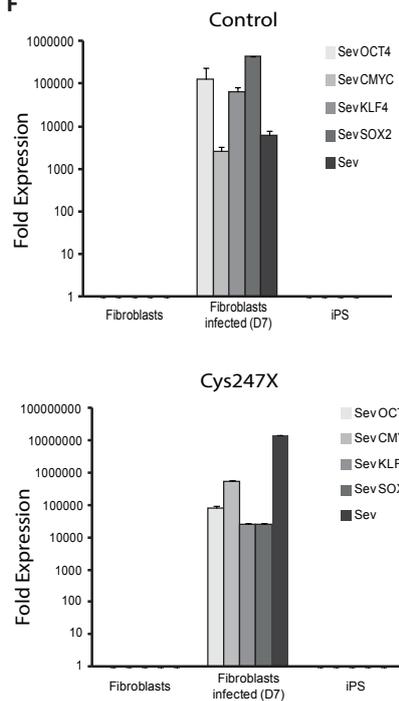
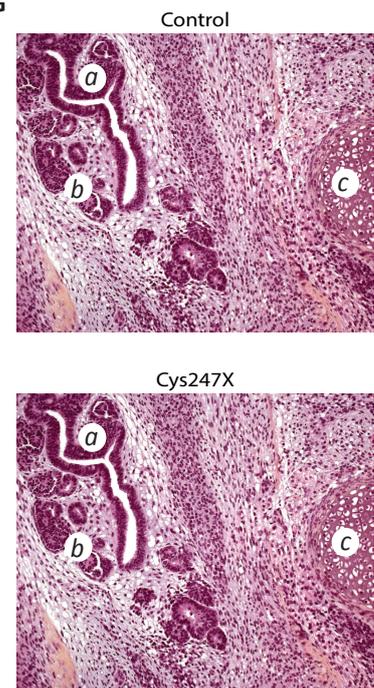
Supplementary Data 4. Differential exon usage in hiRPE cells samples of Cys247X versus Cys247X-asymptomatic and Control patients (Filtering: PSI  $\geq$  0.1, deltaPSI  $\geq$  0.01, FDR  $\leq$  0.05).

Supplementary Data 5. Differential exon usage in hiPS-derived retinal organoids samples of Cys247X versus Cys247X-Isogenic, Cys247X-asymptomatic and Control patients (Filtering: PSI  $\geq$  0.1, deltaPSI  $\geq$  0.01, FDR  $\leq$  0.05).

Supplementary Data 6. Summary of antibodies used, Taqman primers, mutation screening primers, and CRISPR-Cas9 gRNA/ssODN/primers.

**A**

Family 1706  
c. 709-734dup p.Cys247X

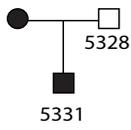
**B****C****D****E****F****G**

**Supplementary Figure 1. Derivation and characterization of iPSCs from a RP patient carrying a *PRPF31* mutation and a non-carrier family-related member.**

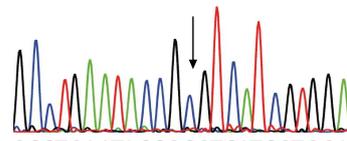
**A** Pedigree of a *PRPF31* family and Sanger sequence trace of fibroblasts from heterozygous c709\_734dup patient 3777 (Cys247X) and non-carrier patient 4137 (Control). **B** Bright-field images of representative iPSC colonies derived from Control and Cys247X patients. Scale bar = 100  $\mu$ m. **C** Positive alkaline phosphatase staining of control and Cys247X iPS colonies. Scale bar = 100  $\mu$ m. **D** Immunofluorescence staining of pluripotency markers OCT4, SSEA4, NANOG and TRA1-60 for control and Cys247X iPSCs. Scale bars = 100  $\mu$ m. **E** Karyotype analysis of control and Cys247X iPSC lines. **F** Verification by RT-qPCR of Sendai virus genome (*Sev*) and exogenous reprogramming factors clearance in control and Cys247X iPSCs after 10 passages. One-week infected-fibroblasts were used as a positive control and data are normalized to uninfected fibroblasts. **G** Histological analysis of iPSC-generated teratomas in NSG mouse with (a) neural tube, (b) bone, and (c) cartilage.

A

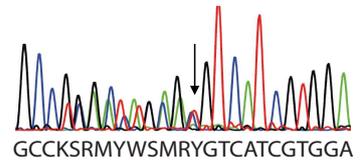
Family 761  
c. 269-273del p.Tyr90CysfsX21



Control  
[+][+]



Tyr90CysfsX21  
Exon 4  
[c.269\_273del][+][+]

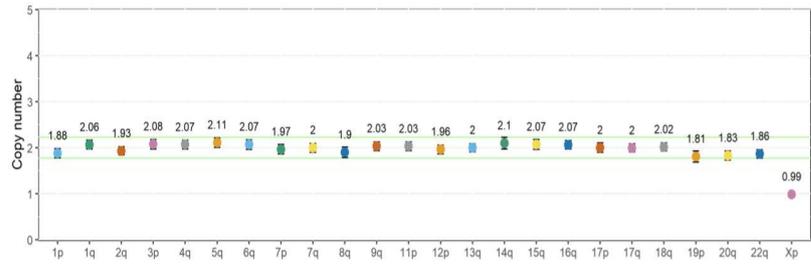


B

Tyr90CysfsX21



C



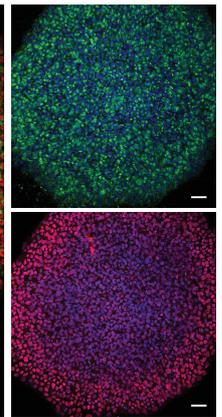
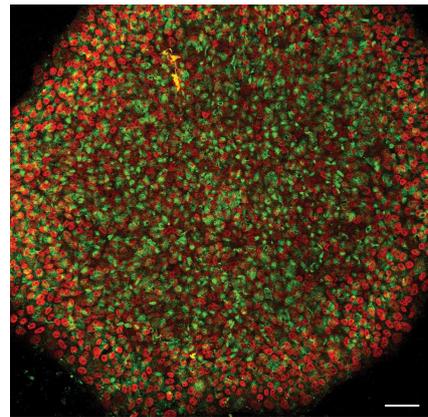
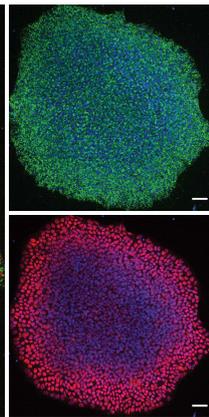
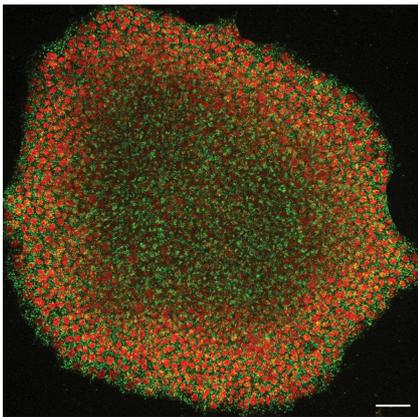
D

SSEA4 OCT4

DAPI SSEA4

TRA1-60 NANOG

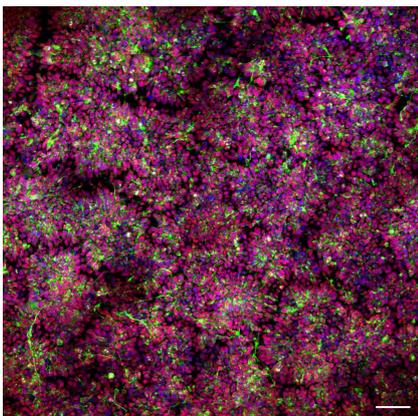
DAPI TRA1-60



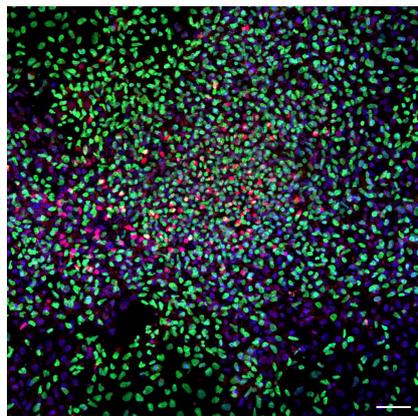
DAPI OCT4

DAPI NANOG

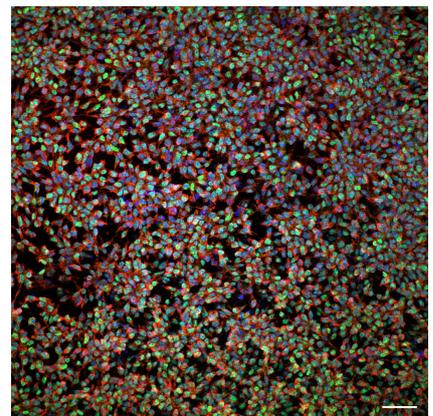
E



DAPI TUJ1 PAX6



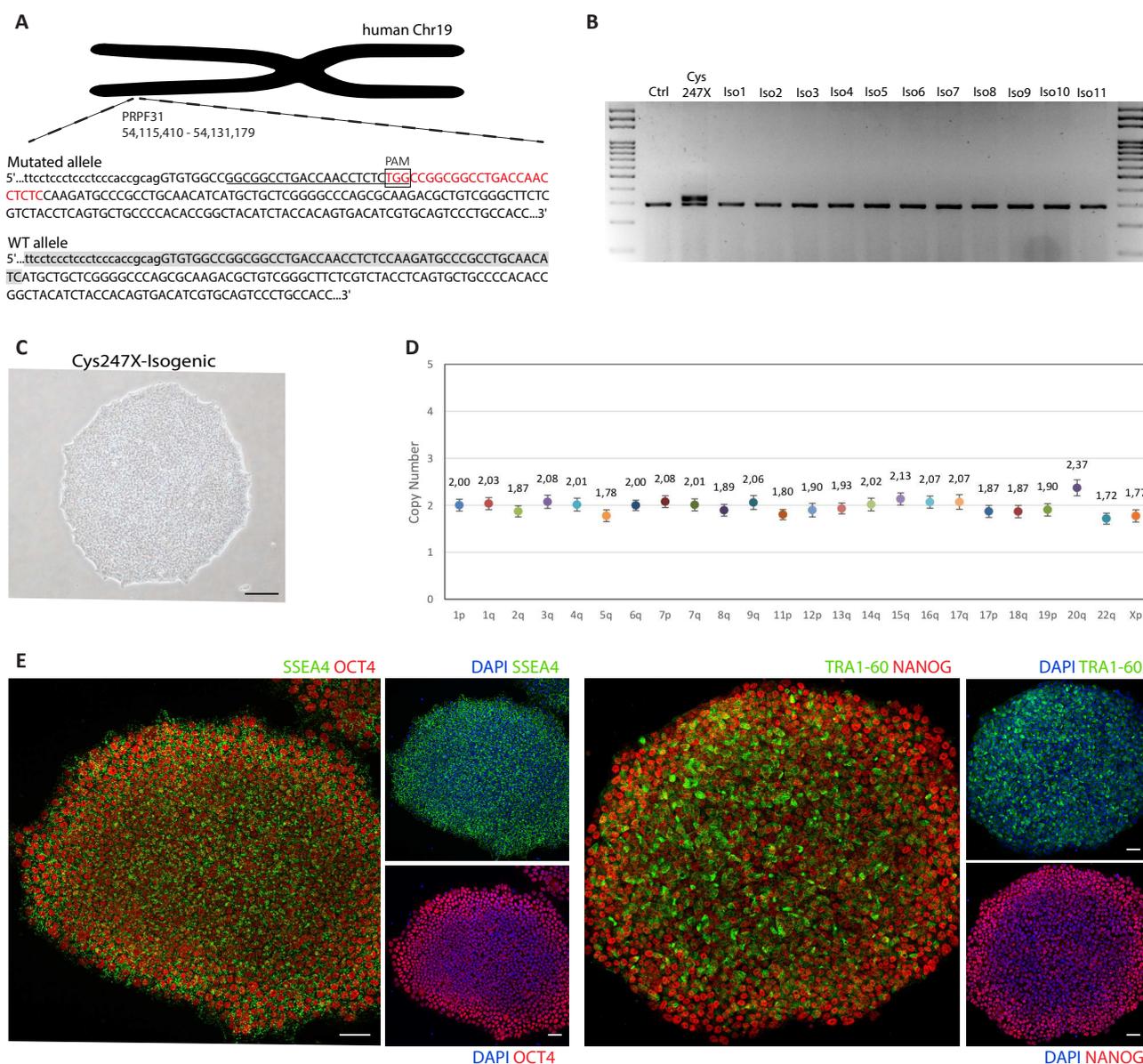
DAPI SOX17 CXCR4



DAPI BRACHYURY SMA

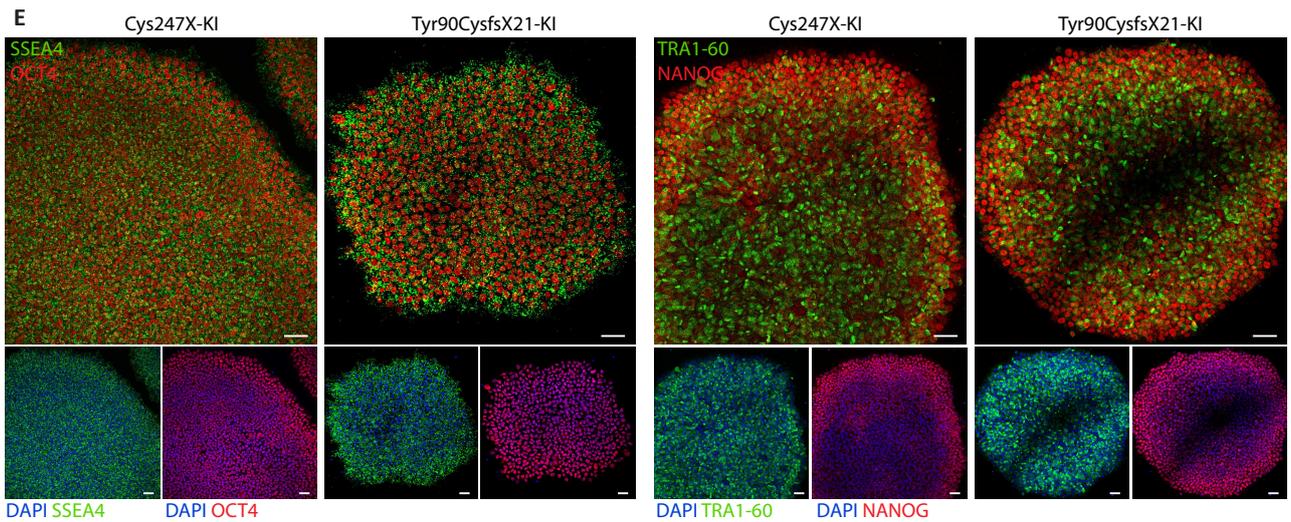
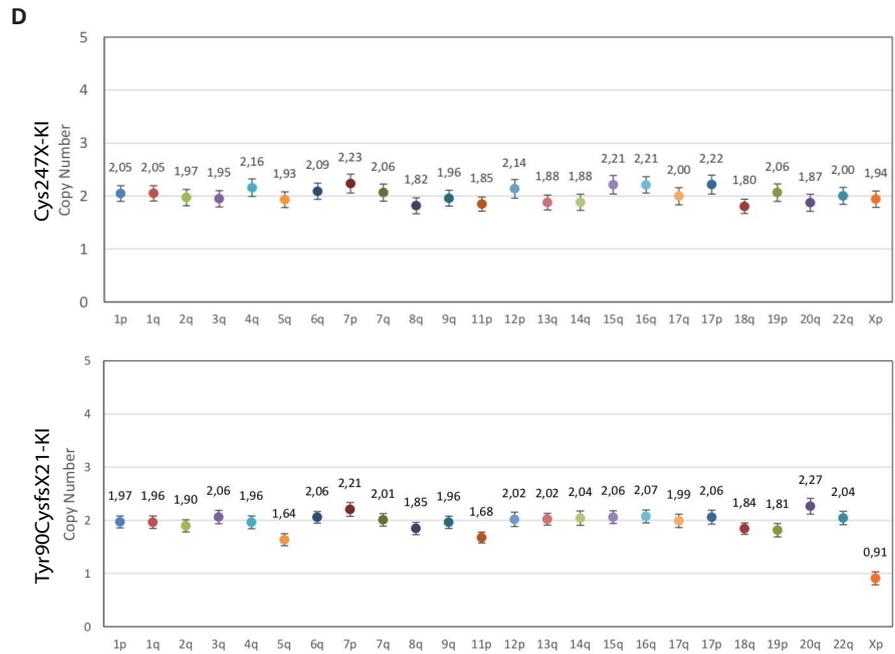
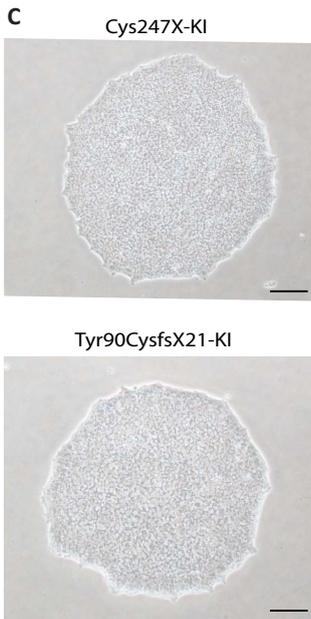
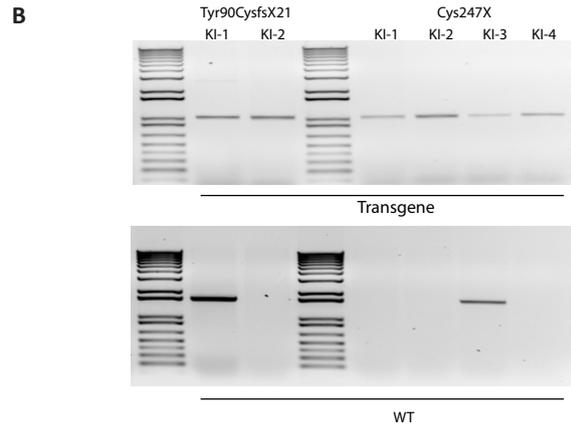
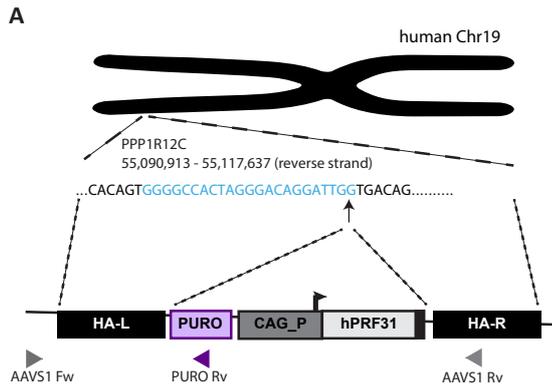
**Supplementary Figure 2. Derivation and characterization of a *PRPF31*-mutated (Tyr90CysfsX21) human iPSC line.**

**A** Pedigree of *PRPF31* family and Sanger sequence trace of fibroblasts from heterozygous c269\_273del patient 5331 (Tyr90CysfsX21). **B** Bright-field image of a representative iPSC colony derived from Tyr90CysfsX21 patient. Scale bar = 100  $\mu$ m. **C** Genomic stability of Tyr90CysfsX21 iPSCs assessed by digital q-PCR analysis of the most common iPSC genetic abnormalities (iCS-digital™ PSC test, Stem Genomics). **D** Immunofluorescence staining of pluripotency markers OCT4, SSEA4, NANOG and TRA1-60 for Tyr90CysfsX21 iPSCs. Scale bars = 100  $\mu$ m. **E** Differentiation capacity of Tyr90CysfsX21 iPSCs assessed by immunofluorescence staining of the germ layers markers TUJ1 and PAX6 (ectoderm), SOX17 and CXCR4 (endoderm) and BRACHYURY and SMA (mesoderm). Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bar = 100  $\mu$ m.



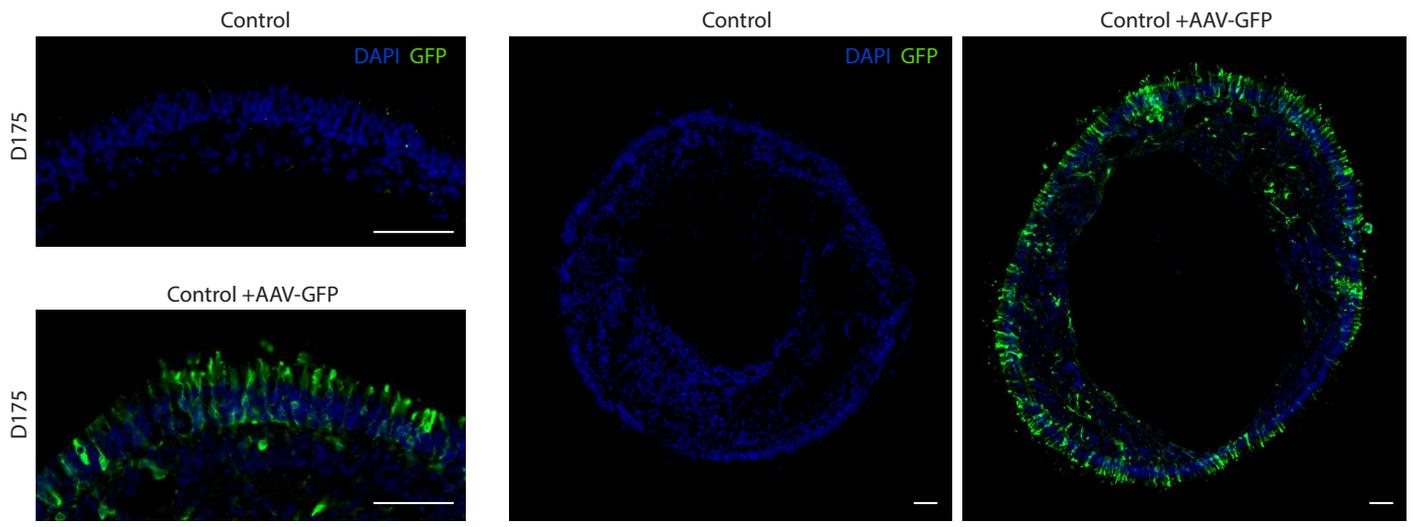
### Supplementary Figure 3. Generation and characterization of the isogenic control iPSC line by CRISPR/Cas9.

**A** Diagram showing the design of the gRNA (underlined) targeting specifically the mutated allele (upper sequence) with the 25-nucleotides duplication shown in red and the sequence of exogenous repair template ssODN highlighted in grey on the wild-type allele (lower sequence), used to correct the c709\_734dup *PRPF31* mutation and therefore generate Cys247X-Isogenic human iPSCs. **B** Results of the PCR evaluating the correction of the mutated allele. Amplification of the Cys247X heterozygous mutant lead to the amplification of the WT allele and the mutated allele (25 nucleotides larger). Gel shows only one band, corresponding to the amplification of the WT allele, in clones Iso2 to 11, confirming the correction of the mutated allele. **C** Bright-field images of a representative colony of Cys247X-Isogenic (Iso2) iPSCs. Scale bar = 100  $\mu$ m. **D** Genomic stability of Cys247X-Isogenic iPSCs (Iso2) assessed by digital q-PCR analysis of the most common iPSC genetic abnormalities (iCS-digital™ PSC test, Stem Genomics). **E** Pluripotency of Cys247X-Isogenic iPSCs (Iso2) assessed by immunofluorescence staining with markers OCT4, SSEA4, NANOG and TRA1-60. Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bar = 100  $\mu$ m.



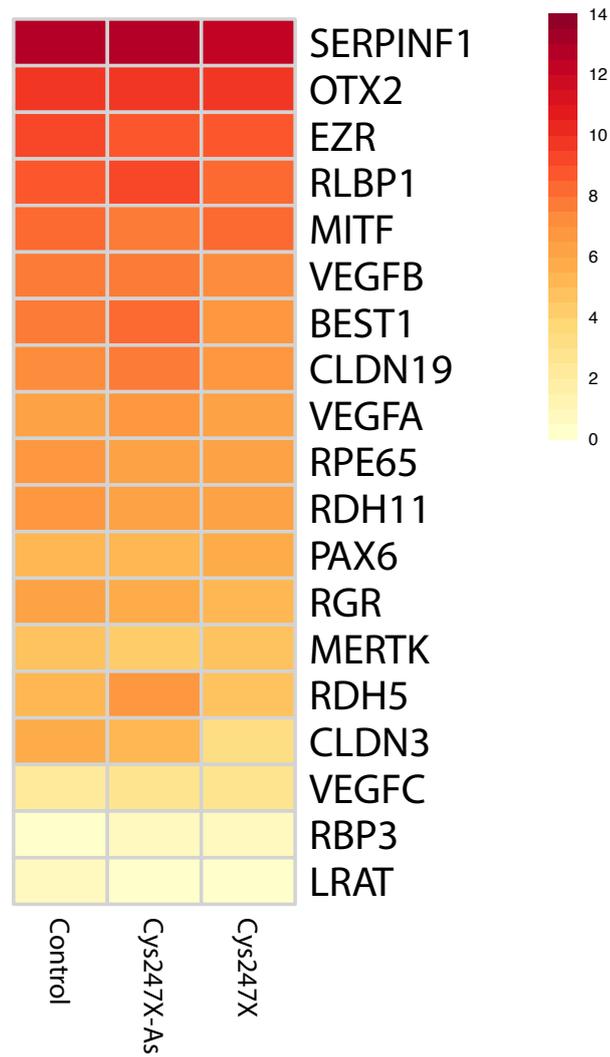
**Supplementary Figure 4. Generation and characterization of *PRPF31*-mutated iPSCs expressing a supplementary copy of *PRPF31*.**

**A** Schematic representation of CRISPR/Cas9, gRNA and inserted cassette used for the generation of the AAVS1::CAG-P\_*PRPF31* iPSCs. Triangles on the schema indicate the homology region of the primers (AAVS1 Fw, PURO Rv, AAVS1 Rv) used to validate the insertion of *PRPF31*. **B** Results of the PCR evaluating the integration of CAG-P\_*PRPF31* construct into AAVS1 site. Gel on the top shows the presence of the transgene in all puromycin-selected clones corresponding to the amplification product with AAVS1 Fw (upstream the integration site) and PURO Rv primers (within the cassette), as indicated in A. Gel on the bottom shows the result of the PCR with AAVS1 Fw and AAVS1 Rv primers (in the AAVS1 right homologous arm) amplifying exclusively the WT form of the AAVS1 locus allowing for distinction between homozygous (Tyr90CysfsX21 KI-2 and Cys247X KI-1, KI-2, KI-4) or heterozygous (Tyr90CysfsX21 KI-1 and Cys247X KI-3) integration. **C** Bright-field images of a representative colony of Cys247X-KI (KI-3) and Tyr90CysfsX21-KI (KI-1) iPSCs. Scale bar = 100  $\mu$ m. **D** Genomic stability of Cys247X-KI (KI-3) and Tyr90CysfsX21-KI (KI-1) iPSC cells assessed by digital q-PCR analysis of the most common iPSC genetic abnormalities (iCS-digital<sup>TM</sup> PSC test, Stem Genomics). **E** Pluripotency of Cys247X-KI (KI-3) and Tyr90CysfsX21-KI (KI-1) iPSCs assessed by immunofluorescence staining with markers OCT4, SSEA4, NANOG and TRA1-60. Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bar = 100 $\mu$ m.



**Supplementary Figure 5. AAV-GFP efficiently transduced iPSC-derived retinal organoids.**

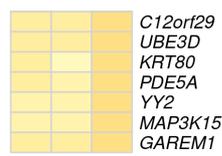
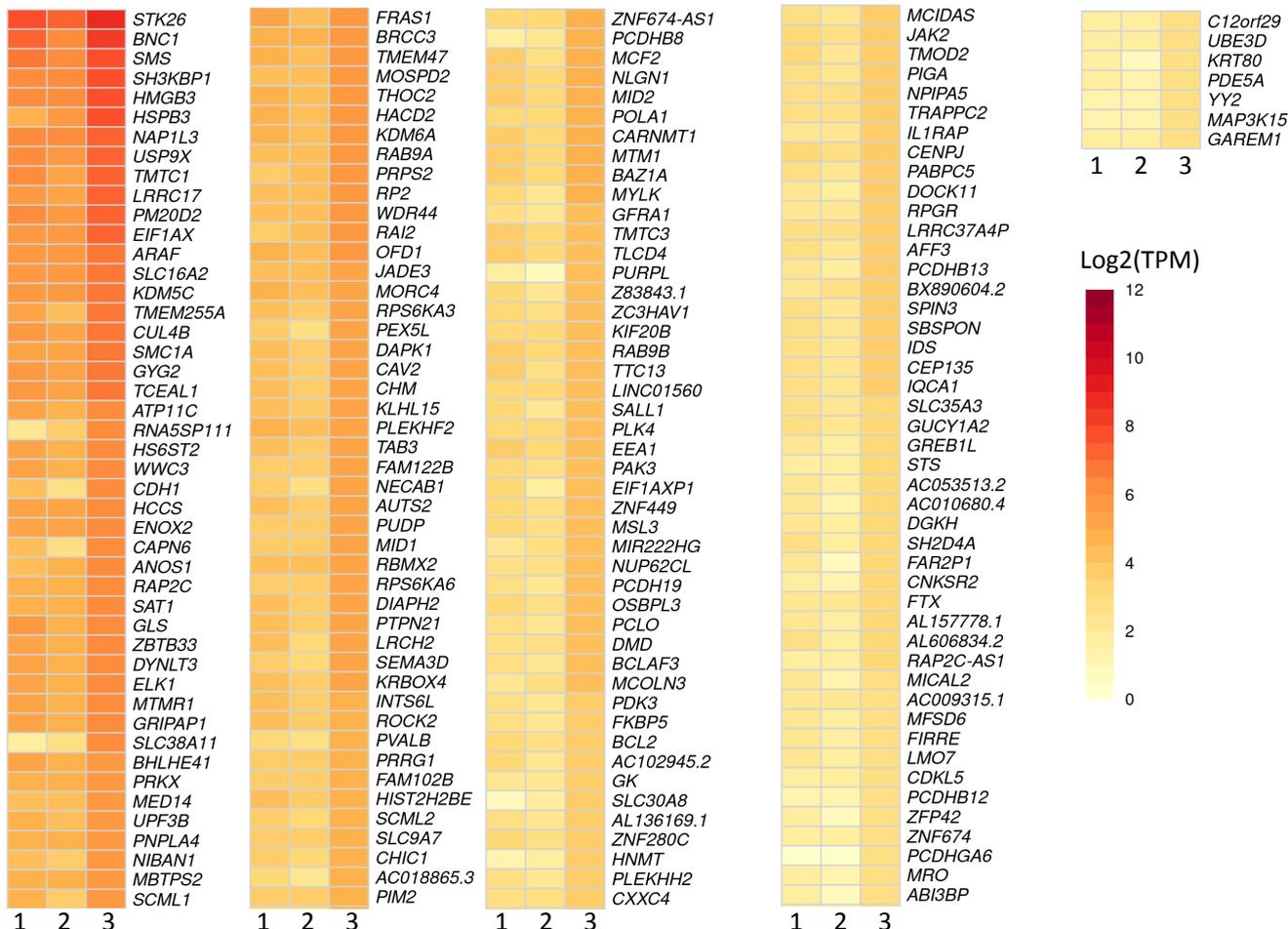
Immunofluorescence staining of cryosections from D175 retinal organoids not transduced (Control) or previously transduced at D85 with AAV-CAG-GFP (Control +AAV-GFP) using GFP antibody. Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bar = 100  $\mu$ m.



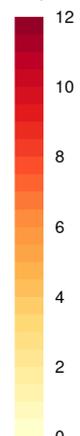
**Supplementary Figure 6. Heatmap RPE markers.**

Heatmaps of a selection of RPE-expressed genes. Expression values correspond to the mean Log<sub>2</sub>(TPM) for each group.

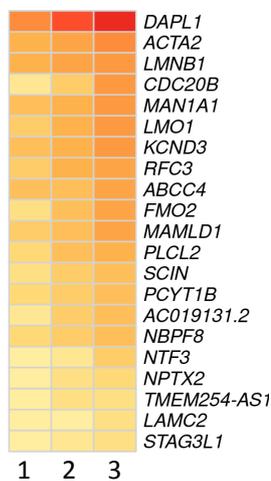
### Cluster 1



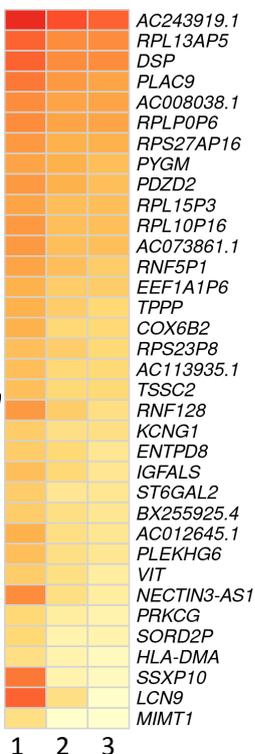
Log2(TPM)



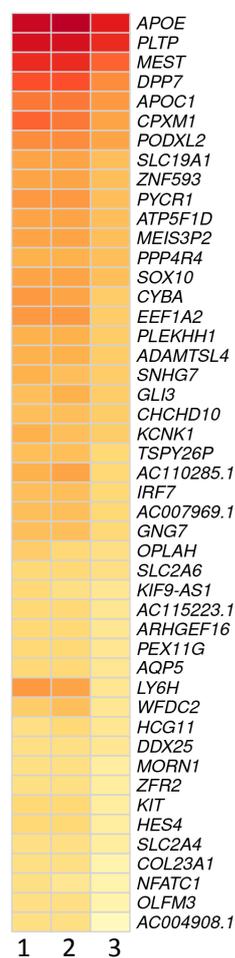
### Cluster 2



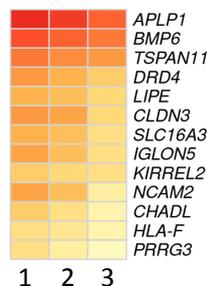
### Cluster 3



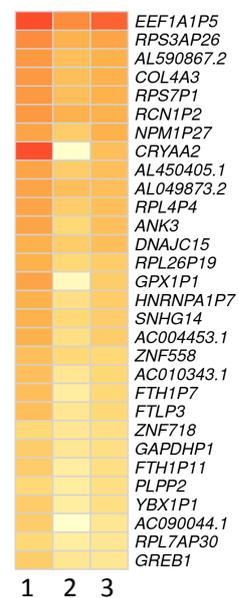
### Cluster 4



### Cluster 5

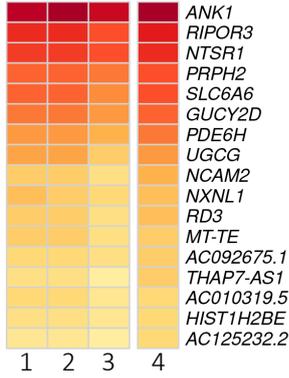
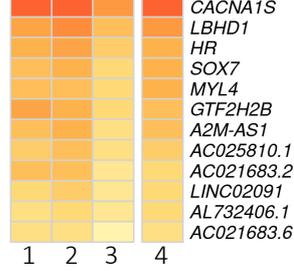
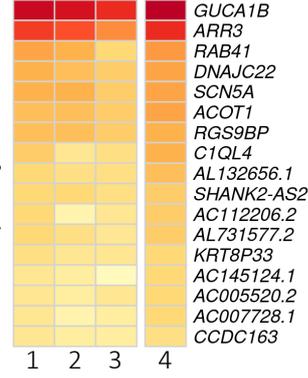
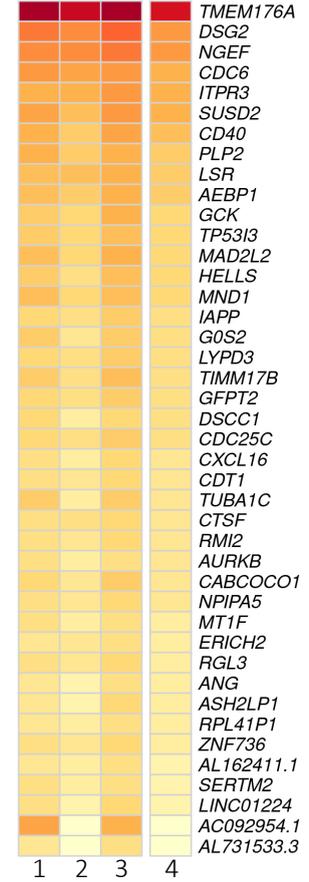
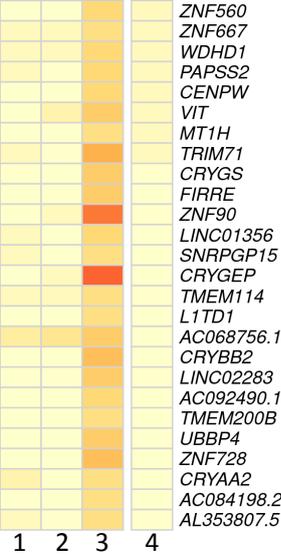
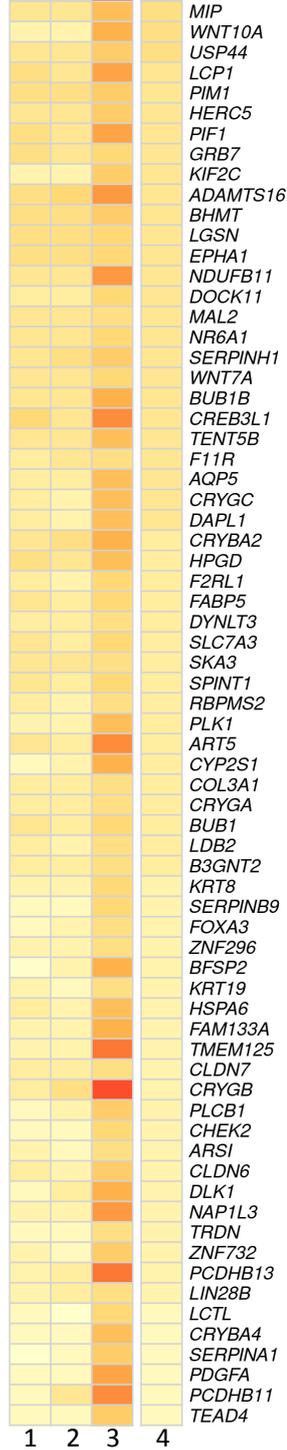
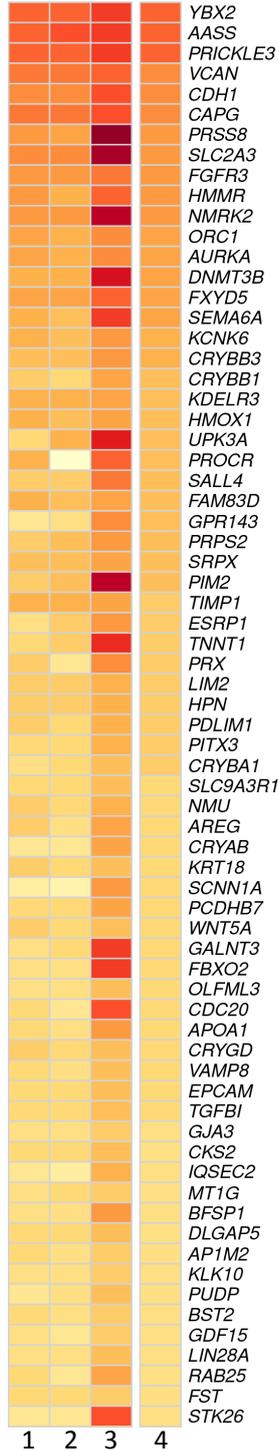
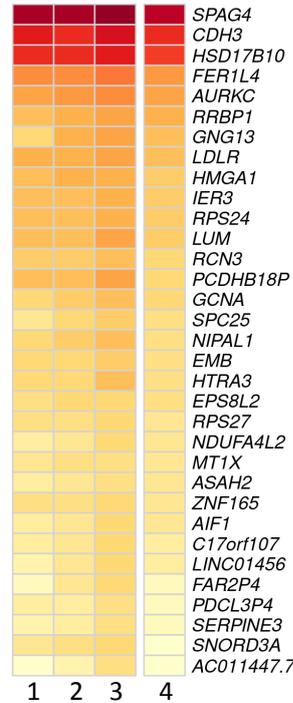
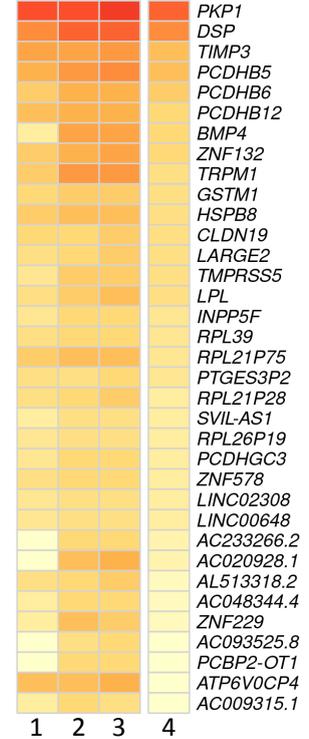


### Cluster 8



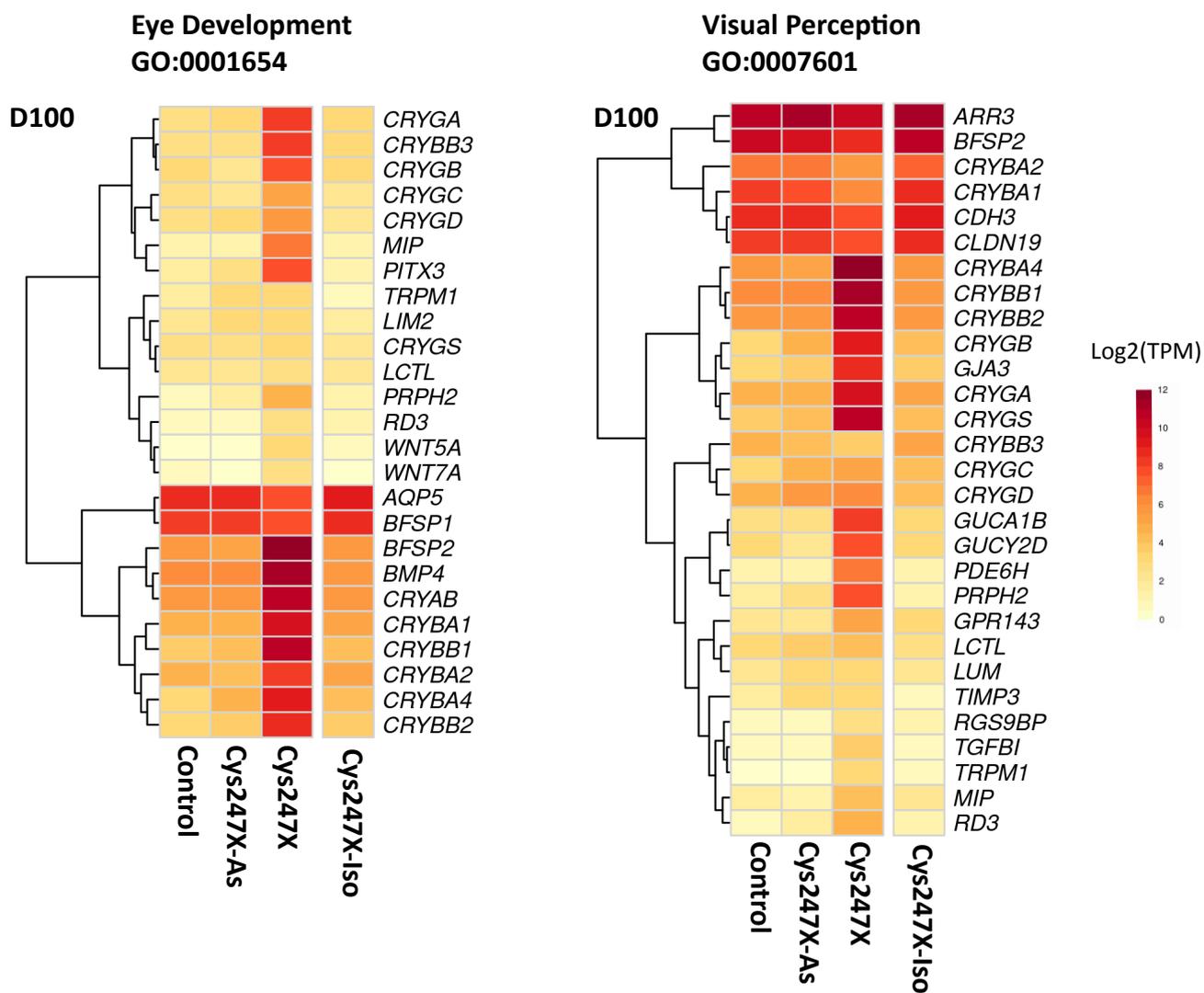
**Supplementary Figure 7. Selected clusters corresponding to the deregulated genes in hiRPE cells from Cys247X patients.**

Heatmaps of the 6 selected clusters of interest corresponding to deregulated genes in Cys247X hiRPE cells (related to Figure 7B). Expression values correspond to the mean  $\text{Log}_2(\text{TPM})$  for each group. Lane 1 : Control, lane 2 : Cys247X-As, lane 3 : Cys247X.

**Cluster 3****Cluster 8****Cluster 13****Cluster 1****Cluster 2****Cluster 6****Cluster 9**

**Supplementary Figure 8. Selected clusters corresponding to the deregulated genes in retinal organoids between Cys247X iPSCs and Cys247X-Isogenic corrected iPSCs.**

Heatmaps of the 7 selected clusters of interest corresponding to deregulated genes in Cys247X-Iso vs. Cys247X retinal organoids at D100 (related to Figure 8B). Expression values correspond to the mean Log<sub>2</sub>(TPM) for each group. Lane 1 : Control, lane 2 : Cys247X-As, lane 3 : Cys247X, lane 4 : Cys247X-Iso.



**Supplementary Figure 9. Heatmap of differentially expressed genes in D100 retinal organoids belonging to visual perception and Eye development pathways.**  
Expression values correspond to the mean Log2(TPM) for each group.





## Discussion et perspectives

### 1. Génération d'organoïdes rétiniens humains pseudo-laminés structurellement plus proches de la rétine humaine *in vivo*.

La compréhension des mécanismes à l'origine de certaines pathologies humaines représente un enjeu majeur de santé publique pour espérer développer des stratégies thérapeutiques adaptées. Dans le contexte des maladies rétiniennes, l'utilisation de modèles animaux pour l'analyse expérimentale et pour la validation préclinique se révèle souvent insuffisante voir inadaptée. En effet, la majorité des modèles animaux ne permettent pas d'analyser tous les aspects de la pathologie humaine, l'œil humain ayant ses propres spécificités, une taille et une structure différentes de ceux des rongeurs souvent utilisés en recherche, mais aussi la présence de régions hautement spécialisées telles que la macula et la fovéa, absentes notamment dans les modèles rongeurs, canins et félins (Slijkerman et al., 2015 ; Moshiri et al., 2019). Par ailleurs, les tissus post-mortem humains présentent généralement une dégénérescence trop avancée pour permettre l'étude et la compréhension des mécanismes pathologiques à l'origine du phénotype. La modélisation pathologique s'appuyant sur l'utilisation des cellules iPS permet de récapituler les mécanismes pathologiques *in vitro* et s'inscrit ainsi directement au cœur de la démarche de comprendre pour soigner. Ces cellules dérivées directement du patient ne portent pas uniquement la ou les mutations géniques d'intérêt, mais abritent l'ensemble du fond génétique du patient, c'est à dire les modifications génétiques connues et inconnues susceptibles de contribuer et d'expliquer les mécanismes et le phénotype de la maladie, avantage cruciale en raison de l'hétérogénéité génétique complexe des dystrophies rétiniennes héréditaires. Leur intérêt majeur repose sur leur propriété de pluripotence, il est ainsi possible de générer puis étudier les types cellulaires spécifiquement affectés, par exemple les photorécepteurs et les cellules de l'EPR dans le cadre des RP.

Il existe actuellement de très nombreux protocoles de différenciation permettant de générer des organoïdes rétiniens 3D à partir de cellules iPS humaines, en mimant les mécanismes impliqués lors de la rétino-genèse par l'utilisation séquentielle de facteurs et composés permettant l'activation successive des voies de signalisation du FGF et de l'IGF-1 ainsi que l'inhibition des deux voies de signalisation TGF- $\beta$  /BMP et Wnt (Thompson et al., 1998 ;

Takahashi et al., 2007). En plus de la composition des milieux de culture pro-neuraux, les conditions de culture en suspension ont permis de générer l'ensemble des types cellulaires de la rétine neurale au sein de structures 3D, avec une cinétique d'apparition reproduisant celle observée dans la rétine *in vivo*, et d'offrir un environnement plus favorable pour la maturation des photorécepteurs (Nakano et al., 2012 ; Meyer et al., 2011 ; Phillips et al., 2012 ; Reichman et al., 2014 et 2017; Zhong et al., 2014 ; Capowski et al., 2019).

Le protocole précédemment établis au sein de notre équipe a permis de s'affranchir de l'étape contraignante de formation de corps embryonnaires (EB) (Reichman et al., 2014 et 2017), mais majoritairement nécessaire jusque là (Nakano et al., 2012 ; Meyer et al., 2011 ; Phillips et al., 2012 ; Zhong et al., 2014). Ce protocole robuste et simplifié permet de générer simultanément les cellules de l'EPR et des organoïdes rétiniens contenant des progéniteurs rétiniens capables de se différencier dans tous les types cellulaires de la rétine neurale. Cependant, contrairement à la rétine qui présente une architecture laminée, la structure interne de ces organoïdes rétiniens s'organise sous forme de rosettes, ne permettant pas une maturation satisfaisante des cellules photoréceptrices et notamment la formation correcte de leurs segments externes. Cette différence peut s'expliquer par une désorganisation progressive de la région interne des structures cultivées, liée notamment à la perte des cellules ganglionnaires, prévisible en l'absence de cibles de projection neuronales possibles. Le rôle de ces projections axonales dans la structuration et la lamination de la rétine a notamment été démontré chez la souris et le poisson-zèbre (Icha et al., 2016 ; Tufford et al., 2018). L'absence de vascularisation des organoïdes, contrairement à la rétine interne *in vivo*, peut également être à l'origine d'une limitation du soutien métabolique au centre de la structure, accélérant la dégénérescence cellulaire interne et amplifiant ainsi la désorganisation générale observée pour les cultures à long terme. Enfin, l'absence de l'EPR au contact des photorécepteurs pourrait être déterminante dans l'altération structurale des organoïdes de neuro-rétines générées *in vitro*, chez la souris l'ablation de l'EPR au début du développement rétinien s'accompagne d'une perturbation de la stratification rétinienne avec formation de rosettes (Raymond et Jackson, 1995).

Dans l'objectif de modéliser au mieux les RP, il était indispensable d'optimiser notre protocole de différenciation afin de permettre l'étude morphologique et structurale des photorécepteurs matures, particulièrement affectés chez les patients. Pour répondre à la nécessité de préserver au maximum la lamination de nos structures rétiniennes 3D, la co-culture des organoïdes rétiniens avec une monocouche de cellules de l'EPR directement à leur contact représentait une perspective particulièrement intéressante car plus proche de la réalité physiologique, et récemment mise au point via un système d'organ-on a-chip (Ashberger et al.,

2019). Cependant, la culture séparée des cellules de l'EPR et des organoïdes de rétine permet d'étudier les phénotypes de chaque type cellulaire de manière indépendante, et ainsi déterminer précisément le ou les types cellulaires affectés dans le cadre de mutations dont les mécanismes pathologiques ne sont pas encore précisément connus, comme pour notre gène d'intérêt *PRPF31*. Dans ce contexte, nous nous sommes concentrés sur l'optimisation de nos conditions de culture via notamment l'utilisation de composés connus pour favoriser la survie cellulaire, afin de préserver au maximum les structures malgré les temps longs de culture requis pour la différenciation et la maturation des photorécepteurs. Ainsi, dans ce nouveau protocole optimisé, les organoïdes sont cultivés dans un milieu pro-neural plus riche, supplémenté en FBS et en Glutamax, ayant déjà démontrés leur bénéfice sur la survie des cellules rétinienne différenciées à partir de cellules ES ou iPS (Zhong et al., 2014 ; Slembrouck-Brec et al., 2019). Actuellement, de nombreux protocoles récents visant à générer des organoïdes rétiniens s'appuient sur des milieux de culture présentant une concentration relativement élevée en acide rétinoïque (AR) soit de manière continue sous forme de gradient croissant, ou pendant une période donnée généralement avant la maturation des photorécepteurs (autour du 85<sup>ème</sup> au 120<sup>ème</sup> jour selon le protocole utilisé), aboutissant à des organoïdes enrichis en photorécepteurs à bâtonnet (Wahlin et al. 2017 ; Gozalez-Cordero et al., 2017 ; Capowski et al., 2019). Afin d'optimiser la différenciation des cônes, nous avons choisi de ne pas ajouter d'AR exogène dans notre milieu de culture. En effet, différentes études ont montré que la voie de signalisation de l'AR joue un rôle important dans le développement des photorécepteurs en favorisant la différenciation des photorécepteurs de type bâtonnet, mais en inhibant la maturation des cônes chez le poulet et le poisson zèbre (Stevens et al., 2011 ; Alfano et al., 2011 ; Elred et al. ; 2018). De plus, la supplémentation continue en AR ne se révèle pas nécessaire pour produire des organoïdes rétiniens présentant des bâtonnets et des cônes matures, et semble diminuer voire empêcher l'expression de marqueurs des cônes dans les organoïdes rétiniens dérivés de cellules iPS murines ou humaines (Zhong et al., 2014 ; Li et al., 2018 ; Kruczek et al., 2017). Dans les conditions de culture que nous avons choisies, la vitamine A, précurseur de l'AR, est présente dans le supplément B27 au début de la culture en suspension et jusqu'au 84<sup>ème</sup> jour (Slembrouck-Brec et al., 2019). Les organoïdes plus matures sont ensuite cultivés jusqu'à la fin avec un supplément B27 dépourvu en vitamine A. Cette utilisation contrôlée du supplément B27 riche en vitamine A repose sur l'hypothèse que celle-ci peut être métabolisé en AR. Il serait donc particulièrement intéressant d'étudier l'expression des enzymes de synthèse (*Aldh1a1* et *Aldh1a3*) et des enzymes de catabolisation (*Cyp26a1* et *Cyp26a3*) de l'AR, dans les organoïdes rétiniens humains à différents stades de maturation, dont l'expression transitoire et hautement

localisée dans la rétine foetale humaine pourrait être à l'origine de la fovéa (Da Silva et Cepko, 2017). En effet la suppression localisée de l'AR (absence de synthèse ou augmentation de sa dégradation) s'est révélée cruciale pour le modelage de la région fovéale chez le poulet (Da Silva et Cepko, 2017). De plus, dans des organoïdes rétiniens dérivés de cellules ES murines, les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'AR (Raldh1, Raldh3 et Cyp26a1) sont apparues drastiquement régulées suivant une temporalité très précise, au début de la phase de maturation des précurseurs des cônes, mais se révèlent favorables ultérieurement pour la spécification des cônes en cônes bleus (Kruczek et al., 2017). Malgré différents protocoles de maturation, la répartition des sous-types de cônes au sein des organoïdes rétiniens humains s'est révélée majoritairement similaire à celle observée dans la rétine humaine *in vivo*, avec moins de cônes bleus et davantage de cônes rouges/verts (Zhong et al., 2014 ; Reichman et al., 2017 ; Li et al., 2018 ; Capowski et al., 2019 ; Eldred et al., 2018). Le contrôle de la spécification du sous-type des cônes est régi par la signalisation de l'hormone thyroïdienne (Brzezinski et Reh, 2015 ; Wang et Cepko, 2016 ; Eldred et al., 2018). Ainsi, il a été montré dans des organoïdes rétiniens dérivés de cellules iPS humaines, qu'en absence de récepteur de l'hormone thyroïdienne (Thrb), tous les cônes se spécifient en sous-type S. En revanche, l'ajout de triiodothyronine (T3), la forme la plus active de l'hormone thyroïdienne, qui se lie avec une grande affinité à Thrb induit le devenir de la majorité des cônes en sous-type L/M (Eldred et al., 2018). Dans notre protocole, le contrôle de la spécification du sous-type de cône dans les organoïdes rétiniens est probablement assuré par la présence de T3 dans le supplément B27 (Reichman et al., 2017 ; Slembrouck-Brec et al., 2019).

La composition optimisée de ce milieu de maturation mis au point dans le cadre de mon projet, et plus particulièrement la présence de FBS, favorise l'adhésion des organoïdes entre eux et leur adhérence au support, altérant fortement la structure à chaque point de contact. Ce protocole s'est alors accompagné d'une mise au point sur le plan technique tout aussi indispensable, avec l'isolement de chaque organoïde placé seul dans un puits, et l'utilisation de plaque de culture dont les puits ont été préalablement tapissés d'une couche d'hydrogel minimisant l'attachement cellulaire (Slembrouck et al., 2019). L'utilisation d'hydrogel ou de scaffold représente une perspective intéressante pour faciliter les conditions de culture, standardiser les différenciations et ainsi minimiser l'hétérogénéité entre les organoïdes, mais aussi pour protéger ces structures 3D extrêmement fragiles des chocs inhérents aux mouvements des plaques et des fluides notamment lors des changements de milieu qui s'avèrent très nombreux pour des temps de culture pouvant s'étendre au-delà de 200 jours (Li et al., 2021 ; Decembrini et al., 2020 ; Andreazzoli et al., 2021).

En optimisant le protocole de différenciation robuste préalablement défini dans notre équipe (Reichman et al., 2014 ; Reichman et al., 2017), nous sommes parvenus à générer des organoïdes rétiniens présentant tous les types cellulaires de la rétine neurale suivant une cinétique d'apparition similaire à celle observée au cours du développement de la rétine *in vivo*. L'organisation des différents types cellulaires au sein de l'organoïde ne suit plus une conformation en rosettes, mais se présente sous forme pseudo-laminée plus proche de la structure stratifiée de la rétine humaine *in vivo*, avec trois stades différents principaux se distinguant (Slembrouck-Brec et al. 2019) :

- Les organoïdes précoces (35 à 40 jours), constitués d'un neuro-épithélium contenant principalement des progéniteurs rétiniens en prolifération.
- Les organoïdes intermédiaires (60 à 100 jours), qui présentent une séparation nette entre deux couches nucléaires présomptives : une couche nucléaire externe siège de la différenciation des photorécepteurs, et une couche nucléaire interne correspondant aux populations de neurones de la rétine interne.
- Les organoïdes matures (après 150 à 175 jours), qui exposent à leur périphérie les photorécepteurs à cônes et à bâtonnets pouvant atteindre un stade avancé de maturation, illustré par la formation de segments internes, cils connecteurs et segments externes.

La nouvelle génération d'organoïdes rétiniens dérivés de cellules souches, dont la structure pseudo-laminée se rapproche davantage de la rétine *in vivo*, présente toutes les qualités attendues pour étudier le développement embryonnaire de la rétine humaine, et pour modéliser les maladies rétiniennes humaines, en particulier celles ciblant la rétine externe. Avec la génération de cellules pertinentes, capables d'atteindre les derniers stades de maturation, cette technologie novatrice ouvre la voie à des stratégies de modélisation pathologique plus fidèles, et promet de faciliter le développement de thérapies géniques, cellulaires et pharmacologiques pour l'ensemble des dystrophies rétiniennes.

## **2. Utilisation des cellules rétiniennes dérivées des iPS humaines pour la compréhension des mécanismes pathologiques et l'élaboration de stratégies innovantes.**

*Validation de l'utilisation des organoïdes pseudo-laminés comme outil de modélisation pathologique pour les RP.*

Afin de valider l'utilisation de nos organoïdes pseudo-laminés comme outil d'intérêt pour la modélisation des différentes formes de RP, nous nous sommes dans un premier temps appuyé sur une mutation bien caractérisée, dans le gène *RHODOPSINE* (*RHO*) pour tenter de récapituler le phénotype majeur de la maladie dans des conditions *in vitro*. Ce gène code pour le pigment protéique absorbant la lumière qui initie la cascade de transmission de signal dans les photorécepteurs à bâtonnet. Les mutations dans le gène *RHO* sont la première cause de RP autosomiques dominantes, qui se traduisent par une dégénérescence cellulaire des photorécepteurs à bâtonnet, puis la perte secondaire des photorécepteurs à cônes (Athnasiou et al., 2018). Différentes classifications des mutations du gène *RHO* ont été réalisées en fonction de leur manifestation clinique et de leur comportement biochimique et cellulaire, comme le mauvais repliement, la rétention dans le réticulum endoplasmique, le trafic post-Golgi ou un défaut d'adressage dans les segments externes (Mendes et al., 2005 ; Athnasiou et al., 2018). Nous nous sommes intéressés à la mutation c.1040C>T (P347L), la plus répandue en Europe (Audo et al., 2010), en utilisant les lignées de cellules iPS de patients précédemment établies et caractérisées au sein de notre équipe. Le gène *RHO* étant spécifique de la lignée des photorécepteurs, nous nous sommes concentrés sur l'étude des bâtonnets et des cônes au sein d'organoïdes rétiniens dérivés de cellules iPS mutées dans le gène *RHO*. Nous avons ainsi montré que la mutation du gène *RHO* n'interférait pas dans l'engagement des cellules progénitrices vers la lignée des photorécepteurs, les organoïdes rétiniens mutés présentant des précurseurs des bâtonnets et des cônes comme attendu après 100 jours de culture. Dans les organoïdes plus matures, nous avons pu mettre en évidence la présence de cellules exprimant des marqueurs de photorécepteurs différenciés et matures, suggérant que la mutation du gène *RHO* n'altère pas le processus de maturation des cellules photoréceptrices. Enfin, l'étude des organoïdes rétiniens portant la mutation P347L du gène *RHO* a révélé une dégénérescence

rapide des bâtonnets matures, suivie d'une perte secondaire des cônes matures, mimant fidèlement le phénotype observé chez les patients atteints de RP.

La mutation P347L appartenant à la classe I des mutations du gène *RHO*, étant définie par un défaut de transport de la Rhodopsine vers les segments externes, il serait intéressant d'utiliser les organoïdes rétiniens pour identifier plus précisément la localisation de la Rhodopsine dans les photorécepteurs matures, afin de déterminer si le défaut de localisation de la Rhodopsine est à l'origine de la maladie. Ce modèle pourrait également permettre de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires menant à la mort des cellules photoréceptrices, en évaluant l'expression de marqueurs de stress du réticulum endoplasmique tel que BAX et CHOP mis en évidence dans le cadre d'une autre mutation de classe I, la mutation P23H (Comitato et al., 2014) ; et l'activation potentielle de différentes voies d'apoptose et de la nécrose médiée par l'inflammasome NLRP3, identifiés dans des modèles rongeurs de RP liées à une mutation du gène *RHO* comme impliquées dans la mort cellulaire des photorécepteurs (Athanasίου et al., 2018; Viringipurampeer et al., 2016). Enfin, la génération de lignées cellulaires isogéniques s'avère indispensable pour confirmer l'implication de la mutation étudiée dans le phénotype observé au vu de la variabilité inhérente aux cellules iPS. Les contrôles isogéniques sont également requis pour s'affranchir des biais potentiels apportés par le fond génétique et épigénétique du patient dont sont dérivées les cellules iPS, et ainsi étudier uniquement les conséquences liées à la mutation d'intérêt. Concernant la mutation dans le gène *RHO*, ces lignées sont actuellement en cours de construction à l'aide de différentes stratégies d'édition génique CRISPR/Cas9, telles que l'approche déjà validée de "Base editing" permettant de corriger précisément une mutation spécifique sans coupure de l'ADN (Steyer et al., 2018 ; Rees et al., 2018 ; Molla et al., 2019).

L'ensemble des résultats obtenus lors de notre étude préliminaire portant sur le gène *RHO* nous a permis de confirmer la capacité des organoïdes pseudo-laminés à récapituler *in vitro* le phénotype pathologique observé *in vivo* chez les patients. Actuellement, ce type d'analyse est étendu au sein de notre équipe à un plus grand nombre de mutations du gène *RHO*, afin de corréler le type de mutation et le(s) mécanisme(s) responsable(s) de la mort des photorécepteurs comme proposé dans la littérature (Mendes et al., 2005 ; Athanasίου et al., 2018). Le fait que cette approche pourrait être étendue à d'autres gènes dont les mécanismes étiologiques liés à des mutations causatives sont beaucoup moins connus, en fait un outil d'intérêt majeur pour la modélisation des dystrophies rétiniennes. Les organoïdes rétiniens représentent également un attrait fondamental, en particulier en absence de modèle animal satisfaisant, pour les études

précliniques et cliniques avec un potentiel d'accélérateur pour la conception de stratégies thérapeutiques innovantes. En effet, en comprenant la physiopathologie sous-jacente aux phénotypes cliniques des RP, davantage d'approches thérapeutiques cohérentes peuvent être envisagées, mais également testées *in vitro*. De plus, l'accès à ces cellules différenciées directement à partir de cellules iPS dérivées de patients représentent un intérêt évident pour le screening pharmacologique. Après validation de la physiopathologie d'une maladie avec ces modèles cellulaires puissants, des candidats pharmacologiques pertinents pourront être identifiés et testés afin de développer des traitements efficaces. En conclusion, de tels modèles pourraient permettre de réduire les besoins en modèles animaux ou palier à l'absence de modèles animaux satisfaisants, mais aussi de concevoir et tester de nombreuses stratégies innovantes permettant potentiellement de conduire plus rapidement à des études précliniques et des essais cliniques.

### *Modélisation d'une forme de RP liée au gène PRPF31 et thérapie d'augmentation génique.*

Après avoir mis en évidence la possibilité de récapituler un phénotype de type RP *in vitro* à partir de cellules rétiniennes humaines dérivées de cellules iPS, nous nous sommes intéressés au gène *PRPF31* afin de comprendre la pathogenèse des RPs liées aux mutations décrites dans ce gène. *PRPF31* est décrit comme le deuxième gène le plus fréquemment muté à l'origine des formes autosomiques dominantes de RP, représentant jusqu'à 10% des cas (Rose et al., 2017 ; Wheway et al. 2020). La grande majorité des mutations affectant le gène *PRPF31* mènent à l'apparition d'un code stop prématuré, et à la dégradation de l'ARNm correspondant, aboutissant à la perte de fonction de l'allèle muté (Wheway et al., 2020). Si l'existence d'isoformes spécifiques de *PRPF31* dans la rétine a été exclue, il a été montré dans les rétine de souris adultes (Cao et al., 2011) et également dans des rétines humaines post-mortem que les taux d'expression des facteurs d'épissage (dont *PRPF31*) sont plus élevés que dans les autres tissus, soulignant l'activité et les besoins transcriptionnels importants dans la rétine (Tanackovic et Rivolta, 2009). Actuellement, les raisons expliquant pourquoi les mutations de ce gène affectent uniquement la rétine malgré une activité ubiquitaire, le ou les types cellulaires rétiniens premièrement affectés par la dégénérescence, ainsi que les mécanismes moléculaires

impliqués n'ont pas été clairement identifiés. Les études réalisées sur différents modèles animaux ont révélé leurs limites, ceux-ci n'étant pas capable de récapituler pleinement le phénotype observé chez les patients. En effet, les souris portant une mutation dans le gène *Prpf31* arborent uniquement une dégénérescence des cellules de l'EPR à des stades très tardifs, et aucune altération notable dans les photorécepteurs pourtant sévèrement affectés chez l'homme (Bujakowska et al., 2009 ; Farkas et al., 2014 ; Graziotto et al., 2011). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que chez la souris, PRPF31 est très majoritairement exprimé dans l'EPR et faiblement dans la rétine neurale (Valdes-Sanchez et al., 2019). Le poisson-zèbre a permis lui de récapituler uniquement la dégénérescence liée aux photorécepteurs (Yin et al., 2011). Dans ce contexte, les cellules rétiniennes différenciées à partir de cellules iPS humaines, directement obtenues à partir de cellules de patients porteur d'une mutation dans le gène *PRPF31*, représentent un espoir majeur pour tenter de récapituler fidèlement le phénotype observé *in vivo*, comprendre les mécanismes physiopathologiques causales et mettre au point des stratégies thérapeutiques adaptées.

Dans un premier temps, nous sommes parvenus à générer des cellules de l'EPR et des organoïdes rétiniens pseudo-laminés à partir de plusieurs lignées cellulaires iPS portant différentes mutations dans le gène *PRPF31*, confirmant que le processus de différenciation n'est pas altéré.

Nous avons ainsi montré que les cellules de l'EPR portant une mutation dans le gène *PRPF31* présentent plusieurs défauts d'organisation cellulaire illustrés par une désorganisation du tapis cellulaire qui se caractérise par une anomalie de l'adhérence et de l'adhésion cellule-cellule, l'absence de desmosomes et de lame basale, et une altération de la polarité apico-basale. L'incapacité de ces cellules à former un tapis cohésif et jointif s'est confirmée par l'impossibilité de mesurer une résistance transépithéliale significative. Ces altérations morphologiques se sont accompagnées d'une atteinte fonctionnelle attendue, avec une diminution marquée de la capacité à phagocyter et plus spécifiquement à internaliser les segments externes des photorécepteurs. Nos résultats font échos aux défauts d'adhésion et de phagocytose précédemment observés *in vitro* dans les cellules de l'EPR de souris *Prpf31* +/-, et à partir d'une lignée humaine de cellules de l'EPR au sein de laquelle l'expression de *PRPF31* a été réprimée (Farkas et al., 2015). Ils sont également en accord avec ceux obtenus dans une étude plus récente, menée à partir de cellules de l'EPR dérivés de cellules iPS de trois patients portant différentes mutations dans le gène *PRPF31* (c1115\_1125del11 et c.522\_527+10del), et présentant un phénotype clinique modéré, sévère ou très sévère. Leurs

résultats mettent en lumière des défauts d'adhésion, de taille et de nombre des microvillosités, de polarité, mais aussi de phagocytose plus ou moins marqué *in vitro* selon la sévérité de la maladie observée *in vivo* (Buskin et al. 2018).

Au sein des organoïdes rétiniens pseudo-laminés portant une mutation dans le gène *PRPF31*, nous avons pu mettre en évidence une dégénérescence progressive des photorécepteurs matures affectant dans un premier temps les bâtonnets, et entraînant dans un second temps la perte des cônes. Ces résultats démontrent pour la première fois qu'il est possible de récapituler le phénotype rétinien caractéristique des RP, observé *in vivo* chez les patients portant une mutation dans le gène *PRPF31*. Ils permettent également de compléter les observations mises en évidence dans les photorécepteurs différenciés dans des organoïdes de 150 jours, dérivés de cellules iPS humaines mutées dans le gène *PRPF31* (c1115\_1125del11 et c.522\_527+10del), présentant une altération du cil connecteur (Buskin et al., 2018)

L'ensemble de la caractérisation phénotypique a été menée en parallèle avec des cellules rétiniennes différenciées à partir de lignées isogéniques où la mutation du gène *PRPF31* a été corrigée précisément, sans altérer la stabilité génomique et la capacité de pluripotence des cellules iPS. La réversion complète du phénotype obtenue à partir de ce contrôle robuste a permis de confirmer l'implication de la mutation du gène *PRPF31* dans le processus de dégénérescence rétinienne observé.

En lien avec la fonction d'épissage de *PRPF31*, l'étude transcriptomique approfondie des cellules rétiniennes différenciées nous a permis d'identifier des transcrits différentiellement exprimés et ou/épissés en lien direct avec les altérations phénotypiques observées à l'échelle cellulaire et le mécanisme de traitement des ARNm. Principalement des gènes impliqués dans l'organisation du cytosquelette, l'adhésion focale, l'adhésion cellule-cellule, ou encore la matrice extracellulaire pour les cellules de l'EPR ; et les voies de perception visuelle, les segments externes des photorécepteurs, les cils ou encore les mécanismes d'apoptose pour les organoïdes rétiniens. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment soit à partir de cellules de l'EPR et d'organoïdes de rétines issus de cellules iPS de patients portant une mutation dans le gène *PRPF31* (Buskin et al., 2018), soit sur des explants de rétines humaines après traitement avec des siARN ciblant *PRPF31* (Azzizadeh Pormer et al., 2019). La quantification des différents types d'événements d'épissage alternatifs, dans les cellules de l'EPR et les organoïdes rétiniens, a montré que les événements de saut d'exons ou d'exons mutuellement exclusifs correspondent aux événements les plus souvent différents entre les patients affectés et les contrôles. Excepté les gènes présentant un lien de cause à effet évident

avec le phénotype de dégénérescence rétinienne observé *un vitro*, des événements d'épissage altérés ont également été observés dans différents gènes impliqués dans les voies de traitement de l'ARN, y compris le mécanisme d'épissage lui-même. La mise en évidence d'un tel processus d'autorégulation des facteurs d'épissage sur leur propre fonction suggère que l'exacerbation des insuffisances en épissage peut contribuer au phénotype défectueux observé dans les cellules de l'EPR et les organoïdes rétiniens *in vitro*, et donc probablement chez les patients atteints de RP liées à une mutation dans le gène *PRPF31*. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment dans les cellules de l'EPR et les organoïdes rétiniens dérivés de cellules iPS de patients porteurs de différentes mutations *PRPF31* (Buskin et al., 2018), et dans des explants de rétines humaines après traitement avec des siARN ciblant *PRPF31* (Azzizadeh Pormer et al., 2019). L'ensemble de ces résultats confirme l'idée que les mutations dans le gène *PRPF31* affectent de manière distincte à la fois les cellules de l'EPR et les photorécepteurs chez l'homme. La dégénérescence des photorécepteurs pourrait être dû à la fois à un mécanisme autonome (propre aux photorécepteurs), mais aussi en conséquence d'une altération des cellules de l'EPR. Pour cette raison, ces deux types cellulaires sont à considérer pour l'élaboration d'approches thérapeutiques efficaces. L'identification des transcrits différenciellement exprimés et/ou épissés, à l'origine du phénotype observé dans les cellules rétiniennes différenciées à partir de cellules iPS portant une mutation dans le gène *PRPF31*, pourrait permettre d'identifier des cibles intéressantes pour des futures thérapies pharmacologiques visant à ralentir ou à guérir les RP.

De nombreuses études ont démontré le lien entre le niveau d'ARNm *PRPF31* produit et la pénétrance du phénotype associé. En effet, les patients asymptomatiques se distinguaient des patients symptomatiques porteurs de la même mutation, par un niveau d'expression plus important des ARNm de *PRPF31* (Waseem et al., 2007 ; Venturini et al., 2012). La pénétrance incomplète d'un phénotype est souvent associée à l'hypothèse d'haplo-insuffisance, c'est à dire la capacité de l'allèle sain à produire une quantité d'ARNm et donc de protéine sauvage en quantité suffisante pour compenser la présence de l'allèle pathologique et ainsi assurer la fonction biologique de la protéine chez les patients asymptomatiques. Lors de notre étude, nous avons pu corrélér le phénotype « malade » observé dans les cellules de l'EPR et dans les organoïdes de rétine avec un niveau d'expression moins élevé de la protéine *PRPF31*. De plus, nous sommes parvenus à restaurer, dans les cellules rétiniennes différenciées à partir des cellules iPS isogéniques ne présentant pas d'altérations, un niveau d'expression de *PRPF31* similaire à celui observé chez un individu ne portant pas de mutation dans le gène *PRPF31*.

Pour renforcer ces résultats, nous nous sommes appuyés sur les cellules iPS issues d'un patient asymptomatique précédemment obtenues dans notre équipe (Terray et al. 2017). Nous avons pu mettre en évidence à partir de ces cellules de patient asymptomatique, pour la première fois, l'absence de signe de dégénérescence dans les cellules rétinienne différenciées, associée à un niveau d'expression de la protéine *PRPF31* supérieur à leurs homologues issus de cellules de patients symptomatiques. L'ensemble de ces résultats établissant un lien direct entre le phénotype de dégénérescence rétinienne et le niveau d'expression de la protéine PRPF31, confirme que le mécanisme d'haploinsuffisance est à la base du développement de la maladie. Cependant, récemment quelques études menées chez la souris (Valdes-Sanchez et al., 2019) et dans des cellules rétinienne différenciées à partir d'iPS de patients PRPF31 (Buskin et al., 2018) ont permis de détecter une forme tronquée de la protéine PRPF31 codée par l'allèle mutant, et ainsi soulever des questions sur la possibilité d'un effet dominant-régitif combiné à un mécanisme d'haploinsuffisance certain. Au cours de notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de forme mutée de la protéine par western-blot pour les deux mutations étudiées (Cys247X et Tyr90CysfsX21), ni de transcrits aberrants du gène *PRPF31*.

Dans un tel contexte, la stratégie thérapeutique potentielle la plus évidente repose sur l'augmentation génique, qui présente l'avantage de ne pas être mutation-spécifique, et ainsi de pouvoir répondre à un grand nombre de mutations, le gène *PRPF31* recensant actuellement près de 140 mutations causales (Whewey et al., 2020). L'insertion par CRISPR/Cas9 d'une copie saine du gène *PRPF31* dans le locus AAVS1 de cellules iPS de patients RP, a permis de réverser complètement le phénotype des cellules de l'EPR et des photorécepteurs matures différenciés, et de rétablir le niveau d'expression de la protéine PRPF31. Ces résultats très encourageants, et la taille de la séquence codante du gène PRPF31 (1,5 kb) compatible avec les capacité d'empaquetage des vecteurs de thérapie génique AAV actuels, nous ont orienté vers une technique plus proche de celle envisageable en clinique. En nous appuyant sur le succès de l'essai clinique démontrant une efficacité sur la restauration de la vision à long terme après injection sous-rétinienne d'AAV2 contenant l'ADNc de *RPE65* (Acland et al., 2005), nous avons exploré si une telle stratégie pouvait également permettre de restaurer la dégénérescence des photorécepteurs survenant au sein des organoïdes portant une mutation du gène *PRPF31*. Le variant AAV2-7m8 a été choisi après avoir précédemment démontré une haute efficacité de transduction sans compromettre la viabilité cellulaire d'organoïdes rétiniens générés à partir de notre protocole de différenciation (Kabou et al., 2018 ; Garita-Hernandez et al., 2019 et 2020). Nous sommes parvenus à restaurer le niveau d'expression de la protéine *PRPF31* et ainsi prévenir la dégénérescence des photorécepteurs à bâtonnet et à cône dans les organoïdes

rétiniens préalablement transduits. Ils présentent après 175 jours de culture un nombre de photorécepteurs similaire à ceux des structures dépourvues de mutation dans le gène *PRPF31*, et pas de signe d'altération morphologique avec la présence de segments internes et externes normaux. Ces résultats démontrent que l'augmentation du niveau d'expression de *PRPF31* directement dans les organoïdes rétiniens, avant les premiers signes de dégénérescence, est suffisante pour préserver la survie des photorécepteurs matures. Par la suite, il sera très intéressant de déterminer si cette stratégie s'avère efficace également à des stades plus tardifs de la maladie, lorsque la dégénérescence des photorécepteurs a déjà débuté. De plus, nos résultats viennent compléter l'étude récente visant à transduire les cellules de l'EPR, différenciées à partir de cellules iPS portant une mutation dans le gène *PRPF31*, avec le vecteur AAV2 contenant une copie saine de *PRPF31*, et aboutissant à une réversion des signes majeurs de dégénérescences de l'EPR (Brydon et al., 2019). Les mutations du gène *PRPF31* affectant à la fois les photorécepteurs et les cellules de l'EPR, la perspective la plus attrayante serait de développer cette stratégie d'augmentation génique en utilisant un vecteur AAV présentant un tropisme privilégié pour ces deux types cellulaires, afin de pouvoir les cibler de manière simultanée.

Enfin, le niveau d'expression de *PRPF31* étant potentiellement soumis à différents régulateurs, notamment *CNOT3* identifié comme régulateur négatif spécifique (Venturini et al., 2012 ; Rose et al., 2014), il serait intéressant de confirmer l'implication de ce facteur dans notre modèle, mais aussi définir plus précisément le mécanisme de régulation de cette potentielle future cible thérapeutique.

En conclusion, nous avons montré que les organoïdes de rétine issus de cellules iPS de patients atteints de RP forment un outil très puissant de modélisation de la dégénérescence rétinienne observée chez les patients. Par ailleurs, les résultats présentés dans notre étude fournissent plusieurs renseignements importants sur la pathogenèse des RP liées aux mutations du gène *PRPF31*. Le développement de tels modèles permettant de récapituler fidèlement la pathologie observée chez les patients est d'une importance cruciale, en particulier en absence de modèles animaux satisfaisants. Puisque la majorité des mutations *PRPF31* conduisent à la formation d'un codon stop prématuré, telles que les deux mutations (Cys247X et Tyr90CysfsX21) étudiées dans ce projet, il est pertinent de penser que notre modèle sera à même de récapituler de manière générale le phénotype rétinien induit par les RP liées à la majorité des mutations du gène *PRPF31*. L'établissement de notre modèle a également fournit

de précieuses informations sur l'épissage des ARNm dans la rétine dans un contexte humain. Ainsi, l'utilisation des cellules iPS offre aussi la possibilité d'étudier la pathogenèse des RP dues à des mutations dans d'autres facteurs d'épissage tels que PRPF3 et PRPF8, et déterminer si un mécanisme commun pourrait être responsable du développement de ces RP spécifiques (Yang et al., 2021). La mise en évidence d'une étiologie similaire permettrait de développer une future thérapie commune, qui pourrait cibler l'ensemble du groupe de RP associé à un défaut affectant un facteur d'épissage de l'ARN, deuxième cause principale de RP autosomique dominante après la mutation du gène *RHO*. Enfin, la validation de la stratégie thérapeutique d'augmentation génique dans un contexte d'haploinsuffisance pourra ouvrir la voie à des études menées *in vivo*, afin d'identifier le timing optimal et le dosage adapté pour minimiser la toxicité et assurer la sécurité d'un traitement si prometteur pour les patients.

Concernant les différentes pathologies dégénératives héréditaires de la rétine, le modèle organoïde mais également l'utilisation de cellules de l'EPR issus de cellules iPS de patients sont particulièrement pertinents pour valider l'ensemble des approches de thérapie génique qui commencent à se développer en ophtalmologie pour le traitement des RP à transmission autosomique récessive (Garafalo et al., 2020 ; Georgiou et al., 2021).





# Bibliographie

## A

- Achberger K, Probst C, Haderspeck J, Bolz S, Rogal J, Chuchuy J, ... Loskill P (2019) Merging organoid and organ-on-a-chip technology to generate complex multi-layer tissue models in a human retina-on-a-chip platform *Elife* **8**, e46188.
- Acland G. M., Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV, ... Bennett J (2001) Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness *Nat Genet* **28**, 92–95.
- Acland Gregory M., Aguirre GD, Bennett J, Aleman TS, Cideciyan AV, Benniselli J, ... Jacobson SG (2005) Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness *Mol Ther* **12**, 1072–1082.
- Adler R, and Canto-Soler MV (2007) Molecular mechanisms of optic vesicle development : complexities, ambiguities and controversies *Dev Biol* **305**, 1–13.
- Aït-Ali N, Fridlich R, Millet-Puel G, Clérin E, Delalande F, Jaillard C, ... Léveillard T (2015) Rod-derived cone viability factor promotes cone survival by stimulating aerobic glycolysis *Cell* **161**, 817–832.
- al-Magthteh M, Inglehearn CF, Keen TJ, Evans K, Moore AT, Jay M, ... Bhattacharya SS (1994) Identification of a sixth locus for autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19 *Hum Mol Genet* **3**, 351–354.
- Alfano G, Conte I, Caramico T, Avellino R, Arnò B, Pizzo MT, ... Banfi S (2011) Vax2 regulates retinoic acid distribution and cone opsin expression in the vertebrate eye *Development* **138**, 261–271.
- Allocca M, Mussolino C, Garcia-Hoyos M, Sanges D, Iodice C, Petrillo M, ... Auricchio A (2007) Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors *J Virol* **81**, 11372–11380.
- Al-Magthteh M, Vithana E, Tartelin E, Jay M, Evans K, Moore T, ... Inglehearn CF (1996) Evidence for a major retinitis pigmentosa locus on 19q13.4 (RP11) and association with a unique bimodal expressivity phenotype *Am J Hum Genet* **59**, 864–871.
- Amado D, Mingozzi F, Hui D, Benniselli JL, Wei Z, Chen Y, ... Bennett J (2010) Safety and efficacy of subretinal readministration of a viral vector in large animals to treat congenital blindness *Sci Transl Med* **2**, 21ra16.
- Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, ... Thomson JA (2000) Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture *Dev Biol* **227**, 271–278.
- Anders C, Niewoehner O, Duerst A, and Jinek M (2014) Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease *Nature* **513**, 569–573.
- Ando Y, Ohmori M, Ohtake H, Ohtoko K, Toyama S, Usami R, ... Kato S (2007) Mutation screening and haplotype analysis of the rhodopsin gene locus in Japanese patients with retinitis pigmentosa *Mol Vis* **13**, 1038–1044.
- Andreazzoli M, Barravecchia I, De Cesari C, Angeloni D, and Demontis GC (2021) Inducible Pluripotent Stem Cells to Model and Treat Inherited Degenerative Diseases of the Outer Retina : 3D-Organoids Limitations and Bioengineering Solutions *Cells* **10**, 2489.

- Apfelstedt-Sylla E, Theischen M, Rüther K, Wedemann H, Gal A, and Zrenner E (1995) Extensive intrafamilial and interfamilial phenotypic variation among patients with autosomal dominant retinal dystrophy and mutations in the human RDS/peripherin gene *Br J Ophthalmol* **79**, 28–34.
- Arshavsky V (2002) Like night and day : rods and cones have different pigment regeneration pathways *Neuron* **36**, 1–3.
- Athanasiou D, Aguila M, Bellingham J, Li W, McCulley C, Reeves PJ, and Cheetham ME (2018) The molecular and cellular basis of rhodopsin retinitis pigmentosa reveals potential strategies for therapy *Prog Retin Eye Res* **62**, 1–23.
- Audo I, Bujakowska K, Mohand-Saïd S, Lancelot M-E, Moskova-Doumanova V, Waseem NH, ... Zeitz C (2010) Prevalence and novelty of PRPF31 mutations in French autosomal dominant rod-cone dystrophy patients and a review of published reports *BMC Med Genet* **11**, 145.
- Audo I, Manes G, Mohand-Saïd S, Friedrich A, Lancelot M-E, Antonio A, ... Zeitz C (2010) Spectrum of rhodopsin mutations in French autosomal dominant rod-cone dystrophy patients *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**, 3687–3700.
- Ayton LN, Barnes N, Dagnelie G, Fujikado T, Goetz G, Hornig R, ... Petoe MA (2020) An update on retinal prostheses *Clin Neurophysiol* **131**, 1383–1398.
- Azizzadeh Pormehr L, Ahmadian S, Daftarian N, Mousavi SA, and Shafieezadeh M (2020) PRPF31 reduction causes mis-splicing of the phototransduction genes in human organotypic retinal culture *Eur J Hum Genet* **28**, 491–498.

## B

- Bailey TJ, El-Hodiri H, Zhang L, Shah R, Mathers PH, and Jamrich M (2004) Regulation of vertebrate eye development by Rx genes *Int J Dev Biol* **48**, 761–770.
- Ban Y, and Rizzolo LJ (2000) Regulation of glucose transporters during development of the retinal pigment epithelium *Brain Res Dev Brain Res* **121**, 89–95.
- Bannikov AV, and Lavrov AV (2017) [CRISPR/CAS9, the King of Genome Editing Tools] *Mol Biol (Mosk)* **51**, 582–594.
- Bemelmans A-P, Bonnel S, Houhou L, Dufour N, Nandrot E, Helmlinger D, ... Mallet J (2005) Retinal cell type expression specificity of HIV-1-derived gene transfer vectors upon subretinal injection in the adult rat: influence of pseudotyping and promoter *J Gene Med* **7**, 1367–1374.
- Bemelmans A-P, Husson I, Jaquet M, Mallet J, Kosofsky BE, and Gressens P (2006) Lentiviral-mediated gene transfer of brain-derived neurotrophic factor is neuroprotective in a mouse model of neonatal excitotoxic challenge *J Neurosci Res* **83**, 50–60.
- Ben M'Barek K, Habeler W, Plancheron A, Jarraya M, Regent F, Terray A, ... Monville C (2017) Human ESC-derived retinal epithelial cell sheets potentiate rescue of photoreceptor cell loss in rats with retinal degeneration *Sci Transl Med* **9**, eaai7471.
- Berger W, Kloeckener-Gruissem B, and Neidhardt J (2010) The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases *Prog Retin Eye Res* **29**, 335–375.

- Bessant DA, Ali RR, and Bhattacharya SS (2001) Molecular genetics and prospects for therapy of the inherited retinal dystrophies *Curr Opin Genet Dev* **11**, 307–316.
- Bessant DA, Payne AM, Mitton KP, Wang QL, Swain PK, Plant C, ... Bhattacharya SS (1999) A mutation in NRL is associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa *Nat Genet* **21**, 355–356.
- Bhatia S, Goyal S, Singh IR, Singh D, and Vanita V (2018) A novel mutation in the PRPF31 in a North Indian adRP family with incomplete penetrance *Doc Ophthalmol* **137**, 103–119.
- Birch D, Locke K, Porco T, Klein M, Roorda A, Tao W, and Duncan J (2013) Long-term follow-up of patients with retinitis pigmentosa (RP) receiving sustained-release CNTF through intraocular encapsulated cell technology implants *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **54**, 640.
- Birch DG, Weleber RG, Duncan JL, Jaffe GJ, Tao W, and Ciliary Neurotrophic Factor Retinitis Pigmentosa Study Groups (2013) Randomized trial of ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for retinitis pigmentosa *Am J Ophthalmol* **156**, 283-292.e1.
- Boland MJ, Hazen JL, Nazor KL, Rodriguez AR, Gifford W, Martin G, ... Baldwin KK (2009) Adult mice generated from induced pluripotent stem cells *Nature* **461**, 91–94.
- Boulton M, and Dayhaw-Barker P (2001) The role of the retinal pigment epithelium : topographical variation and ageing changes *Eye (Lond)* **15**, 384–389.
- Bowmaker JK, and Dartnall HJ (1980) Visual pigments of rods and cones in a human retina *J Physiol* **298**, 501–511.
- Bryant L, Lozynska O, Marsh A, Papp TE, van Gorder L, Serrano LW, ... Bennett J (2019) Identification of a novel pathogenic missense mutation in PRPF31 using whole exome sequencing : a case report *Br J Ophthalmol* **103**, 761–767.
- Brzezinski JA, and Reh TA (2015) Photoreceptor cell fate specification in vertebrates *Development* **142**, 3263–3273.
- Buchholz DE, Hikita ST, Rowland TJ, Friedrich AM, Hinman CR, Johnson LV, and Clegg DO (2009) Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells *Stem Cells* **27**, 2427–2434.
- Buchholz DE, Pennington BO, Croze RH, Hinman CR, Coffey PJ, and Clegg DO (2013) Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium *Stem Cells Transl Med* **2**, 384–393.
- Bujakowska K, Maubaret C, Chakarova CF, Tanimoto N, Beck SC, Fahl E, ... Bhattacharya SS (2009) Study of gene-targeted mouse models of splicing factor gene Prpf31 implicated in human autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP) *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**, 5927–5933.
- Bunge S, Wedemann H, David D, Terwilliger DJ, van den Born LI, Aulehla-Scholz C, ... Schwinger E (1993) Molecular analysis and genetic mapping of the rhodopsin gene in families with autosomal dominant retinitis pigmentosa *Genomics* **17**, 230–233.
- Burcin MM, Schiedner G, Kochanek S, Tsai SY, and O'Malley BW (1999) Adenovirus-mediated regulable target gene expression in vivo *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 355–360.
- Burnight ER, Giacalone JC, Cooke JA, Thompson JR, Bohrer LR, Chirco KR, ... Tucker BA (2018) CRISPR-Cas9 genome engineering : Treating inherited retinal degeneration *Prog Retin Eye Res* **65**, 28–49.

Buskin A, Zhu L, Chichagova V, Basu B, Mozaffari-Jovin S, Dolan D, ... Lako M (2018) Disrupted alternative splicing for genes implicated in splicing and ciliogenesis causes PRPF31 retinitis pigmentosa *Nat Commun* **9**, 4234.

Byrne LC, Dalkara D, Luna G, Fisher SK, Clérin E, Sahel J-A, ... Flannery JG (2015) Viral-mediated RdCVF and RdCVFL expression protects cone and rod photoreceptors in retinal degeneration *J Clin Invest* **125**, 105–116.

## C

Campochiaro PA, and Mir TA (2018) The mechanism of cone cell death in Retinitis Pigmentosa *Prog Retin Eye Res* **62**, 24–37.

Cao H, Wu J, Lam S, Duan R, Newnham C, Molday RS, ... Hu J (2011) Temporal and tissue specific regulation of RP-associated splicing factor genes PRPF3, PRPF31 and PRPC8--implications in the pathogenesis of RP *PLoS One* **6**, e15860.

Cao L, Peng C, Yu J, Jiang W, and Yang J (2020) Identification of two novel PRPF31 mutations in Chinese families with non-syndromic autosomal dominant retinitis pigmentosa *Mol Genet Genomic Med* **8**, e1537.

Capowski EE, Samimi K, Mayerl SJ, Phillips MJ, Pinilla I, Howden SE, ... Gamm DM (2019) Reproducibility and staging of 3D human retinal organoids across multiple pluripotent stem cell lines *Development* **146**, dev171686.

Carr A-J, Vugler AA, Hikita ST, Lawrence JM, Gias C, Chen LL, ... Coffey PJ (2009) Protective effects of human iPS-derived retinal pigment epithelium cell transplantation in the retinal dystrophic rat *PLoS One* **4**, e8152.

Cepko C (2014) Intrinsically different retinal progenitor cells produce specific types of progeny *Nat Rev Neurosci* **15**, 615–627.

Chacon-Camacho OF, and Zenteno JC (2015) Review and update on the molecular basis of Leber congenital amaurosis *World J Clin Cases* **3**, 112–124.

Chan WM, Yeung KY, Pang CP, Baum L, Lau TC, Kwok AK, and Lam DS (2001) Rhodopsin mutations in Chinese patients with retinitis pigmentosa *Br J Ophthalmol* **85**, 1046–1048.

Chen FK, McLenachan S, Edel M, Da Cruz L, Coffey PJ, and Mackey DA (2014) iPS Cells for Modelling and Treatment of Retinal Diseases *J Clin Med* **3**, 1511–1541.

Chennen K, Scerbo MJ, Dollfus H, Poch O, and Marion V (2014) [Bardet-Biedl syndrome: cilia and obesity - from genes to integrative approaches] *Med Sci (Paris)* **30**, 1034–1039.

Clevers H, and Watt FM (2018) Defining Adult Stem Cells by Function, not by Phenotype *Annu Rev Biochem* **87**, 1015–1027.

Comitato A, Sanges D, Rossi A, Humphries MM, and Marigo V (2014) Activation of Bax in three models of retinitis pigmentosa *Invest Ophthalmol Vis Sci* **55**, 3555–3562.

Concepcion F, Mendez A, and Chen J (2002) The carboxyl-terminal domain is essential for rhodopsin transport in rod photoreceptors *Vision Res* **42**, 417–426.

Creel DJ (2019) Electroretinograms *Handb Clin Neurol* **160**, 481–493.

Cueva JG, Haverkamp S, Reimer RJ, Edwards R, Wässle H, and Brecha NC (2002) Vesicular gamma-aminobutyric acid transporter expression in amacrine and horizontal cells *J Comp Neurol* **445**, 227–237.

## D

- Da Silva S, and Cepko CL (2017) Fgf8 Expression and Degradation of Retinoic Acid Are Required for Patterning a High-Acuity Area in the Retina *Dev Cell* **42**, 68-81.e6.
- Daiger SP, Sullivan LS, and Bowne SJ (2013) Genes and mutations causing retinitis pigmentosa *Clin Genet* **84**, 132–141.
- Dalkara D, Byrne LC, Klimczak RR, Visel M, Yin L, Merigan WH, ... Schaffer DV (2013) In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous *Sci Transl Med* **5**, 189ra76.
- Dalkara D, Goureau O, Marazova K, and Sahel J-A (2016) Let There Be Light : Gene and Cell Therapy for Blindness *Hum Gene Ther* **27**, 134–147.
- Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, and Bouck NP (1999) Pigment epithelium-derived factor : a potent inhibitor of angiogenesis *Science* **285**, 245–248.
- Decembrini S, Hoehnel S, Brandenberg N, Arsenijevic Y, and Lutolf MP (2020) Hydrogel-based milliwell arrays for standardized and scalable retinal organoid cultures *Sci Rep* **10**, 10275.
- Deery EC, Vithana EN, Newbold RJ, Gallon VA, Bhattacharya SS, Warren MJ, ... Wilkie SE (2002) Disease mechanism for retinitis pigmentosa (RP11) caused by mutations in the splicing factor gene PRPF31 *Hum Mol Genet* **11**, 3209–3219.
- Deng W-L, Gao M-L, Lei X-L, Lv J-N, Zhao H, He K-W, ... Jin Z-B (2018) Gene Correction Reverses Ciliopathy and Photoreceptor Loss in iPSC-Derived Retinal Organoids from Retinitis Pigmentosa Patients *Stem Cell Reports* **10**, 1267–1281.
- Dias MF, Joo K, Kemp JA, Fialho SL, da Silva Cunha A, Woo SJ, and Kwon YJ (2018) Molecular genetics and emerging therapies for retinitis pigmentosa : Basic research and clinical perspectives *Prog Retin Eye Res* **63**, 107–131.
- Doudna JA, and Charpentier E (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 *Science* **346**, 1258096.
- Dryja TP, McGee TL, Hahn LB, Cowley GS, Olsson JE, Reichel E, ... Berson EL (1990) Mutations within the rhodopsin gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa *N Engl J Med* **323**, 1302–1307.
- Dryja TP, McGee TL, Reichel E, Hahn LB, Cowley GS, Yandell DW, ... Berson EL (1990) A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa *Nature* **343**, 364–366.
- Durand S, and Cimarelli A (2011) The inside out of lentiviral vectors *Viruses* **3**, 132–159.

## E

- Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, Kawada M, Sakakura E, Okuda S, ... Sasai Y (2011) Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture *Nature* **472**, 51–56.

- Elachouri G, Lee-Rivera I, Clérin E, Argentini M, Fridlich R, Blond F, ... Léveillard T (2015) Thioredoxin rod-derived cone viability factor protects against photooxidative retinal damage *Free Radic Biol Med* **81**, 22–29.
- Eldred KC, Hadyniak SE, Hussey KA, Brennerman B, Zhang P-W, Chamling X, ... Johnston RJ (2018) Thyroid hormone signaling specifies cone subtypes in human retinal organoids *Science* **362**, eaau6348.
- Essais cliniques sur Retinitis Pigmentosa : NT-501, Faux - Registre des essais cliniques - ICH GCP (n.d.). Retrieved September 15, 2021, from <https://ichgcp.net/fr/clinical-trials-registry/NCT01530659>
- Evans MJ, and Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos *Nature* **292**, 154–156.
- F**
- Famiglietti EV (1983) On and off pathways through amacrine cells in mammalian retina: the synaptic connections of “starburst” amacrine cells *Vision Res* **23**, 1265–1279.
- Farkas MH, Lew DS, Sousa ME, Bujakowska K, Chatagnon J, Bhattacharya SS, ... Nandrot EF (2014) Mutations in pre-mRNA processing factors 3, 8, and 31 cause dysfunction of the retinal pigment epithelium *Am J Pathol* **184**, 2641–2652.
- Farrar G. J., Kenna P, Redmond R, McWilliam P, Bradley DG, Humphries MM, ... Jay M (1990) Autosomal dominant retinitis pigmentosa : absence of the rhodopsin proline---histidine substitution (codon 23) in pedigrees from Europe *Am J Hum Genet* **47**, 941–945.
- Farrar G. Jane, Kenna PF, and Humphries P (2002) On the genetics of retinitis pigmentosa and on mutation-independent approaches to therapeutic intervention *EMBO J* **21**, 857–864.
- Flannery JG, Zolotukhin S, Vaquero MI, LaVail MM, Muzyczka N, and Hauswirth WW (1997) Efficient photoreceptor-targeted gene expression in vivo by recombinant adeno-associated virus *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6916–6921.
- Fliegeauf M, Horvath J, von Schnakenburg C, Olbrich H, Müller D, Thumfart J, ... Omran H (2006) Nephrocystin specifically localizes to the transition zone of renal and respiratory cilia and photoreceptor connecting cilia *J Am Soc Nephrol* **17**, 2424–2433.
- Fu Yanfang, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, and Sander JD (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells *Nat Biotechnol* **31**, 822–826.
- Fu Yanfang, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, and Joung JK (2014) Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs *Nat Biotechnol* **32**, 279–284.
- Fu Yingbin (1995) Phototransduction in Rods and Cones In H. Kolb, E. Fernandez, and R. Nelson (Eds.), *Webvision : The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center.
- Fuhrmann S (2010) Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle *Curr Top Dev Biol* **93**, 61–84.
- Fuhrmann S, Zou C, and Levine EM (2014) Retinal pigment epithelium development, plasticity, and tissue homeostasis *Exp Eye Res* **123**, 141–150.

## G

- Gandra M, Anandula V, Authiappan V, Sundaramurthy S, Raman R, Bhattacharya S, and Govindasamy K (2008) Retinitis pigmentosa : mutation analysis of RHO, PRPF31, RP1, and IMPDH1 genes in patients from India *Mol Vis* **14**, 1105–1113.
- Garafalo AV, Cideciyan AV, Héon E, Sheplock R, Pearson A, WeiYang Yu C, ... Jacobson SG (2020) Progress in treating inherited retinal diseases : Early subretinal gene therapy clinical trials and candidates for future initiatives *Prog Retin Eye Res* **77**, 100827.
- Georgiou M, Fujinami K, and Michaelides M (2021) Inherited retinal diseases : Therapeutics, clinical trials and end points-A review *Clin Exp Ophthalmol* **49**, 270–288.
- Goldberg AF, and Molday RS (1996) Defective subunit assembly underlies a digenic form of retinitis pigmentosa linked to mutations in peripherin/rds and rom-1 *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13726–13730.
- Gonzalez-Cordero A, Goh D, Kruczek K, Naeem A, Fernando M, Kleine Holthaus S-M, ... Ali RR (2018) Assessment of AAV Vector Tropisms for Mouse and Human Pluripotent Stem Cell-Derived RPE and Photoreceptor Cells *Hum Gene Ther* **29**, 1124–1139.
- Gonzalez-Cordero A, Kruczek K, Naeem A, Fernando M, Kloc M, Ribeiro J, ... Ali RR (2017) Recapitulation of Human Retinal Development from Human Pluripotent Stem Cells Generates Transplantable Populations of Cone Photoreceptors *Stem Cell Reports* **9**, 820–837.
- Graw J (2010) Eye development *Curr Top Dev Biol* **90**, 343–386.
- Graziotto JJ, Farkas MH, Bujakowska K, Deramautd BM, Zhang Q, Nandrot EF, ... Pierce EA (2011) Three gene-targeted mouse models of RNA splicing factor RP show late-onset RPE and retinal degeneration *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**, 190–198.
- Green ES, Menz MD, LaVail MM, and Flannery JG (2000) Characterization of rhodopsin mis-sorting and constitutive activation in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 1546–1553.
- Grøndahl J, Riise R, Heiberg A, Leren T, Christoffersen T, and Bragadottir R (2007) Autosomal dominant retinitis pigmentosa in Norway : a 20-year clinical follow-up study with molecular genetic analysis. Two novel rhodopsin mutations : 1003delG and I179F *Acta Ophthalmol Scand* **85**, 287–297.
- Guadagni V, Novelli E, Piano I, Gargini C, and Strettoi E (2015) Pharmacological approaches to retinitis pigmentosa : A laboratory perspective *Prog Retin Eye Res* **48**, 62–81.
- Guenther MG, Frampton GM, Soldner F, Hockemeyer D, Mitalipova M, Jaenisch R, and Young RA (2010) Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells *Cell Stem Cell* **7**, 249–257.
- Guillonneau X, Eandi CM, Paques M, Sahel J-A, Sapiha P, and Sennlaub F (2017) On phagocytes and macular degeneration *Prog Retin Eye Res* **61**, 98–128.
- Guitart JR, Johnson JL, and Chien WW (2016) Research Techniques Made Simple : The Application of CRISPR-Cas9 and Genome Editing in Investigative Dermatology *J Invest Dermatol* **136**, e87–e93.

## H

- Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, ... Fischer A (2003) A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency *N Engl J Med* **348**, 255–256.
- Hamann S, Zeuthen T, La Cour M, Nagelhus EA, Ottersen OP, Agre P, and Nielsen S (1998) Aquaporins in complex tissues : distribution of aquaporins 1-5 in human and rat eye *Am J Physiol* **274**, C1332-1345.
- Hamel C (2006) Retinitis pigmentosa *Orphanet J Rare Dis* **1**, 40.
- Hartong DT, Berson EL, and Dryja TP (2006) Retinitis pigmentosa *Lancet* **368**, 1795–1809.
- Hastings ML, and Krainer AR (2001) Pre-mRNA splicing in the new millennium *Curr Opin Cell Biol* **13**, 302–309.
- Hiler D, Chen X, Hazen J, Kupriyanov S, Carroll PA, Qu C, ... Dyer MA (2015) Quantification of Retinogenesis in 3D Cultures Reveals Epigenetic Memory and Higher Efficiency in iPSCs Derived from Rod Photoreceptors *Cell Stem Cell* **17**, 101–115.
- Hirami Y, Osakada F, Takahashi K, Okita K, Yamanaka S, Ikeda H, ... Takahashi M (2009) Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells *Neurosci Lett* **458**, 126–131.
- Hofer H, Carroll J, Neitz J, Neitz M, and Williams DR (2005) Organization of the human trichromatic cone mosaic *J Neurosci* **25**, 9669–9679.
- Hollyfield JG (1999) Hyaluronan and the functional organization of the interphotoreceptor matrix *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**, 2767–2769.
- Hyatt GA, Schmitt EA, Fadool JM, and Dowling JE (1996) Retinoic acid alters photoreceptor development in vivo *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13298–13303.

## I

- Icha J, Kunath C, Rocha-Martins M, and Norden C (2016) Independent modes of ganglion cell translocation ensure correct lamination of the zebrafish retina *J Cell Biol* **215**, 259–275.
- Illing ME, Rajan RS, Bence NF, and Kopito RR (2002) A rhodopsin mutant linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa is prone to aggregate and interacts with the ubiquitin proteasome system *J Biol Chem* **277**, 34150–34160.
- Ishikawa M, Sawada Y, and Yoshitomi T (2015) Structure and function of the interphotoreceptor matrix surrounding retinal photoreceptor cells *Exp Eye Res* **133**, 3–18.

## J

- Jacobson SG, Cideciyan AV, Roman AJ, Sumaroka A, Schwartz SB, Heon E, and Hauswirth WW (2015) Improvement and decline in vision with gene therapy in childhood blindness *N Engl J Med* **372**, 1920–1926.

- Jayakody SA, Gonzalez-Cordero A, Ali RR, and Pearson RA (2015) Cellular strategies for retinal repair by photoreceptor replacement *Prog Retin Eye Res* **46**, 31–66.
- Jellali A, Stussi-Garaud C, Gasnier B, Rendon A, Sahel J-A, Dreyfus H, and Picaud S (2002) Cellular localization of the vesicular inhibitory amino acid transporter in the mouse and human retina *J Comp Neurol* **449**, 76–87.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, and Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity *Science* **337**, 816–821.
- Jonas JB, Schmidt AM, Müller-Bergh JA, Schlötzer-Schrehardt UM, and Naumann GO (1992) Human optic nerve fiber count and optic disc size *Invest Ophthalmol Vis Sci* **33**, 2012–2018.
- Jones BW, and Marc RE (2005) Retinal remodeling during retinal degeneration *Exp Eye Res* **81**, 123–137.

## K

- Kajiwara K, Berson EL, and Dryja TP (1994) Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci *Science* **264**, 1604–1608.
- Kajiwara M, Aoi T, Okita K, Takahashi R, Inoue H, Takayama N, ... Yamanaka S (2012) Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 12538–12543.
- Kamao H, Mandai M, Okamoto S, Sakai N, Suga A, Sugita S, ... Takahashi M (2014) Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application *Stem Cell Reports* **2**, 205–218.
- Kaushal S, and Khorana HG (1994) Structure and function in rhodopsin. 7. Point mutations associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa *Biochemistry* **33**, 6121–6128.
- Kawamata S, Kanemura H, Sakai N, Takahashi M, and Go MJ (2015) Design of a Tumorigenicity Test for Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Cell Products *J Clin Med* **4**, 159–171.
- Khabou H, Garita-Hernandez M, Chaffiol A, Reichman S, Jaillard C, Brazhnikova E, ... Dalkara D (2018) Noninvasive gene delivery to foveal cones for vision restoration *JCI Insight* **3**, 96029.
- Kim K., Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, ... Daley GQ (2010) Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells *Nature* **467**, 285–290.
- Kim Kitai, Zhao R, Doi A, Ng K, Unternaehrer J, Cahan P, ... Daley GQ (2011) Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells *Nat Biotechnol* **29**, 1117–1119.
- Kingman S (2004) Glaucoma is second leading cause of blindness globally *Bull World Health Organ* **82**, 887–888.
- Klimanskaya I, Hipp J, Rezai KA, West M, Atala A, and Lanza R (2004) Derivation and comparative assessment of retinal pigment epithelium from human embryonic stem cells using transcriptomics *Cloning Stem Cells* **6**, 217–245.
- Kondo M, Sakai T, Komeima K, Kurimoto Y, Ueno S, Nishizawa Y, ... Terasaki H (2009) Generation of a transgenic rabbit model of retinal degeneration *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**, 1371–1377.

- Kraft TW, Allen D, Petters RM, Hao Y, Peng Y-W, and Wong F (2005) Altered light responses of single rod photoreceptors in transgenic pigs expressing P347L or P347S rhodopsin *Mol Vis* **11**, 1246–1256.
- Kreppel F, Luther TT, Semkova I, Schraermeyer U, and Kochanek S (2002) Long-term transgene expression in the RPE after gene transfer with a high-capacity adenoviral vector *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 1965–1970.
- Krol J, and Roska B (2015) Rods Feed Cones to Keep them Alive *Cell* **161**, 706–708.
- Kruczek K, Gonzalez-Cordero A, Goh D, Naeem A, Jonikas M, Blackford SJI, ... Ali RR (2017) Differentiation and Transplantation of Embryonic Stem Cell-Derived Cone Photoreceptors into a Mouse Model of End-Stage Retinal Degeneration *Stem Cell Reports* **8**, 1659–1674.
- Kyttälä A, Moraghebi R, Valensisi C, Kettunen J, Andrus C, Pasumarthy KK, ... Trokovic R (2016) Genetic Variability Overrides the Impact of Parental Cell Type and Determines iPSC Differentiation Potential *Stem Cell Reports* **6**, 200–212.

## L

- Lamba DA, Karl MO, Ware CB, and Reh TA (2006) Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12769–12774.
- Lamba DA, McUsic A, Hirata RK, Wang P-R, Russell D, and Reh TA (2010) Generation, purification and transplantation of photoreceptors derived from human induced pluripotent stem cells *PLoS One* **5**, e8763.
- Lane A, Philip LR, Ruban L, Fynes K, Smart M, Carr A, ... Coffey P (2014) Engineering efficient retinal pigment epithelium differentiation from human pluripotent stem cells *Stem Cells Transl Med* **3**, 1295–1304.
- Lannoy N, and Hermans C (2017) Thérapie génique en 2017 : état des lieux et perspectives 9.
- LaVail MM, Nishikawa S, Steinberg RH, Naash MI, Duncan JL, Trautmann N, ... Flannery JG (2018) Phenotypic characterization of P23H and S334ter rhodopsin transgenic rat models of inherited retinal degeneration *Exp Eye Res* **167**, 56–90.
- Le Meur G, Lebranchu P, Billaud F, Adjali O, Schmitt S, Bézieau S, ... Weber M (2018) Safety and Long-Term Efficacy of AAV4 Gene Therapy in Patients with RPE65 Leber Congenital Amaurosis *Mol Ther* **26**, 256–268.
- Leach LL, and Clegg DO (2015) Concise Review : Making Stem Cells Retinal: Methods for Deriving Retinal Pigment Epithelium and Implications for Patients With Ocular Disease *Stem Cells* **33**, 2363–2373.
- Léveillard 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.
- Li T, Snyder WK, Olsson JE, and Dryja TP (1996) Transgenic mice carrying the dominant rhodopsin mutation P347S: evidence for defective vectorial transport of rhodopsin to the outer segments *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14176–14181.
- Li X, Zhang L, Tang F, and Wei X (2021) Retinal Organoids : Cultivation, Differentiation, and Transplantation *Front Cell Neurosci* **15**, 638439.

- Li Y, Chan L, Nguyen HV, and Tsang SH (2016) Personalized Médecine : Cell and Gene Therapy Based on Patient-Specific iPSC-Derived Retinal Pigment Epithelium Cells *Adv Exp Med Biol* **854**, 549–555.
- Liao J-L, Yu J, Huang K, Hu J, Diemer T, Ma Z, ... Fan G (2010) Molecular signature of primary retinal pigment epithelium and stem-cell-derived RPE cells *Hum Mol Genet* **19**, 4229–4238.
- Liu G, Liu X, Li H, Du Q, and Wang F (2016) Optical Coherence Tomographic Analysis of Retina in Retinitis Pigmentosa Patients *Ophthalmic Res* **56**, 111–122.
- Liu JY, Dai X, Sheng J, Cui X, Wang X, Jiang X, ... Wang QK (2008) Identification and functional characterization of a novel splicing mutation in RP gene PRPF31 *Biochem Biophys Res Commun* **367**, 420–426.
- Liu S, Li P, Dybkov O, Nottrott S, Hartmuth K, Lührmann R, ... Wahl MC (2007) Binding of the human Prp31 Nop domain to a composite RNA-protein platform in U4 snRNP *Science* **316**, 115–120.
- Liu Z, Yu N, Holz FG, Yang F, and Stanzel BV (2014) Enhancement of retinal pigment epithelial culture characteristics and subretinal space tolerance of scaffolds with 200 nm fiber topography *Biomaterials* **35**, 2837–2850.
- Liu F, Huang L, Lei C, Sha G, Zheng H, Liu X, ... Yang Z (2013) A novel PRPF31 mutation in a large Chinese family with autosomal dominant retinitis pigmentosa and macular degeneration *PLoS One* **8**, e78274.
- Lund RJ, Närvä E, and Lahesmaa R (2012) Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells *Nat Rev Genet* **13**, 732–744.

## M

- Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Mingozzi F, Bennicelli J, ... Bennett J (2008) Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis *N Engl J Med* **358**, 2240–2248.
- Makarova OV, Makarov EM, Liu S, Vornlocher H-P, and Lührmann R (2002) Protein 61K, encoded by a gene (PRPF31) linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa, is required for U4/U6\*U5 tri-snRNP formation and pre-mRNA splicing *EMBO J* **21**, 1148–1157.
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, ... Church GM (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9 *Science* **339**, 823–826.
- Mandai M, Fujii M, Hashiguchi T, Sunagawa GA, Ito S, Sun J, ... Takahashi M (2017) iPSC-Derived Retina Transplants Improve Vision in rd1 End-Stage Retinal-Degeneration Mice *Stem Cell Reports* **8**, 69–83.
- Martínez-Morales JR, Rodrigo I, and Bovolenta P (2004) Eye development : a view from the retina pigmented epithelium *Bioessays* **26**, 766–777.
- Martins RAP, and Pearson RA (2008) Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina *Brain Res* **1192**, 37–60.
- Maruotti J, Wahlin K, Gorrell D, Bhutto I, Luttj G, and Zack DJ (2013) A simple and scalable process for the differentiation of retinal pigment epithelium from human pluripotent stem cells *Stem Cells Transl Med* **2**, 341–354.
- Masland RH (2012) The neuronal organization of the retina *Neuron* **76**, 266–280.

- Mata NL, Radu RA, Clemmons RC, and Travis GH (2002) Isomerization and oxidation of vitamin a in cone-dominant retinas : a novel pathway for visual-pigment regeneration in daylight *Neuron* **36**, 69–80.
- Matsuoka RL, Nguyen-Ba-Charvet KT, Parray A, Badea TC, Chédotal A, and Kolodkin AL (2011) Transmembrane semaphorin signalling controls laminar stratification in the mammalian retina *Nature* **470**, 259–263.
- McGee TL, Devoto M, Ott J, Berson EL, and Dryja TP (1997) Evidence that the penetrance of mutations at the RP11 locus causing dominant retinitis pigmentosa is influenced by a gene linked to the homologous RP11 allele *Am J Hum Genet* **61**, 1059–1066.
- Mendes HF, van der Spuy J, Chapple JP, and Cheetham ME (2005) Mechanisms of cell death in rhodopsin retinitis pigmentosa : implications for therapy *Trends Mol Med* **11**, 177–185.
- Meyer JS, Shearer RL, Capowski EE, Wright LS, Wallace KA, McMillan EL, ... Gamm DM (2009) Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 16698–16703.
- Milam AH, Li ZY, and Fariss RN (1998) Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa *Prog Retin Eye Res* **17**, 175–205.
- Mordes D, Yuan L, Xu L, Kawada M, Molday RS, and Wu JY (2007) Identification of photoreceptor genes affected by PRPF31 mutations associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa *Neurobiol Dis* **26**, 291–300.
- Moshiri A, Chen R, Kim S, Harris RA, Li Y, Raveendran M, ... Thomasy SM (2019) A nonhuman primate model of inherited retinal disease *J Clin Invest* **129**, 863–874.
- Mustafi D, Engel AH, and Palczewski K (2009) Structure of cone photoreceptors *Prog Retin Eye Res* **28**, 289–302.

## N

- Naash MI, Hollyfield JG, al-Ubaidi MR, and Baehr W (1993) Simulation of human autosomal dominant retinitis pigmentosa in transgenic mice expressing a mutated murine opsin gene *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5499–5503.
- Nakano T, Ando S, Takata N, Kawada M, Muguruma K, Sekiguchi K, ... Sasai Y (2012) Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs *Cell Stem Cell* **10**, 771–785.
- Napier ML, Durga D, Wolsley CJ, Chamney S, Alexander S, Brennan R, ... Willoughby CE (2015) Mutational Analysis of the Rhodopsin Gene in Sector Retinitis Pigmentosa *Ophthalmic Genet* **36**, 239–243.
- Natkunarajah M, Trittibach P, McIntosh J, Duran Y, Barker SE, Smith AJ, ... Ali RR (2008) Assessment of ocular transduction using single-stranded and self-complementary recombinant adeno-associated virus serotype 2/8 *Gene Ther* **15**, 463–467.
- Newman E, and Reichenbach A (1996) The Müller cell: a functional element of the retina *Trends Neurosci* **19**, 307–312.
- Nistor G, Seiler MJ, Yan F, Ferguson D, and Keirstead HS (2010) Three-dimensional early retinal progenitor 3D tissue constructs derived from human embryonic stem cells *J Neurosci Methods* **190**, 63–70.

## O

- Ohguro H (1997) High levels of rhodopsin phosphorylation in missense mutations of C-terminal region of rhodopsin *FEBS Lett* **413**, 433–435.
- Okita K, Ichisaka T, and Yamanaka S (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells *Nature* **448**, 313–317.
- Olsson JE, Gordon JW, Pawlyk BS, Roof D, Hayes A, Molday RS, ... Dryja TP (1992) Transgenic mice with a rhodopsin mutation (Pro23His): a mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa *Neuron* **9**, 815–830.
- Osakada F, Ikeda H, Mandai M, Wataya T, Watanabe K, Yoshimura N, ... Takahashi M (2008) Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells *Nat Biotechnol* **26**, 215–224.
- Osakada F, Jin Z-B, Hiram Y, Ikeda H, Danjyo T, Watanabe K, ... Takahashi M (2009) In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction *J Cell Sci* **122**, 3169–3179.

## P

- Pacione LR, Szego MJ, Ikeda S, Nishina PM, and McInnes RR (2003) Progress toward understanding the genetic and biochemical mechanisms of inherited photoreceptor degenerations *Annu Rev Neurosci* **26**, 657–700.
- Perron M, and Harris WA (2000) Determination of vertebrate retinal progenitor cell fate by the Notch pathway and basic helix-loop-helix transcription factors *Cell Mol Life Sci* **57**, 215–223.
- Petters RM, Alexander CA, Wells KD, Collins EB, Sommer JR, Blanton MR, ... Wong F (1997) Genetically engineered large animal model for studying cone photoreceptor survival and degeneration in retinitis pigmentosa *Nat Biotechnol* **15**, 965–970.
- Phillips MJ, Wallace KA, Dickerson SJ, Miller MJ, Verhoeven AD, Martin JM, ... Gamm DM (2012) Blood-derived human iPS cells generate optic vesicle-like structures with the capacity to form retinal laminae and develop synapses *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**, 2007–2019.
- Philp NJ, Wang D, Yoon H, and Hjelmeland LM (2003) Polarized expression of monocarboxylate transporters in human retinal pigment epithelium and ARPE-19 cells *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 1716–1721.
- Polo JM, Liu S, Figueroa ME, Kulal W, Eminli S, Tan KY, ... Hochedlinger K (2010) Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells *Nat Biotechnol* **28**, 848–855.

## R

- Rahl PB, Lin CY, Seila AC, Flynn RA, McCuine S, Burge CB, ... Young RA (2010) c-Myc regulates transcriptional pause release *Cell* **141**, 432–445.
- Ramachandran PS, Lee V, Wei Z, Song JY, Casal G, Cronin T, ... Bennett J (2017) Evaluation of Dose and Safety of AAV7m8 and AAV8BP2 in the Non-Human Primate Retina *Hum Gene Ther* **28**, 154–167.

- Ran FA, Hsu PD, Lin C-Y, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, ... Zhang F (2013) Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity *Cell* **154**, 1380–1389.
- Raymond SM, and Jackson IJ (1995) The retinal pigmented epithelium is required for development and maintenance of the mouse neural retina *Curr Biol* **5**, 1286–1295.
- Rees HA, and Liu DR (2018) Base editing : precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells *Nat Rev Genet* **19**, 770–788.
- Reichenbach A, and Bringmann A (2013) New functions of Müller cells *Glia* **61**, 651–678.
- Reichman S, Slembrouck A, Gagliardi G, Chaffiol A, Terray A, Nanteau C, ... Goureau O (2017) Generation of Storable Retinal Organoids and Retinal Pigmented Epithelium from Adherent Human iPS Cells in Xeno-Free and Feeder-Free Conditions *Stem Cells* **35**, 1176–1188.
- Reichman S, Terray A, Slembrouck A, Nanteau C, Orioux G, Habeler W, ... Goureau O (2014) From confluent human iPS cells to self-forming neural retina and retinal pigmented epithelium *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 8518–8523.
- Rio Frio T, Civic N, Ransijn A, Beckmann JS, and Rivolta C (2008) Two trans-acting eQTLs modulate the penetrance of PRPF31 mutations *Hum Mol Genet* **17**, 3154–3165.
- Riva A, and Hénaut A (2014, June 23) Cellules souches et médecine régénérative.
- Rivolta C, McGee TL, Rio Frio T, Jensen RV, Berson EL, and Dryja TP (2006) Variation in retinitis pigmentosa-11 (PRPF31 or RP11) gene expression between symptomatic and asymptomatic patients with dominant RP11 mutations *Hum Mutat* **27**, 644–653.
- Romani M, Micalizzi A, and Valente EM (2013) Joubert syndrome : congenital cerebellar ataxia with the molar tooth *Lancet Neurol* **12**, 894–905.
- Rose AM, Luo R, Radia UK, and Bhattacharya SS (2017) Gene of the month : PRPF31 *J Clin Pathol* **70**, 729–732.
- Rose AM, Shah AZ, Venturini G, Rivolta C, Rose GE, and Bhattacharya SS (2014) Dominant PRPF31 mutations are hypostatic to a recessive CNOT3 polymorphism in retinitis pigmentosa: a novel phenomenon of “linked trans-acting epistasis” *Ann Hum Genet* **78**, 62–71.
- S**
- Saari JC (2012) Vitamin A metabolism in rod and cone visual cycles *Annu Rev Nutr* **32**, 125–145.
- Sahel J-A, Boulanger-Scemama E, Pagot C, Arleo A, Galluppi F, Martel JN, ... Roska B (2021) Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy *Nat Med* **27**, 1223–1229.
- Saihan Z, Webster AR, Luxon L, and Bitner-Glindzicz M (2009) Update on Usher syndrome *Curr Opin Neurol* **22**, 19–27.
- Saini S, Robinson PN, Singh JR, and Vanita V (2012) A novel 7 bp deletion in PRPF31 associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa with incomplete penetrance in an Indian family *Exp Eye Res* **104**, 82–88.
- Sakami S, Maeda T, Bereta G, Okano K, Golczak M, Sumaroka A, ... Palczewski K (2011) Probing mechanisms of photoreceptor degeneration in a new mouse model of the common form of autosomal dominant retinitis

- pigmentosa due to P23H opsin mutations *J Biol Chem* **286**, 10551–10567.
- Salesse C (2017) [Physiology of the visual retinal signal : From phototransduction to the visual cycle] *J Fr Ophthalmol* **40**, 239–250.
- Saliba RS, Munro PMG, Luthert PJ, and Cheetham ME (2002) The cellular fate of mutant rhodopsin : quality control, degradation and aggresome formation *J Cell Sci* **115**, 2907–2918.
- Schiller PH (1990) The on and off channels of the visual system *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* **67**, 35–41.
- Schultz A, Nottrott S, Hartmuth K, and Lührmann R (2006) RNA structural requirements for the association of the spliceosomal hPrp31 protein with the U4 and U4atac small nuclear ribonucleoproteins *J Biol Chem* **281**, 28278–28286.
- Scott PA, de Castro JPF, DeMarco PJ, Ross JW, Njoka J, Walters E, ... Kaplan HJ (2017) Progression of Pro23His Retinopathy in a Miniature Swine Model of Retinitis Pigmentosa *Transl Vis Sci Technol* **6**, 4.
- Scott PA, Fernandez de Castro JP, Kaplan HJ, and McCall MA (2014) A Pro23His mutation alters prenatal rod photoreceptor morphology in a transgenic swine model of retinitis pigmentosa *Invest Ophthalmol Vis Sci* **55**, 2452–2459.
- Seiler MJ, and Aramant RB (2012) Cell replacement and visual restoration by retinal sheet transplants *Prog Retin Eye Res* **31**, 661–687.
- Sieving PA, Caruso RC, Tao W, Coleman HR, Thompson DJS, Fullmer KR, and Bush RA (2006) Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration : phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3896–3901.
- Singh R, Shen W, Kuai D, Martin JM, Guo X, Smith MA, ... Gamm DM (2013) iPS cell modeling of Best disease : insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration *Hum Mol Genet* **22**, 593–607.
- Slymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, and Zhang F (2016) Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity *Science* **351**, 84–88.
- Slijkerman RWN, Song F, Astuti GDN, Huynen MA, van Wijk E, Stieger K, and Collin RWJ (2015) The pros and cons of vertebrate animal models for functional and therapeutic research on inherited retinal dystrophies *Prog Retin Eye Res* **48**, 137–159.
- Steinmetz JD, Bourne RRA, Briant PS, Flaxman SR, Taylor HRB, Jonas JB, ... Vos T (2021) Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020 : the Right to Sight : an analysis for the Global Burden of Disease Study *The Lancet Global Health* **9**, e144–e160.
- Stem Cells : from Embryonic Origin to Induced Pluripotency – An Overview (n.d.). Retrieved August 12, 2021, from <https://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2019/august/stem-cells-from-embryonic-origin-to-induced-pluripotency-an-overview/>
- Stevens CB, Cameron DA, and Stenkamp DL (2011) Plasticity of photoreceptor-generating retinal progenitors revealed by prolonged retinoic acid exposure *BMC Dev Biol* **11**, 51.

- Steyer B, Cory E, and Saha K (2018) Developing precision medicine using scarless genome editing of human pluripotent stem cells *Drug Discov Today Technol* **28**, 3–12.
- Stieger K, Colle M-A, Dubreil L, Mendes-Madeira A, Weber M, Le Meur G, Rolling F (2008) Subretinal delivery of recombinant AAV serotype 8 vector in dogs results in gene transfer to neurons in the brain *Mol Ther* **16**, 916–923.
- Strauss O (2005) The retinal pigment epithelium in visual function *Physiol Rev* **85**, 845–881.
- Sugawara T, Nishino K, Umezawa A, and Akutsu H (2012) Investigating cellular identity and manipulating cell fate using induced pluripotent stem cells *Stem Cell Res Ther* **3**, 8.
- Sullivan LS, Bowne SJ, Birch DG, Hughbanks-Wheaton D, Heckenlively JR, Lewis RA, ... Daiger SP (2006) Prevalence of disease-causing mutations in families with autosomal dominant retinitis pigmentosa : a screen of known genes in 200 families *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 3052–3064.

## T

- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, and Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors *Cell* **131**, 861–872.
- Takahashi K, and Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors *Cell* **126**, 663–676.
- Tanackovic G, Ransijn A, Thibault P, Abou Elela S, Klinck R, Berson EL, ... Rivolta C (2011) PRPF mutations are associated with generalized defects in spliceosome formation and pre-mRNA splicing in patients with retinitis pigmentosa *Hum Mol Genet* **20**, 2116–2130.
- Tanackovic G, and Rivolta C (2009) PRPF31 alternative splicing and expression in human retina *Ophthalmic Genet* **30**, 76–83.
- Tao W, Wen R, Goddard MB, Sherman SD, O'Rourke PJ, Stabila PF, ... Aguirre GD (2002) Encapsulated cell-based delivery of CNTF reduces photoreceptor degeneration in animal models of retinitis pigmentosa *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 3292–3298.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, and Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts *Science* **282**, 1145–1147.
- Tseng Y-S, and Agbandje-McKenna M (2014) Mapping the AAV Capsid Host Antibody Response toward the Development of Second Generation Gene Delivery Vectors *Front Immunol* **5**, 9.
- Tucker BA, Park I-H, Qi SD, Klassen HJ, Jiang C, Yao J, ... Young MJ (2011) Transplantation of adult mouse iPS cell-derived photoreceptor precursors restores retinal structure and function in degenerative mice *PLoS One* **6**, e18992.
- Tufford AR, Onyak JR, Sondereker KB, Lucas JA, Earley AM, Mattar P, ... Cayouette M (2018) Melanopsin Retinal Ganglion Cells Regulate Cone Photoreceptor Lamination in the Mouse Retina *Cell Rep* **23**, 2416–2428.
- Turner DL, and Cepko CL (1987) A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development *Nature* **328**, 131–136.

## U

Utz VM, Beight CD, Marino MJ, Hagstrom SA, and Traboulsi EI (2013) Autosomal dominant retinitis pigmentosa secondary to pre-mRNA splicing-factor gene PRPF31 (RP11): review of disease mechanism and report of a family with a novel 3-base pair insertion *Ophthalmic Genet* **34**, 183–188.

## V

Valdés-Sánchez L, Calado SM, de la Cerda B, Aramburu A, García-Delgado AB, Massalini S, ... Díaz-Corrales FJ (2019) Retinal pigment epithelium degeneration caused by aggregation of PRPF31 and the role of HSP70 family of proteins *Mol Med* **26**, 1.

Vandenberghe LH, Bell P, Maguire AM, Cearley CN, Xiao R, Calcedo R, ... Bennett J (2011) Dosage thresholds for AAV2 and AAV8 photoreceptor gene therapy in monkey *Sci Transl Med* **3**, 88ra54.

Venturini G, Rose AM, Shah AZ, Bhattacharya SS, and Rivolta C (2012) CNOT3 is a modifier of PRPF31 mutations in retinitis pigmentosa with incomplete penetrance *PLoS Genet* **8**, e1003040.

Verbakel SK, van Huet RAC, Boon CJF, den Hollander AI, Collin RWJ, Klaver CCW, ... Klevering BJ (2018) Non-syndromic retinitis pigmentosa *Prog Retin Eye Res* **66**, 157–186.

Viringipurampeer IA, Gregory-Evans CY, Metcalfe AL, Bashar E, Moritz OL, and Gregory-Evans K (2019) Cell Death Pathways in Mutant Rhodopsin Rat Models Identifies Genotype-Specific Targets Controlling Retinal Degeneration *Mol Neurobiol* **56**, 1637–1652.

Vithana E, Al-Magthteh M, Bhattacharya SS, and Inglehearn CF (1998) RP11 is the second most common locus for dominant retinitis pigmentosa *J Med Genet* **35**, 174–175.

Vithana E. N., Abu-Safieh L, Allen MJ, Carey A, Papaioannou M, Chakarova C, ... Bhattacharya SS (2001) A human homolog of yeast pre-mRNA splicing gene, PRP31, underlies autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19q13.4 (RP11) *Mol Cell* **8**, 375–381.

Vithana Eranga N., Abu-Safieh L, Pelosini L, Winchester E, Hornan D, Bird AC, ... Bhattacharya SS (2003) Expression of PRPF31 mRNA in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa : a molecular clue for incomplete penetrance ? *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 4204–4209.

Vugler A, Carr A-J, Lawrence J, Chen LL, Burrell K, Wright A, ... Coffey P (2008) Elucidating the phenomenon of HESC-derived RPE : anatomy of cell genesis, expansion and retinal transplantation *Exp Neurol* **214**, 347–361.

## W

Wahlin KJ, Maruotti JA, Sripathi SR, Ball J, Angueyra JM, Kim C, ... Zack DJ (2017) Photoreceptor Outer Segment-like Structures in Long-Term 3D Retinas from Human Pluripotent Stem Cells *Sci Rep* **7**, 766.

Wanders RJ, Waterham HR, and Leroy BP (1993) Refsum Disease In M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, G. Mirzaa, and A. Amemiya (Eds.), *GeneReviews*®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle.

- Wang S, and Cepko CL (2016) Photoreceptor Fate Determination in the Vertebrate Retina *Invest Ophthalmol Vis Sci* **57**, ORSFe1–ORSFe6.
- Warrington KH, and Herzog RW (2006) Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer *Hum Genet* **119**, 571–603.
- Waseem NH, Vaclavik V, Webster A, Jenkins SA, Bird AC, and Bhattacharya SS (2007) Mutations in the gene coding for the pre-mRNA splicing factor, PRPF31, in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**, 1330–1334.
- Wässle H (2004) Parallel processing in the mammalian retina *Nat Rev Neurosci* **5**, 747–757.
- Weidenhammer EM, Ruiz-Noriega M, and Woolford JL (1997) Prp31p promotes the association of the U4/U6 x U5 tri-snRNP with prespliceosomes to form spliceosomes in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Cell Biol* **17**, 3580–3588.
- Wheway G, Douglas A, Baralle D, and Guillot E (2020) Mutation spectrum of PRPF31, genotype-phenotype correlation in retinitis pigmentosa, and opportunities for therapy *Exp Eye Res* **192**, 107950.
- Wikler KC, and Rakic P (1990) Distribution of photoreceptor subtypes in the retina of diurnal and nocturnal primates *J Neurosci* **10**, 3390–3401.
- Will CL, and Lührmann R (1997) Protein functions in pre-mRNA splicing *Curr Opin Cell Biol* **9**, 320–328.
- Witmer AN, Vrensen GFJM, Van Noorden CJF, and Schlingemann RO (2003) Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease *Prog Retin Eye Res* **22**, 1–29.
- Wright AF, Chakarova CF, Abd El-Aziz MM, and Bhattacharya SS (2010) Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait *Nat Rev Genet* **11**, 273–284.
- Wu L, Lam S, Cao H, Guan R, Duan R, van der Kooy D, ... Hu J (2011) Subretinal gene delivery using helper-dependent adenoviral vectors *Cell Biosci* **1**, 15.

## X

- Xia K, Zheng D, Pan Q, Liu Z, Xi X, Hu Z, ... Xia J (2004) A novel PRPF31 splice-site mutation in a Chinese family with autosomal dominant retinitis pigmentosa *Mol Vis* **10**, 361–365.
- Xiao X, Cao Y, Zhang Z, Xu Y, Zheng Y, Chen LJ, ... Chen H (2017) Novel Mutations in PRPF31 Causing Retinitis Pigmentosa Identified Using Whole-Exome Sequencing *Invest Ophthalmol Vis Sci* **58**, 6342–6350.
- Xu F, Sui R, Liang X, Li H, Jiang R, and Dong F (2012) Novel PRPF31 mutations associated with Chinese autosomal dominant retinitis pigmentosa patients *Mol Vis* **18**, 3021–xxx.

## Y

- Yáñez-Muñoz RJ, Balagán KS, MacNeil A, Howe SJ, Schmidt M, Smith AJ, ... Thrasher AJ (2006) Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors *Nat Med* **12**, 348–353.
- Yang C, Georgiou M, Atkinson R, Collin J, Al-Aama J, Nagaraja-Grellscheid S, ... Lako M (2021) Pre-mRNA Processing Factors and Retinitis Pigmentosa : RNA Splicing and Beyond *Front Cell Dev Biol* **9**, 700276.

- Yin J, Brocher J, Fischer U, and Winkler C (2011) Mutant Prpf31 causes pre-mRNA splicing defects and rod photoreceptor cell degeneration in a zebrafish model for Retinitis pigmentosa *Mol Neurodegener* **6**, 56.
- Yoshida T, Ozawa Y, Suzuki K, Yuki K, Ohyama M, Akamatsu W, ... Okano H (2014) The use of induced pluripotent stem cells to reveal pathogenic gene mutations and explore treatments for retinitis pigmentosa *Mol Brain* **7**, 45.
- Young RW (1976) Visual cells and the concept of renewal *Invest Ophthalmol Vis Sci* **15**, 700–725.
- Young RW (1978) The daily rhythm of shedding and degradation of rod and cone outer segment membranes in the chick retina *Invest Ophthalmol Vis Sci* **17**, 105–116.
- Young RW (1985) Cell differentiation in the retina of the mouse *Anat Rec* **212**, 199–205.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, ... Thomson JA (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells *Science* **318**, 1917–1920.
- Yuan L, Kawada M, Havlioglu N, Tang H, and Wu JY (2005) Mutations in PRPF31 inhibit pre-mRNA splicing of rhodopsin gene and cause apoptosis of retinal cells *J Neurosci* **25**, 748–757.
- Yuodelis C, and Hendrickson A (1986) A qualitative and quantitative analysis of the human fovea during development *Vision Res* **26**, 847–855.

## Z

- Zahabi A, Shahbazi E, Ahmadi H, Hassani S-N, Totonchi M, Taei A, ... Baharvand H (2012) A new efficient protocol for directed differentiation of retinal pigmented epithelial cells from normal and retinal disease induced pluripotent stem cells *Stem Cells Dev* **21**, 2262–2272.
- Zarbin MA (2003) Analysis of retinal pigment epithelium integrin expression and adhesion to aged submacular human Bruch's membrane *Trans Am Ophthalmol Soc* **101**, 499–520.
- Zhao X, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, ... Zhou Q (2009) iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation *Nature* **461**, 86–90.
- Zhong X, Gutierrez C, Xue T, Hampton C, Vergara MN, Cao L-H, ... Canto-Soler MV (2014) Generation of three dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs *Nat Commun* **5**, 4047.
- Ziviello C, Simonelli F, Testa F, Anastasi M, Marzoli SB, Falsini B, ... Banfi S (2005) Molecular genetics of autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP): a comprehensive study of 43 Italian families *J Med Genet* **42**, e47.
- Zuber ME (2010) Eye field specification in *Xenopus laevis* *Curr Top Dev Biol* **93**, 29–60.



## **Modélisation d'une forme de rétinite pigmentaire et validation d'une approche de thérapie génique, à l'aide de cellules rétinienne dérivées de cellules iPS humaines**

Les pathologies rétinienne cécitantes d'origine génétique, telles que les rétinite pigmentaire (RP), concernent environ 1 sur 3000 personnes à travers le monde et sont généralement associées à une perte des neurones photosensibles, les photorécepteurs. De nombreux modèles animaux ont été développés afin d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent ces pathologies, mais ne suffisent pas toujours à récapituler la pathologie humaine. Une approche alternative très prometteuse, consiste à reprogrammer des cellules somatiques humaines de patients souffrant de RP, en cellules souches pluripotentes (cellules iPS). La génération de cellules rétinienne à partir de cellules iPS offre l'opportunité d'étudier les effets directs d'une déficience génique à l'origine d'une pathologie dans un système humain *in vitro*. Ces modèles peuvent également participer au développement de stratégies optimales pour leur traitement qui n'existent pas actuellement.

Au cours de ce projet, nous avons optimisé le protocole de différenciation des organoïdes rétiniens afin d'aboutir à une organisation structurellement plus proche de la rétine *in vivo*, permettant une maturation avancée des photorécepteurs. L'utilisation de cet outil, nous a permis de récapituler pleinement la dégénérescence des bâtonnets et des cônes, observée chez les patients porteurs d'une mutation dans le gène *RHODOPSINE*, codant pour un pigment visuel. Nous avons ainsi validé l'utilisation des organoïdes rétiniens pseudo-laminés comme outil d'intérêt majeur pour la modélisation des RP. La suite de notre étude réalisée à partir de deux mutations dans le gène *PRPF31*, codant pour un facteur d'épissage, a permis de mieux comprendre l'étiologie à l'origine de la RP. Les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) affectées par une mutation de *PRPF31* ont présenté une désorganisation importante marquée notamment par une altération de leurs propriétés cohésives, un défaut de polarité apico-basale et une activité de phagocytose perturbée. Les organoïdes rétiniens ont permis de mimer la dégénérescence des bâtonnets matures et la perte secondaire des cônes, observés chez les patients. L'analyse transcriptomique des cellules rétinienne affectées par la mutation *PRPF31* a permis d'identifier des gènes différentiellement exprimés ou épissés en lien avec le phénotype observé et le processus d'épissage. L'ensemble de ce phénotype de dégénérescence rétinienne a pu être corrélé à un plus faible niveau d'expression de la protéine PRPF31, liant les mutations causales à un mécanisme d'haploinsuffisance. Fondé sur nos résultats de modélisation, nous avons développé une stratégie d'augmentation génique, permettant d'apporter une copie sauvage supplémentaire du gène *PRPF31* par CRISPR/Cas9 ou via un vecteur AAV. Ces approches de supplémentation ont permis *in vitro* de réverser le phénotype de dégénérescence des cellules rétinienne, et ouvrent la voie pour le développement de thérapies géniques innovantes.

Mots clés : Rétinite pigmentaire, cellules iPS, organoïdes rétiniens, modélisation pathologique, thérapie génique.

### **Modelisation and rescue by gene therapy of a form of retinitis pigmentosa using human iPSC-derived retinal cells**

Inherited retinal diseases, such as Retinitis Pigmentosa (RP), affect about 1 in 3000 people worldwide and are generally associated with loss of photosensitive cells, photoreceptors. Many animal models have been developed to study the cellular and molecular mechanisms underlying these pathologies, but are not always sufficient to recapitulate the human disease. A very promising alternative approach consists in reprogramming somatic cells from RP patients into pluripotent stem cells (iPS cells). Generation of retinal cells from human iPS cells offers the opportunity to study the direct effects of a specific disease-causing mutation in an *in vitro* human system. These models can also contribute to the development of optimal treatment strategies that do not exist currently.

During this project, we optimized the retinal organoid differentiation protocol to obtain an organization structurally closer to the retina *in vivo*, allowing advanced photoreceptor maturation. Using this tool we were able to fully recapitulate the degeneration of rods and cones, observed in patients with mutation in *RHODOPSINE* gene, coding for the visual pigment. Then, we validated the use of pseudo-laminated retinal organoids as a tool of major interest for RP modeling. The rest of our study based on mutations in *PRPF31* gene, coding for a splicing factor, led to a better understanding of these RP etiology. *PRPF31*-mutated retinal pigmented epithelium (RPE) cells exhibited significant disorganization, including altered cohesive properties, a defect in apico-basal polarity, and disturbed phagocytosis activity. Retinal organoids summarized the degeneration of mature rods and secondary loss of cones, observed in patients. This whole retinal degeneration phenotype have been correlated with a lower level expression of *PRPF31* protein, linking causal mutations to an haploinsuffisance mechanism. Based on our modelling results, we have developed a gene augmentation strategy, bringing an additional wild type copy of *PRPF31* through CRISPR/Cas9 or an AAV vector. These supplementation approaches allowed the rescue of retinal cells degeneration *in vitro*, and pave the way for the development of further innovative gene therapy.

Keywords : Retinitis pigmentosa, iPS cells, retinal organoids, disease modeling, gene therapy