



HAL
open science

Génération de progéniteurs rétiniens à partir de cellules iPS humaines pour la compréhension et le traitement des dystrophies rétiniennes

Sandy Gozlan

► **To cite this version:**

Sandy Gozlan. Génération de progéniteurs rétiniens à partir de cellules iPS humaines pour la compréhension et le traitement des dystrophies rétiniennes. Organes des sens. Sorbonne Université, 2022. Français. ⟨NNT : 2022SORUS533⟩. ⟨tel-04317030⟩

HAL Id: tel-04317030

<https://theses.hal.science/tel-04317030v1>

Submitted on 1 Dec 2023

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.



HAL Authorization

Sorbonne Université

Ecole doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique (ED394)

Institut de la Vision

Génération de progéniteurs rétiens à partir de cellules iPS humaines pour la compréhension et le traitement des dystrophies rétiennes

Par **Sandy Gozlan**

Thèse de doctorat de Biologie

Dirigée par Olivier Goureau / Co-encadrée par Sacha Reichman

Présentée et soutenue publiquement le 30 Novembre 2022

Devant un jury composé de :

Pr. Onnik AGBULUT, Président du jury

Dr. Yvan Arsenijevic, Rapporteur

Dr. Muriel PERRON, Rapporteur

Pr. Christelle MONVILLE, Examineur

Dr. Olivier GOUREAU, Directeur de thèse

Dr. Sacha REICHMAN, Co-encadrant de thèse

A mon père,

Ton absence est d'autant plus pesante dans ces moments de vie.

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci au Dr *Yvan Arsenijevic* d'avoir accepté de découvrir mon projet et au Dr *Muriel Perron* de m'avoir suivie et conseillée au cours cette thèse, ainsi que pour le temps consacré à la lecture et à la correction de mon manuscrit. Je remercie le Pr *Christelle Monville* d'avoir accepté de participer à l'expertise de mon travail en tant qu'examineur. Je remercie également le Pr *Onnik Agbulut* d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je tiens aussi à remercier la *Fondation de France* pour avoir cru en mon projet et avoir accepté de financer l'intégralité de ces travaux pendant trois ans.

Je remercie très sincèrement mon encadrant de thèse *Sacha Reichman*. Un merci tout particulièrement pour la confiance que tu m'as accordée tous les jours et ce, depuis le début. Merci de m'avoir permis d'entrer dans cette folle aventure de doctorat. Tu m'as dit en début de thèse qu'avant tout, la thèse était une expérience humaine. Tu visais juste. Je te souhaite la réussite dans tous les projets que tu entreprendras. Je remercie également sincèrement mon directeur de thèse *Olivier Goureau* de m'avoir accueillie dans son équipe et de s'être montré toujours disponible, réactif et de bon conseil particulièrement en cette fin de thèse.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe S2, pour ces moments partagés. Merci à *Gaël Orieux*, pour avoir su m'écouter et pour avoir été d'une aide plus importante que tu ne pourrais le penser ! Garde toujours ta vision de la Science et ton sens de la répartie aussi. Merci à *Amélie Slembrouck-Brec*, pour ton aide mais surtout pour tous ces moments passés au L2 ! Merci à *Marilou*, qui m'a rejointe dernièrement sur ces fameuses RPCs ! Je t'envoie plein de courage et te souhaite une belle réussite dans la suite de ce projet. Et enfin, un grand et immense merci tout particulier à *Céline Nanteau*. Tu as été un repère depuis mon M2, merci pour ton soutien infaillible, nos petits Starbucks et ta réelle bienveillance que je n'oublierai jamais. Je souhaite aussi épanouissement et réussite à la vague rafraichissante de jeunesse qui a déferlé sur l'équipe : *Jérémy, Clarisse, Gaëlle* et particulièrement *Lisa* à qui je souhaite de vivre une belle thèse (you got it girl !).

De collègues à amis, il n'y a qu'un pas. Merci à toutes ces personnes qui me donnent l'impression de ne pas être au travail mais dans une grande colonie de vacances et particulièrement au bureau de la joie. Merci à toi *Johann* pour un nombre incalculable de choses en réalité. Merci pour avoir été là dans les moments de joie, rire, (débilité ?) autant que pour tous ces moments plus compliqués où ta présence et nos longues conversations suffisaient à calmer les situations. Tu as un cœur énorme, et rien que pour ça tu mérites le meilleur tout simplement. Merci à ma petite *Sarah aka Mamie Baudette* aux mots croisés. Je suis tellement heureuse d'avoir pu te découvrir en arrivant dans ce bureau. Sarah, merci pour tous ces

fourires, merci pour ton amitié, merci pour ta bienveillance sans égard et à toute épreuve. On a pu vivre cette fin de thèse et ses rebondissements ensemble et j'en suis si reconnaissante. J'évite de te sortir une spéciale citation pour ces remerciements même si tu peux imaginer que l'envie est plus que présente. Merci à *Virginie*, pour toutes ces discussions, ces rires et ces petits cours de zumba (à quand le twerk ?). J'ai pu voir toute ton évolution au cours de cette thèse et tu peux être très fière de toi. Et enfin, merci à Amélie *Rodrigues*, mon binôme qui m'a tellement manqué cette année ! Tu as fait de ma thèse une véritable aventure, comme on ne pourrait oser l'imaginer.

Merci beaucoup aux plateformes de l'Institut de la Vision. Merci à la plateforme Imagerie avec *Stéphane Fouquet*, à la plateforme Biochimie avec *Yvrick Zagar* et à la plateforme HTS avec *Anaïs Potey* pour les quantifications à l'Arrayscan.

Merci à mes amies qui ont su être d'un soutien infaillible, surtout dans les périodes difficiles. Merci à toi ma *Sal*, tu me pousses toujours à aller plus loin, et ce depuis longtemps. Merci à ma *Sarah*, pour être tant une source de motivation. Merci à ma *Sharon*, pour ta joie de vivre et pour toutes ces belles années d'amitié. Merci à ma *Jess*, mon binôme de tous les combats. Merci à ma *Nono d'amour*, pour toute ta sagesse, ton écoute et pour tout ce que tu es. La force de ton soutien durant ces dernières années est indécidable. Enfin un merci particulier à ma *Shona*. Ces dernières années, pleines de rebondissements, de travail, de voyages, de craquages, de remise en question, de rires, on les a vécues ensemble. Merci d'avoir été là tout simplement.

Merci à mon malojap *Ben*. Merci d'avoir été cette année mon partenaire d'escapades à travers le monde. Tu as été véritablement ma source d'oxygène, particulièrement dans les moments où j'étais à court de souffle. Love you.

Je ne peux finir ces remerciements, sans remercier les personnes les plus chères à mes yeux, que j'aime si fort. Merci à ma famille. Merci à **mon père** qui a été un modèle incroyable toute ma vie. J'aurais tant aimé que tu sois là pour me voir finir cette thèse. Cette fois-ci, je ne suis plus mamacienne mais mamacienne +. Tu me manques tous les jours. Merci à **ma mère**, qui m'a toujours soutenue dans tout ce que j'ai voulu entreprendre. Je te promets Mommy que ça y est les études c'est fini (enfin normalement)! Merci à **ma Zanzouna** à qui je souhaite tout le bonheur du monde dans ta nouvelle vie. Merci à **mon bébé Raphi**, que j'aime par-dessus tout. Tu restes l'amour de ma vie et j'espère que tu sais que je serai toujours là pour toi. Go reprendre le relai des études Raphiiii. Et enfin, un tout particulier merci à **mon mochi Kei**. Tu es n'es pas seulement ma sœur, tu es ma meilleure amie. Tu te transformes en une magnifique femme, et je te souhaite que de la joie et de la réussite. A toi de rédiger une thèse now, promis je te donnerai des conseils (payants of course (câlins acceptés)).

Avant-propos

Au cours de cette folle aventure qu'est la thèse, on m'a souvent dit: «Tu fais une thèse ! Trop cool, mais ça parle de quoi?». J'ai toujours été prise au dépourvu par cette question, et j'y répondais à chaque fois : «Euh c'est compliqué ...». A toutes ces personnes à qui j'ai pu dire cela, j'aimerais me rattraper et leur expliquer avec des mots simples de quoi parle ma thèse.

La vue est un de nos sens qui, une fois perdu, rend la vie très compliquée. Voir à ce moment même les mots que j'ai écrits ou la couleur du texte est possible notamment grâce à des cellules appelées photorécepteurs. Ces derniers captent les rayons lumineux et les transforment en signaux électriques que votre cerveau va pouvoir par la suite analyser et interpréter. Chez un grand nombre de personnes ayant perdu la vue, ces cellules meurent, et contrairement à certains animaux, l'homme à l'âge adulte est incapable de faire renaître ces cellules.

Depuis un grand nombre d'années, beaucoup de chercheurs à travers le monde se sont posés la question de comment pouvoir rendre la vue aux personnes qui ne l'ont plus ? Un élément de réponse parmi tant d'autres a été d'essayer de recréer dans leur laboratoire ces cellules si précieuses que sont les photorécepteurs. Pour cela, ils ont utilisé des cellules souches. Mais qu'est-ce qu'une cellule souche exactement ? Et comment pourraient-elles être utilisées pour redonner ces photorécepteurs ?

Votre corps est composé d'un grand nombre de cellules différentes, certaines servent à vous faire respirer, vous faire digérer ou encore même vous faire rire. Ce sont des **cellules spécialisées**, responsables d'un rôle précis et elles ne peuvent ni se multiplier, ni se changer en une autre cellule. Mais toutes ces cellules si différentes sont issues d'une même cellule, celle créée lorsque les fameuses graines de votre père et de votre mère se sont rencontrées. Lorsque des cellules sont capables de se multiplier elles-mêmes et de se changer en pleins de cellules différentes, elles sont appelées **cellules souches**.

Incroyable mais vrai, il y a plus d'une dizaine d'années, une équipe japonaise a réussi l'exploit de transformer une cellule spécialisée de la peau d'un Homme en cellules souches dans leur laboratoire lui donnant alors à cette cellule de la peau la possibilité de se multiplier et de se changer en d'autres cellules. On les appelle **cellules souches induites à la pluripotence**. Mais plus extraordinaire encore, à l'aide de ces cellules souches, il a été possible de recréer des mini-organes dont celui qui possède nos fameuses cellules photoréceptrices: ce sont des **organoïdes rétiniens**. Ces organoïdes rétiniens, au début de leur création sont composés de cellules que l'on nomme **progéniteurs**. Ces progéniteurs sont eux-mêmes des cellules souches qui peuvent à la fois se reproduire et qui vont pouvoir donner naissance à toutes les cellules qui composent votre œil et vous permettre de voir.

Si l'on veut maintenant remplacer les photorécepteurs chez toutes les personnes aveugles, vous pouvez vous imaginer que l'on a besoin de beaucoup (beaucoup) de photorécepteurs. Seulement voilà, même si on peut trouver des photorécepteurs dans les organoïdes rétiens, ils sont présents en petite quantité. De surplus, les photorécepteurs, étant des cellules spécialisées, n'ont pas le pouvoir de se multiplier et ne peuvent donc pas donner à partir d'eux-mêmes de grandes quantités de photorécepteurs. C'est pourquoi des chercheurs ont essayé d'utiliser les progéniteurs pour créer de grandes quantités de photorécepteurs mais à chaque fois ces cellules, mêmes si elles arrivent encore à se multiplier, n'arrivent plus à se changer en la cellule de son choix dont la cellule photoréceptrice.

Au cours de ma thèse, j'ai produit des organoïdes rétiens, isolé les progéniteurs qui les composent et mis au point un protocole permettant à ces progéniteurs de se multiplier tout en leur permettant de continuer à se transformer en n'importe quelle cellule de la rétine. J'ai pu également donner une carte de conduite à ces progéniteurs pour les pousser à devenir des photorécepteurs.

J'aimerais finir par une phrase de David Gamm, un chercheur qui essaie lui aussi de redonner la vue qui est:

“Stem cells have unique but variable properties that, if thoughtfully tested and applied, may be of considerable help to some patients in the foreseeable future. We're optimistic about this future...and you should be, too.”

Bonne lecture !

Sommaire

Introduction	15
Partie I: Organisation, fonctionnement et développement la rétine	17
1. L'oeil : anatomie d'une sphère complexe.....	17
2. La rétine.....	19
A. L'épithélium pigmentaire rétinien	20
a. Structure de l'épithélium pigmentaire	20
b. Les différentes fonctions de l'épithélium pigmentaire	22
B. La rétine neurale	23
a. La couche nucléaire externe	25
b. La couche plexiforme externe	29
c. La couche nucléaire interne.....	29
d. La couche des cellules ganglionnaires.....	29
3. Le développement de l'oeil : des tissus embryonnaires à la rétinogénèse	31
B. Spécification du champ oculaire	33
C. Division du champ oculaire.....	35
D. Mise en place des vésicules optiques : régionalisation et spécification	35
Partie II : Les cellules progénitrices rétiniennes.....	39
1. Les progéniteurs rétiniens : acteurs clés de la rétinogénèse	39
A. La rétinogénèse.....	39
B. Multipotence et modèles de compétence.....	41
a. Multipotence des RPCs	41
b. Facteurs extrinsèques impliqués dans la rétinogénèse.....	42
c. Modèle de compétence et facteurs intrinsèques	48
d. Stochasticité.....	55
2. Sources , utilisations et enjeux actuels des progéniteurs rétiniens pour des applications thérapeutiques.....	57
A. Sources actuelles	57
a. Sources non humaines	59
b. Sources humaines	59
B. Applications cliniques des progéniteurs rétiniens humains.....	61
Partie III : Les dystrophies rétiniennes et les approches thérapeutiques actuelles	63
1. Les dystrophies rétiniennes héréditaires.....	63
A. Dystrophies bâtonnets-cônes	66

B. Dystrophies cônes-bâtonnets	69
C. Dystrophies généralisées	69
2. Les approches thérapeutiques	70
A. Les thérapies par neuroprotection.....	71
B. Les thérapies innovantes.....	72
Partie IV : Les cellules souches pluripotentes humaines : applications en ophtalmologie.....	79
1. Les cellules souches pluripotentes humaines	79
A. Généralités sur les cellules souches.....	79
B. Les cellules souches pluripotentes humaines : des cellules souches embryonnaires ou cellules souches induites à la pluripotence	82
a. Les cellules souches embryonnaires.....	82
b. Les cellules souches induites à la pluripotence	84
2. De la cellule souche pluripotente humaine à la cellule rétinienne : les protocoles de différenciation	94
3. Applications des CSPh en ophtalmologie	109
a. La médecine régénérative.....	110
b. La modélisation des pathologies	115
c. La découverte de nouvelles molécules actives	123
Résultats	129
Génération, amplification et cryopréservation de cellules progénitrices rétiniennes à partir de cellules iPS humaines.....	131
Résultats supplémentaires	171
1. Différenciation de cellules progénitrices rétiniennes en photorécepteurs à bâtonnets	171
2. Cryopréservation de précurseurs de photorécepteurs	180
Discussion	186
Génération, amplification et cryopréservation de progéniteurs rétiniens à partir de cellules iPS humaines.....	187
Différenciation des cellules progénitrices rétiniennes en photorécepteurs à bâtonnets.....	196
Cryopréservation de précurseurs de photorécepteurs	200
Bibliographie	199

Liste des figures

- **Figure 1:** Anatomie générale de l'œil.
- **Figure 2:** Coupe de la rétine.
- **Figure 3:** Structure de l'épithélium pigmentaire rétinien
- **Figure 4:** Structure et histologie de la rétine
- **Figure 5:** Les différents types de photorécepteurs : photorécepteurs à cônes et à bâtonnets.
- **Figure 6:** Distribution des photorécepteurs à bâtonnets et à cônes dans la rétine humaine.
- **Figure 7:** Développement embryologique de l'œil chez les vertébrés.
- **Figure 8:** Réseau de facteurs de transcription dans l'établissement du champ oculaire.
- **Figure 9:** Les réseaux de signalisation établissant la vésicule optique.
- **Figure 10:** Ordre de naissance des différents types cellulaires rétiniens au cours de l'évolution chez divers modèles.
- **Figure 11:** Le modèle de compétence.
- **Figure 12:** Facteurs d'identité temporelle et facteurs de transcription déterminants du destin cellulaire.
- **Figure 13:** Reconstruction d'un lignage de progéniteurs rétiniens de rats.
- **Figure 14:** Les différentes périodes pour l'isolation et la culture de RPCs humaines et non humaines.
- **Figure 15:** Effets des rétinopathies pigmentaires sur le champ visuel.
- **Figure 16:** Les stratégies thérapeutiques des dystrophies rétiniennes selon la progression de la maladie.
- **Figure 17:** Répartition des différents types de stratégies thérapeutiques en cours de développement pour le traitement de la rétinopathie pigmentaire.
- **Figure 18:** De l'œuf fécondé aux cellules adultes différenciées.
- **Figure 19:** Le rôle des facteurs OSKM dans l'induction des cellules iPS.
- **Figure 20:** Les deux phases de reprogrammation.
- **Figure 21:** Accessibilité et facilité de la reprogrammation cellulaire en fonction du type cellulaire d'origine.
- **Figure 23:** Graphique illustrant la relation entre l'efficacité et la sécurité des différentes méthodes de reprogrammation cellulaire.
- **Figure 24:** Premier protocole de différenciation de cellules ES de souris en cellules rétiniennes
- **Figure 25:** Auto-formation de structures organisées de type cupules optiques à partir de cellules souches embryonnaires.
- **Figure 26:** Protocole de différenciation des cellules iPS en organoïdes rétiniens
- **Figure 27:** Les potentielles applications des cellules souches induites à la pluripotente issues de patients
- **Figure 28:** Workflow pour le design d'un modèle pathologique à partir de cellules iPS
- **Figure 29:** Facteurs impliqués dans la spécification des photorécepteurs à cônes et à bâtonnets.

- **Figure 30:** Illustration schématique des protocoles de culture pour différencier les RPCs.
- **Figure 31:** Morphologie des RPCs différenciées dans les différentes conditions de culture par microscopie en fond clair.
- **Figure 32:** Quantification des cellules mcherry positives à l'issue de chaque dissociation.
- **Figure 33:** Analyse RT-qPCR dans les RPCs différenciées de l'expression relative des facteurs de transcriptions.
- **Figure 34:** Immunofluorescence des RPCs différenciées.
- **Figure 35:** Obtention de cultures enrichies en précurseurs de photorécepteurs.
- **Figure 36:** Caractérisation des RPCs différenciées après chaque technique de dissociation.
- **Figure 37:** Immunofluorescence RPCs différenciées après décongélation à l'issue de différentes techniques de dissociation.
- **Figure 38:** Evaluation de l'effet de la cryopréservation de culture enrichies en précurseurs de photorécepteurs.
- **Figure 39:** Engagement des cellules progénitrices vers un destin de cellules neuro-rétiniennes ou de l'EPR.

Liste des tableaux

- **Tableau 1:** Facteurs extrinsèques impliqués dans la rétino-génèse.
- **Tableau 2:** Facteurs d'identité temporelle durant la rétino-génèse.
- **Tableau 3:** Classification des dystrophies rétiniennes héréditaires.
- **Tableau 4:** Les différents protocoles de différenciation de cellules souches pluripotentes humaines en photorécepteurs.
- **Tableau 5:** Les différents protocoles de différenciation de cellules souches pluripotentes humaines en cellules de l'EPR.
- **Tableau 6:** Essais cliniques de transplantation cellulaire se basant sur des cellules rétiniennes dérivées de cellules souches pluripotentes humaines.
- **Tableau 7:** Modèles de rétino-pathies pigmentaires établis à partir de cellules iPS de patients.
- **Tableau 8:** Composition des différents milieux de culture utilisés pour l'amplification et la différenciation des RPCs.

Liste des abréviations

AAV: Virus Adéno-Associé

ATP: Adénosine Triphosphate

ES: Cellules Souches Embryonnaires

CNE: Couche Nucléaire Externe

CNI: Couche Nucléaire Interne

CNTF: Ciliary Neurotrophic Factor

CNV: Copy Number Variation (Variabilité du nombre de copies)

CPE: Couche Plexiforme Externe

CPI: Couche Nucléaire Interne

CSP: Cellule Souche Pluripotente

CSPh : Cellule souche pluripotente humaine

DMLA: Dégénérescence Maculaire Liée A L'âge

EB: Embryoid body (Corps Embryonnaires)

EFTF: Eye Field Transcription Factor (Facteur de Transcription définissant le Territoire Oculaire)

EPR: Epithélium Pigmentaire Rétinien

FACS: Fluorescence-activated cell sorting (Cytométrie En Flux Et Tri Cellulaire Activé Par Fluorescence)

FGF: Fibroblast Growth Factor

GDNF: Glial-Cell-Line-Derived Neurotrophic Factor

IGF: Insuline-Like Growth Factor

HCS: High content screening (Analyse A Haut Contenu)

HTS: High Throughput Screening (Criblage A Haut Débit)

IGF-1: Insulin-Like Growth Factor-1

iPS: Induced pluripotent stem cell (Cellule souche Induite A La Pluripotence)

LCA: Amaurose Congénitale De Leber

MACS: Magnetic-activated cell sorting (Cytométrie En Flux Et Tri Cellulaire Activé Par Magnétique)

MCI: Masse Cellulaire Interne

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor

RdCVF: Rod-Derived Cone Viability Factor

RN: Rétine Neurale

RP: Rétinite Pigmentaire

RPCM: RPC Médium

RPC: Retinal progenitor cell (Cellule Progénitrice Rétinienne)

SFEB: Serum-free floating culture of embryoid body-like aggregates (Culture Flottante De Corps Embryoïdes Sans L'utilisation De Sérum)

TGF-B: Transforming Growth Factor B

TIF: Temporal Identity Factor (Facteur D'identité Temporelle)

VEGF :Vascular Endothelial Growth Factor

ZMC: Zone Marginale Ciliaire

Introduction

*« On n'a jamais fait de grande découverte sans hypothèse
audacieuse. »*

Isaac Newton

.

Partie I: Organisation, fonctionnement et développement la rétine

1. L'œil : anatomie d'une sphère complexe

L'œil ou globe oculaire est la partie fondamentale de l'appareil de la vision. Il transmet et focalise la lumière sur la rétine. L'œil se compose de trois membranes concentriques qui sont: une membrane externe ou fibreuse constituée par la sclérotique et la cornée; une membrane moyenne musculo-vasculaire appelée uvée et une membrane interne et nerveuse, la rétine (Figure 1).

La tunique la plus externe est **la sclère ou sclérotique** qui est une membrane résistante et inextensible qui affecte la forme de l'œil et assure sa protection. Aussi appelée plus communément « le blanc de l'œil », ce tissu conjonctif dense et peu vascularisé est entouré par une membrane fine et transparente: la conjonctive. La sclérotique se continue en avant avec la cornée qui, de par sa transparence, laisse passer les rayons lumineux dans l'œil: c'est la première lentille de l'œil permettant de filtrer les rayons ultra-violets, et de focaliser la lumière sur le cristallin (Moffat *et al.*, 2002). Privée de vaisseaux sanguins, elle est d'autant plus riche en fibres nociceptives permettant les phénomènes de clignement de l'œil et de sécrétion lacrymale quand un corps étranger rentre à son contact.

La tunique musculo-vasculaire appelée **uvée** est située en dedans de la membrane fibreuse et comprend trois segments qui sont d'arrière en avant la choroïde, la zone ciliaire et l'iris (Delmas et Rouvière, 1974). La choroïde est une membrane de couleur brune essentiellement constituée par des vaisseaux qui assurent un apport constant d'oxygène et de nutriments à la rétine. De par sa composition en mélanocytes, elle absorbe les rayons lumineux inutiles pour la vision en les empêchant d'être réfléchis. En avant, la choroïde se continue avec la zone ciliaire qui est formée de deux parties distinctes: le muscle ciliaire composé de fibres musculaires lisses permettant de déformer le cristallin et ainsi permettre l'accommodation de l'œil et les procès ciliaires sécrétant l'humeur aqueuse, liquide remplissant la cavité antérieure de l'œil et ayant pour rôle majeur de réguler la pression intra-oculaire. Enfin, l'iris est la partie antérieure de la membrane musculo-vasculaire; il est placé comme un diaphragme vertical en avant du cristallin. Son centre est percé d'un orifice appelé pupille. Les dimensions de la pupille sont soumises à l'action des muscles dilatateur et sphincter de l'iris qui assurent le contrôle de la quantité de lumière entrant dans l'œil.

La tunique la plus interne est la **rétine**, membrane nerveuse de l'œil divisée en deux parties principales: la rétine neurale et l'épithélium rétinien pigmentaire, lesquelles seront détaillées ultérieurement.

L'œil est constitué de milieux dits transparents qui sont: le cristallin placé en arrière de l'iris; l'humeur aqueuse, remplissant l'espace situé en avant du cristallin jusqu'à la cornée et enfin le corps vitré situé en arrière du cristallin jusqu'à la rétine. Le cristallin est une lentille biconvexe, transparente, élastique et de consistance ferme chez l'adulte. Celui-ci est maintenu par des fibres transparentes qui vont de la face interne du corps ciliaire à la périphérie du cristallin: la zonule du cristallin. Le cristallin et son ligament suspenseur divisent l'œil en deux zones appelées chambres de l'œil: la chambre antérieure remplie par l'humeur aqueuse, liquide incolore, limpide jouant un rôle de régulateur de la pression intraoculaire et la chambre postérieure remplie d'une substance visqueuse transparente, le corps vitré, ou humeur vitrée qui représente 90% du volume de l'œil. Ce dernier est principalement constitué d'eau, de fibrilles de collagène et d'acide hyaluronique conférant à l'œil sa forme et sa consistance gélatineuse.

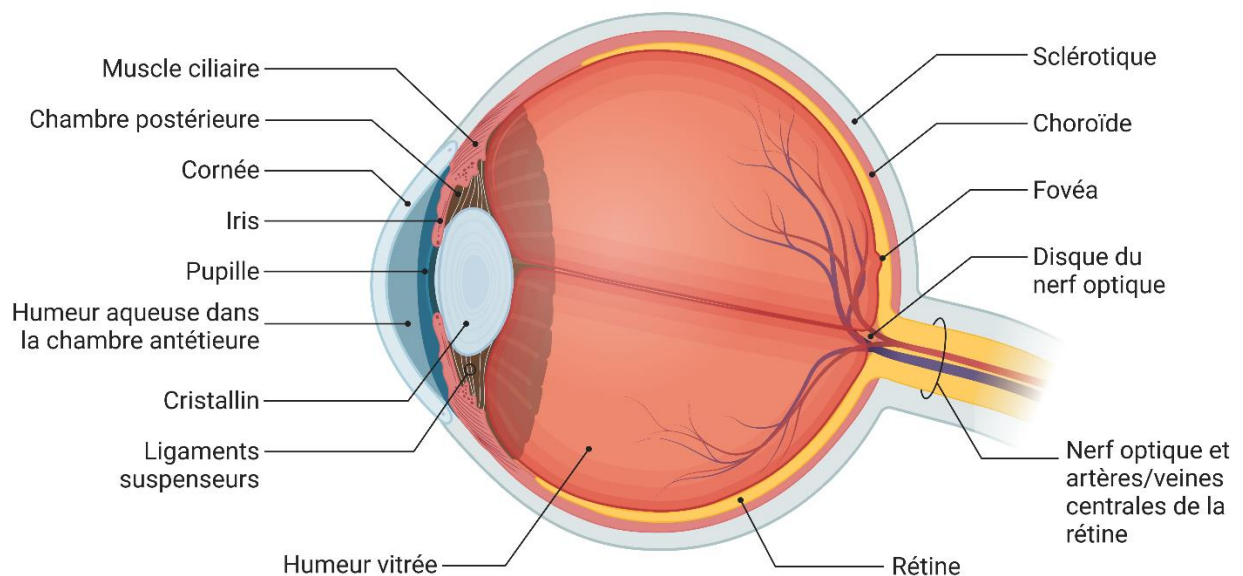


Figure 1 : Anatomie générale de l'œil. Créée avec BioRender.com.

2. La rétine

La rétine, tissu neural qui tapisse le fond de l'œil, est composée d'une multicouche de cellules neuronales, gliales et épithéliales. Ce tissu photosensible permet la traduction d'images en impulsions électriques directement transmises au cerveau par le nerf optique. Elle est composée de deux parties distinctes (Figure 2): l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) et la rétine neurale (RN).

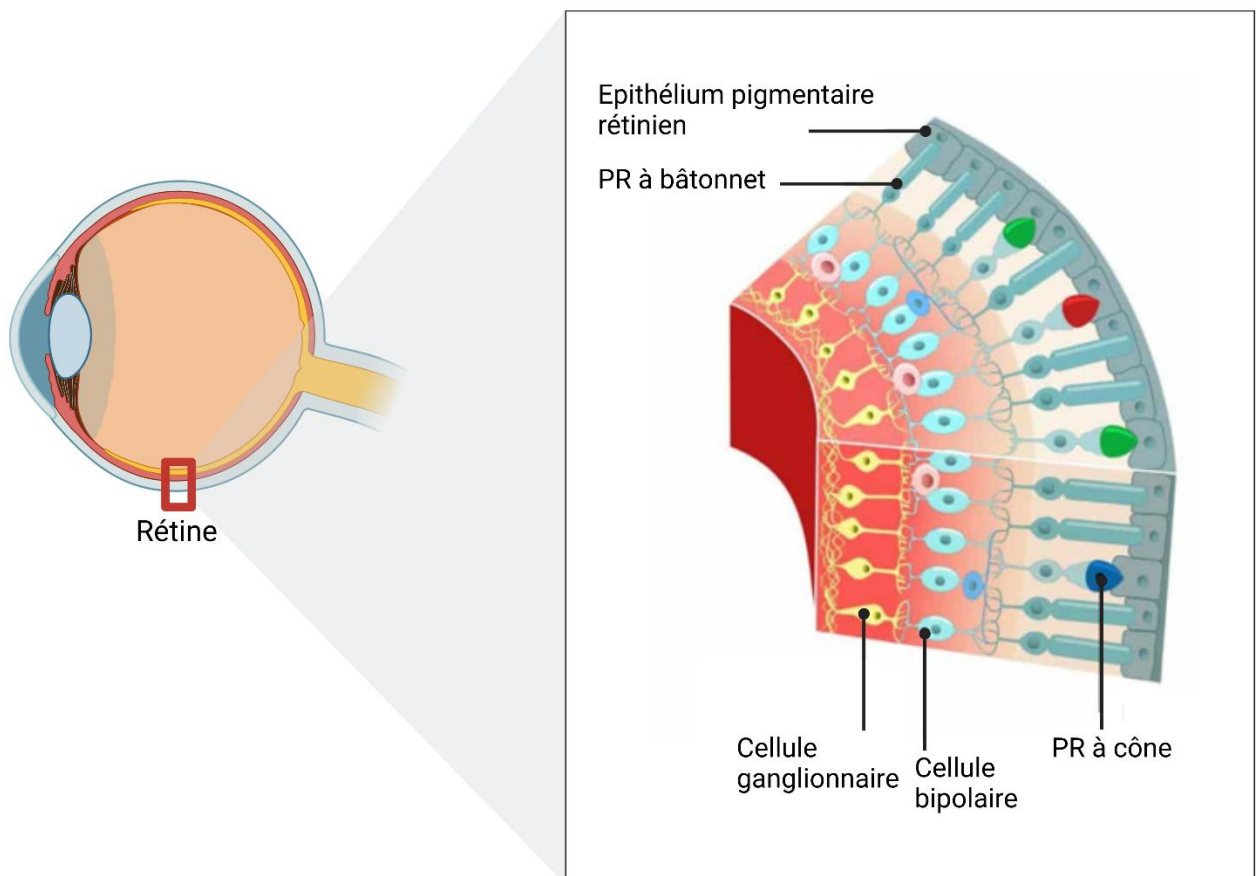


Figure 2: Coupe de la rétine. Créée avec BioRender.com.

A. L'épithélium pigmentaire rétinien

a. Structure de l'épithélium pigmentaire

L'épithélium pigmentaire rétinien est une monocouche de cellules épithéliales hexagonales caractérisées par la présence de pigments de mélanine et de lipofuscine (Figure 3). Il se situe entre la choroïde et la rétine neurale (Rigaudière, 2013). Comme tout tissu épithélial, les cellules sont polarisées avec un pôle apical et basal aux fonctions et structures différentes. Leur pôle apical, est en contact avec les segments externes des photorécepteurs et présente une multitude de microvillosités de deux types: des longues qui augmentent la surface d'échange de la membrane et des courtes, elles, impliquées dans la phagocytose rétinienne (Boulton *et al.*, 2001). Aussi, il possède de nombreux canaux ioniques, transporteurs et co-transporteurs. L'espace permettant l'interaction entre l'EPR et la rétine neurale est appelé matrice inter-photorécepteurs, qui est une matrice extracellulaire de structure complexe contenant notamment des facteurs de croissance et ayant un rôle dans la phagocytose des segments externes ainsi que dans les échanges nutritionnels entre l'épithélium rétinien pigmentaire et photorécepteurs. Les cellules de l'EPR sont reliées par des jonctions serrées faisant intervenir des protéines transmembranaires participant à la constitution de la barrière hémato-rétinienne externe. Les cellules de l'EPR reposent du côté basal sur la membrane de Bruch et son pôle basal possède de nombreuses invaginations étendant la surface d'échange avec cette membrane. Celles-ci permettent d'assurer des échanges métaboliques vitaux entre l'EPR et les capillaires de la choroïde qui sont la principale source de nutriments.

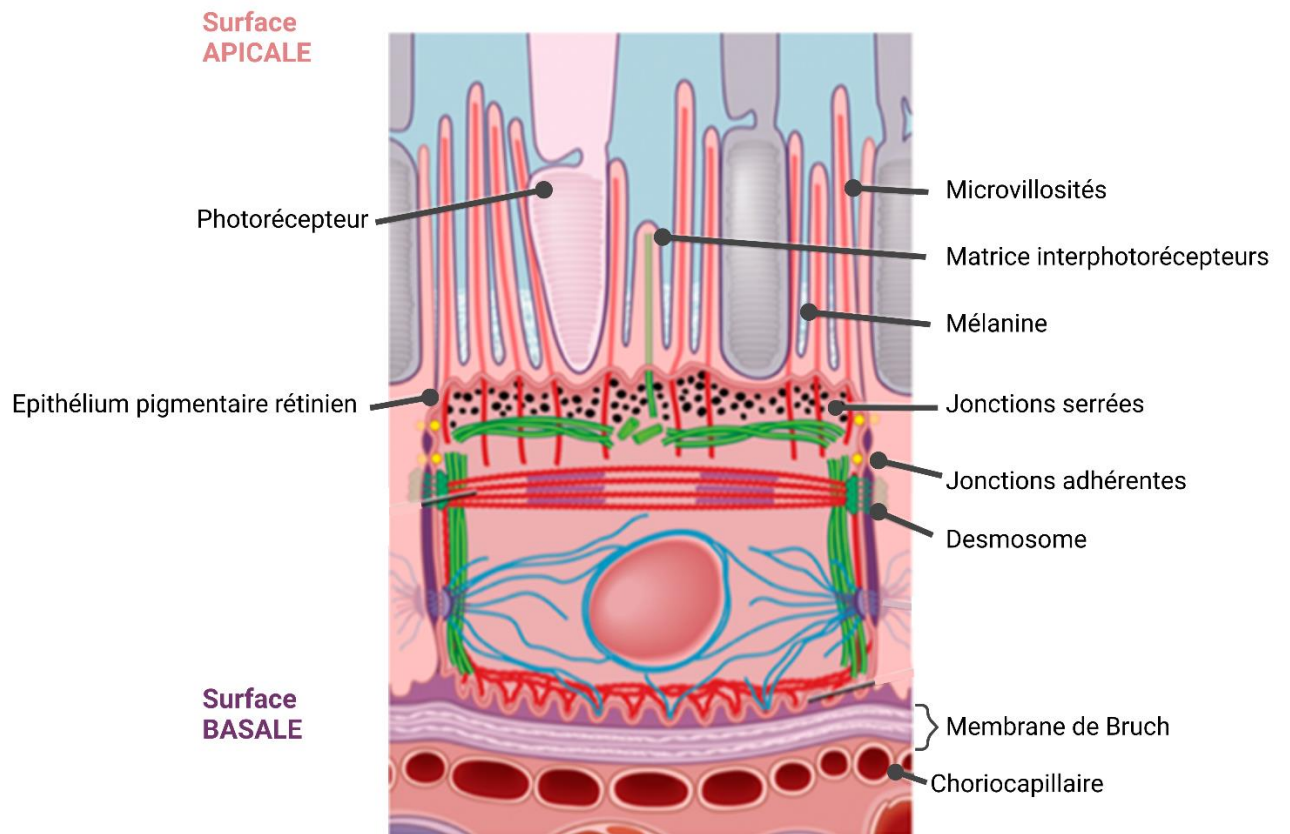


Figure 3: Structure de l'épithélium pigmentaire rétinien Adapté de [Naylor et al., 2020](#).

b. Les différentes fonctions de l'épithélium pigmentaire

La proximité de la rétine neurale et de l'EPR confère à ce dernier des rôles multiples et primordiaux au bon fonctionnement de la rétine. En effet, celui-ci remplit cinq fonctions essentielles qui sont l'absorption de la lumière permettant la protection de la rétine contre la photo-oxydation; l'apport et l'évacuation de métabolites de la rétine neurale ; le recyclage des pigments impliqués dans le cycle visuel; la phagocytose des segments externes des photorécepteurs et enfin la sécrétion d'une variété de molécules essentielles aux mécanismes de la fonction visuelle.

- L'absorption de la lumière: En raison de sa forte consommation d'oxygène, de sa forte teneur en acides gras polyinsaturés et de son exposition à la lumière, la rétine est particulièrement sensible au stress oxydatif engendré par une forte production d'espèces réactives de l'oxygène comprenant les radicaux libres, le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène singulet. L'EPR constitue une barrière de protection contre la photo-oxydation pour la rétine de par ses pigments de mélanine permettant d'absorber les photons qui n'ont pas été captés par les pigments visuels. D'après Strauss, 60 % des photons encore libres sont absorbés par l'EPR (Strauss, 2005). Aussi, les cellules de l'EPR contiennent une multitude d'antioxydants non enzymatiques et enzymatiques permettant de protéger la rétine neurale.
- Le transport épithélial: L'EPR de par sa proximité avec la rétine neurale non vascularisée et la choroïde vascularisée réalise le transport de l'eau, des nutriments et des ions entre le choriocapillaire et les cellules photoréceptrices assurant ainsi leur nutrition. Du sang, il approvisionne les cellules rétinienne de nombreux métabolites nécessaires au maintien et à la fonctionnalité de la rétine tels que le glucose ou encore la vitamine A, initiateur de la phototransduction. Il constitue ainsi la barrière hémato-rétinienne. Une grande quantité d'eau s'accumule dans la rétine, en raison de l'important renouvellement métabolique des neurones et des photorécepteurs mais aussi de par un mouvement d'eau du corps vitré vers la rétine dû à la pression intraoculaire. L'élimination de l'eau se fait à l'intérieur de la rétine par les cellules gliales de Müller et dans l'espace sous-rétinien par l'EPR grâce à des canaux spécifiques: les aquaporines situées dans les membranes de l'EPR. Il participe également, par la présence de canaux et transporteurs dans ses membranes, à l'évacuation des produits métaboliques issus de l'activité consécutive des photorécepteurs dans l'espace sous-rétinien tel que l'acide lactique produit par les segments externes des photorécepteurs (Philp *et al.*, 2003).
- Son implication dans le cycle visuel: Lors de la phototransduction, le rétinol passe de l'état 11-cis à l'état tout-trans après avoir absorbé un photon au niveau des segments externes des photorécepteurs. Cependant, les photorécepteurs ne possèdent pas l'enzyme nécessaire pour régénérer le rétinol sous la forme 11-cis: forme nécessaire à la réception de nouveaux photons.

Ainsi le tout-trans-rétinal va être exporté vers l'EPR et être ré-isomérisé puis transféré aux photorécepteurs par l'intermédiaire de différents transporteurs et enzymes dont: l'enzyme LRAT (Lécithine-Rétinol-Acyltransférase), l'isomérase RPE65 et la RDH5 (Rétinol-Déshydrogénase).

- La phagocytose des segments externes des photorécepteurs: Le renouvellement des segments externes des photorécepteurs est essentiel à la maintenance de la fonction visuelle. En effet, ces segments sont soumis à des dommages photo-oxydatifs réguliers provoqués par leur interaction avec la lumière qui rentre dans l'œil entraînant une forte concentration de l'énergie de photo-oxydation au niveau de la rétine. L'EPR permet l'élimination des débris des segments externes par un mécanisme de phagocytose, tandis que les photorécepteurs régénèrent à partir de la base de leur segment externe. Cette phagocytose se fait en plusieurs temps: elle suit un rythme circadien qui est différent pour les photorécepteurs à bâtonnets et ceux à cônes. Les photorécepteurs à bâtonnets perdent davantage de disques lors du passage de l'obscurité à la lumière (Besharse *et al.*, 1977) et les photorécepteurs à cônes davantage après passage de la lumière à l'obscurité. Le renouvellement complet de l'article externe d'un photorécepteur prend environ 10 jours (Strauss, 2005).
- La fonction de sécrétion de l'EPR: L'EPR sécrète un grande variété de facteurs nécessaires à la protection de la rétine neurale tels que des facteurs de croissances: le TGF- β (Transforming growth factor β), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor), le PDGF (Platelet-Derived Growth factor), le VEGF (Vascular endothelial Growth Factor) et le CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor). Il sécrète notamment des facteurs anti-oxydants comme précédemment évoqué, mais aussi des facteurs immunosuppresseurs comme certaines interleukines ou encore le facteur H du complément (Sugita *et al.*, 2009).

B. La rétine neurale

La rétine neurale est un tissu très fin, de 100 à 500 μm d'épaisseur chez l'Homme, composé de 7 types cellulaires spécialisés organisés en couches successives incluant six types de neurones: cellules ganglionnaires, amacrines, horizontales, bipolaires, photorécepteurs à cônes et à bâtonnets et un type de cellule gliale: les cellules gliales de Müller. De l'extérieur vers l'intérieur de l'œil sont présentes: la couche nucléaire externe (CNE) contenant les noyaux des photorécepteurs, la couche nucléaire interne (CNI) contenant les noyaux des cellules amacrines, horizontales, bipolaires et gliales de Müller; et la couche des cellules ganglionnaires ainsi que les couches plexiformes composées des connexions synaptiques entre les cellules (Figure 4).

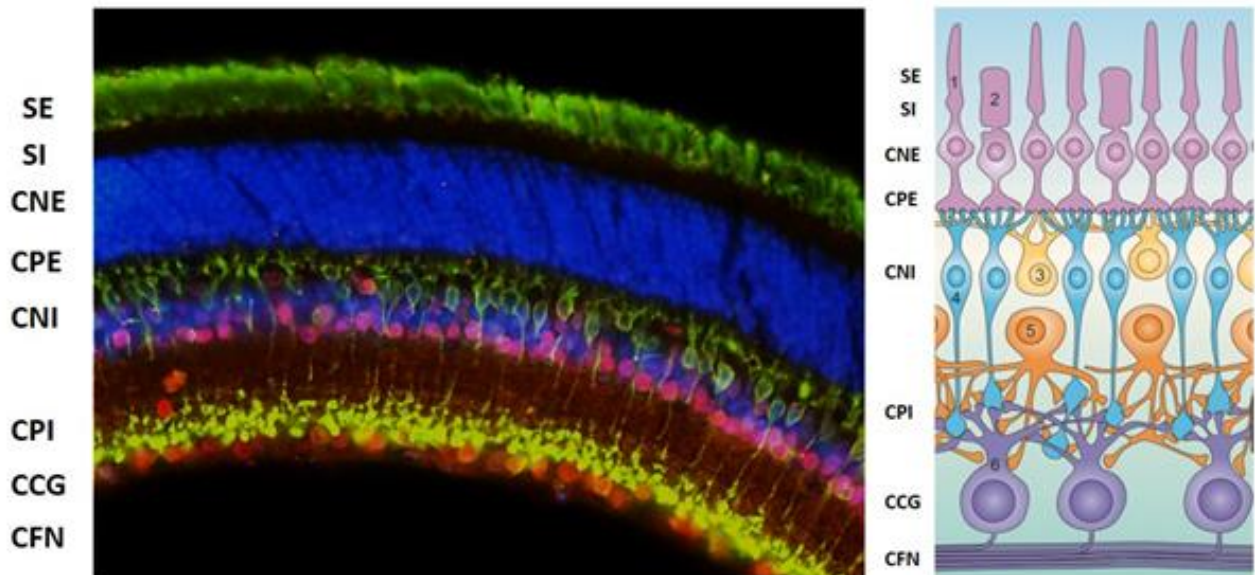


Figure 4 : Structure et histologie de la rétine : *SE* : Segment Externe des PRs; *SI* : Segment Interne des PRs; *CNE* : Couche Nucléaire Externe; *CPE*: Couche Plexiforme Externe; *CNI*: Couche Nucléaire Interne; *CPI*: Couche Plexiforme Interne; *CCG*: Couche des Cellules Ganglionnaires; *CFN*: Couche des Fibres Nerveuses. Adapté de [Wässle et al., 2004](#).

a. La couche nucléaire externe

La CNE comprend les corps cellulaires des photorécepteurs qui sont des neurones photosensibles. Les photorécepteurs transforment la lumière en signaux électrochimiques par le mécanisme de phototransduction. Le signal est ensuite traité par un réseau neuronal rétinien et transmis au cerveau. Deux types de photorécepteurs aux fonctions et structures différentes existent: les photorécepteurs à cônes et ceux à bâtonnets. Ces derniers conservent une structure commune avec des propriétés morphologiques similaires (Figure 5) qui sont: un segment externe, un segment interne, un corps cellulaire et une terminaison synaptique. Le segment externe est la partie réceptrice qui absorbe la lumière: il est composé de disques ou replis membranaires contenant les photo-pigments (Mustafi *et al.*, 2013). Pour les deux types de photorécepteurs, le segment externe est rattaché au segment interne par un cil connecteur. Le segment interne contient toute la machinerie cellulaire et de nombreux organites lui conférant une activité métabolique très importante. Le segment interne est relié au corps cellulaire par une fibre externe qui contient des filaments et des microtubules. Le corps des photorécepteurs est occupé par le noyau. La fin des axones des photorécepteurs constitue une terminaison synaptique assurant la transmission du signal électrique aux cellules bipolaires au niveau de la couche plexiforme externe (CPE). Les deux types de photorécepteurs diffèrent par l'architecture de leur segment externe, ainsi que par le photopigment qu'il contient. Les photopigments sont composés d'une protéine de type opsine liée à un dérivé de la vitamine A, le 11-cis rétinol. Les opsines des photorécepteurs à cônes et à bâtonnets diffèrent dans leur composition moléculaire permettant de modifier le spectre d'absorption du 11-cis rétinol et modifiant ainsi l'excitabilité des différents photorécepteurs selon la longueur d'onde du signal lumineux. L'opsine des photorécepteurs à bâtonnets est la Rhodopsine, ayant une forte sensibilité à la lumière. En effet, les photorécepteurs à bâtonnets sont capables de provoquer une réponse suite à la stimulation d'un seul photon et sont saturés à des conditions photopiques (le jour) permettant ainsi la vision en conditions scotopiques (la nuit). Chez l'homme, les photorécepteurs à cônes sont classés selon leur sensibilité aux différentes longueurs d'ondes: on distingue alors ceux à Opsine L (Long), sensibles au rouge; à Opsine M (Medium), sensibles au vert et Opsine S (Short), sensible au bleu. Les photorécepteurs à cônes dits « rouges » sont principalement activés par une longueur d'onde d'environ 560 nm, les cônes « verts » autour de 535 nm, et les cônes « bleus » près de 420 nm (Bowmaker et Dartnall, 1980 ; Hofer *et al.*, 2005). Les photorécepteurs à cônes ne saturent pas à des niveaux de lumière élevés, plus de 100 photons sont nécessaires afin de produire une réponse comparable aux photorécepteurs à bâtonnets et sont responsables de la vision diurne en couleurs. Les photorécepteurs à cônes sont aussi distinguables des photorécepteurs à bâtonnets par la longueur de leur segment externe plus court et conique formé par des invaginations de la membrane plasmique tandis que les segments externes des photorécepteurs à bâtonnets sont plus longs et composés de disques non connectés à la membrane plasmique ciliaire.

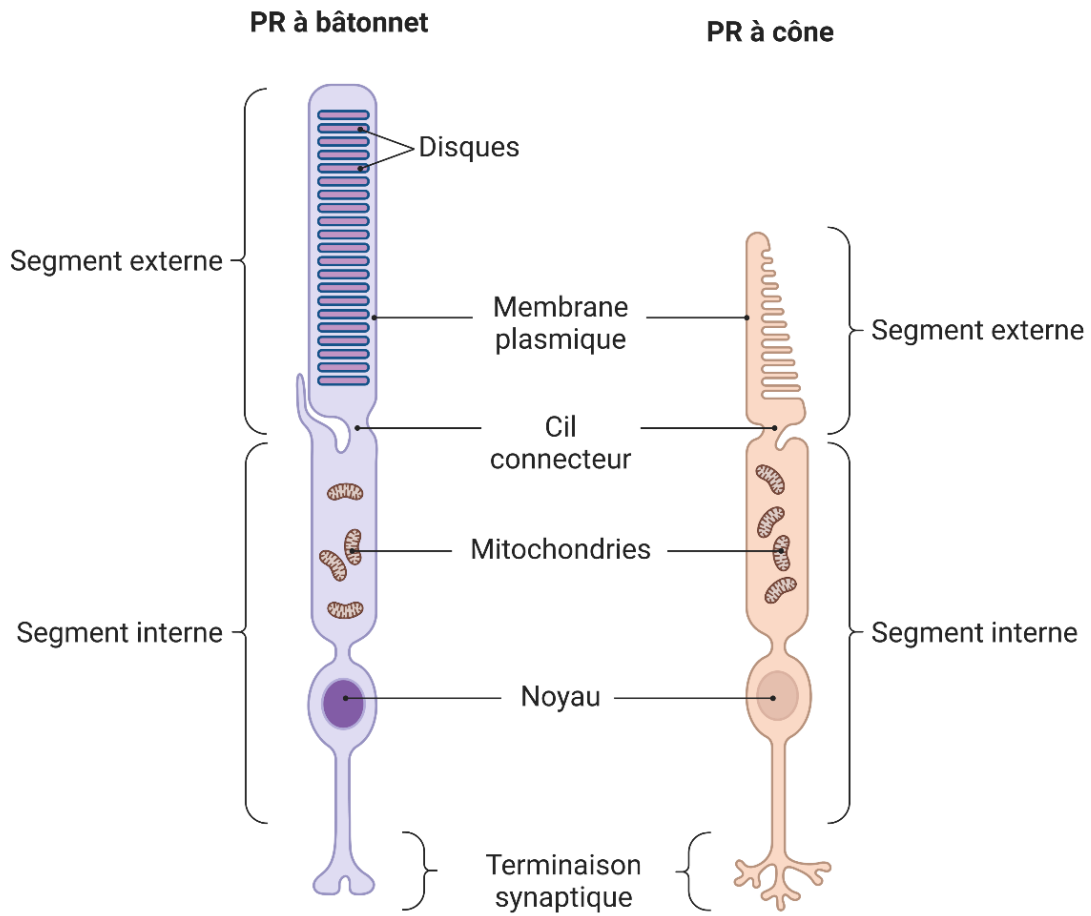


Figure 5 : Les différents types de photorécepteurs: photorécepteurs à cônes et à bâtonnets. Créée avec BioRender.com.

Bien que la vision en conditions photopiques soit principalement médiée par les photorécepteurs à cônes, le pourcentage de photorécepteurs à bâtonnets dans la rétine humaine (95%) dépasse largement celui des photorécepteurs à cônes (5%) (Sung et al., 2010). Par conséquent, la densité des photorécepteurs à bâtonnets est beaucoup plus importante que celle des photorécepteurs à cônes dans la majeure partie de la rétine (Figure 6). Cependant, ce ratio change radicalement dans la fovéa au sein de la macula, une région hautement spécialisée de la rétine centrale mesurant environ 1,2 millimètre de diamètre dans laquelle la densité des cônes est multipliée par près de 200 s'accompagnant à l'inverse par une forte diminution de la densité des photorécepteurs à bâtonnets. Aussi, les 300 μm centraux de la fovéa, appelés fovéola, sont totalement dépourvus de photorécepteurs à bâtonnets. Sa composition en photorécepteurs à cônes confère à cette région une acuité visuelle élevée.

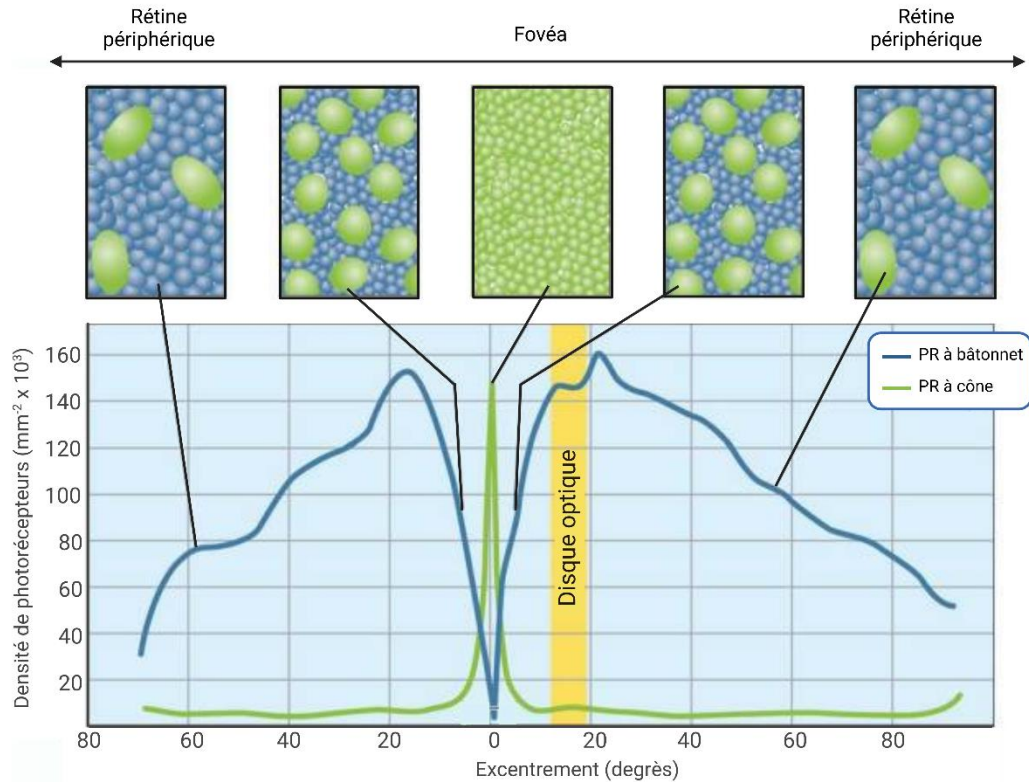


Figure 6: Distribution des photorécepteurs à bâtonnets et à cônes dans la rétine humaine. Le graphique montre que les cônes sont présents en faible densité dans toute la rétine, avec un pic marqué au centre de la fovea. À l'inverse, les bâtonnets sont présents à une densité élevée dans la majeure partie de la rétine, avec un déclin marqué dans la fovea. Les encadrés du haut illustrent l'aspect des coupes transversales à travers les segments externes des photorécepteurs à différentes excentricités. La densité accrue de cônes dans la fovea s'accompagne d'une réduction frappante du diamètre de leurs segments externes. La région du disque optique en jaune sur le graphique (composée de fibres nerveuses des cellules ganglionnaires) est quant à elle dépourvue de photorécepteurs. Adapté de [Mustafi et al., 2009](#).

b. La couche plexiforme externe

Elle est constituée principalement par des connexions synaptiques entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires. En outre, elle contient les prolongements cytoplasmiques des cellules gliales de Müller et des cellules horizontales de la couche nucléaire interne (CNI). C'est à ce niveau que se fait le premier traitement du signal lumineux qui sera ensuite transmis vers la couche plexiforme interne (CPI) par les cellules bipolaires.

c. La couche nucléaire interne

La CNI contient les corps cellulaires de 4 types cellulaires principaux: les cellules bipolaires, les cellules horizontales, les cellules amacrines et les cellules gliales de Müller. Les cellules bipolaires assurent la transmission du message nerveux des photorécepteurs vers les cellules ganglionnaires. Selon leur morphologie et le photorécepteur auquel elles sont connectées, différentes cellules bipolaires sont discernables: les cellules bipolaires à bâtonnets et une dizaine de sous-types de cellules bipolaires à cônes, de type ON ou OFF en fonction de leur réponse (dépolariation versus hyperpolarisation) (Wässle *et al.*, 2004). Un « système contrôle » de la rétine permettant la modulation latérale de la transmission d'information est assuré par deux autres types cellulaires: les cellules horizontales et amacrines. Les cellules horizontales assurent l'interconnexion de plusieurs photorécepteurs et vont ainsi permettre l'intégration et la modulation des signaux envoyés par ces derniers dans la CPE. On distingue deux sortes de cellules horizontales: les HI qui reçoivent les projections des photorécepteurs à cônes verts et rouges et des photorécepteurs à bâtonnets, et les HII qui connectent les photorécepteurs à cônes bleus entre eux et ne sont jamais connectés aux cellules HI (Cueva *et al.*, 2002). Les cellules amacrines forment des synapses du côté de la couche plexiforme interne avec les cellules bipolaires, ganglionnaires mais aussi entre elles, afin de moduler la transmission du signal électrique. Enfin, les cellules gliales de Müller sont les cellules gliales de la rétine et n'ont pas de rôle dans la transmission du signal visuel. Elles s'étendent sur toute l'épaisseur de la rétine assurant une cohérence de sa structure et facilitant le transfert des métabolites aux neurones rétiens. La connexion entre cellules bipolaires, amacrines et ganglionnaires se fait au niveau de la couche plexiforme interne (Matsuoka *et al.*, 2011).

d. La couche des cellules ganglionnaires

Les cellules ganglionnaires sont responsables de la transmission de l'information visuelle de la rétine vers le cerveau. Il en existe plus d'une vingtaine de sous-types dont 2 majoritaires: les cellules ganglionnaires M et P. Les cellules ganglionnaires M ou α ou « parasol », représentant environ 5% des cellules ganglionnaires qui sont de grandes cellules à nombreuses dendrites formant des synapses avec un grand nombre de cellules bipolaires diffuses. Elles ont pour rôle la détection grossière des formes et des mouvements. Les cellules ganglionnaires P ou β ou « naines », représentant environ 90% des cellules ganglionnaires, qui sont de petites cellules possédant un petit champ dendritique. Elles sont impliquées

dans la perception fine des formes et des détails et dans la vision des couleurs. Les axones des cellules ganglionnaires non myélinisés se réunissent quant à eux au niveau de la papille optique pour constituer le nerf optique (II).

3. Le développement de l'œil : des tissus embryonnaires à la rétinogénèse

Le développement de l'œil des vertébrés est un processus conservé, se décomposant en plusieurs étapes clés (Figure 7A-G), rythmées par des interactions et assemblages coordonnés de structures ayant des origines embryologiques différentes. Tandis que la neuro-rétine et l'EPR dérivent du neuro-ectoderme; le cristallin, la cornée et l'iris sont issus de l'ectoderme de surface et enfin la sclère dérive du mésoderme. Après la formation du champ oculaire au cours de la gastrulation, une séparation de ce champ en deux parties latérales (Graw, 2010) s'effectue sous l'effet des facteurs sécrétés par la ligne médiane. Ces deux territoires oculaires latéraux, de par l'évagination du diencephale au cours de la neurulation, laissent place à la formation de vésicules optiques bilatérales. A ce stade, la vésicule optique est composée de trois parties: une partie la plus distale qui donnera l'EPR; une partie ventrale qui donnera le pédoncule optique et une partie plus latérale qui est en contact avec la placode donnant par la suite la rétine neurale. La partie distale de la vésicule entre en contact avec l'ectoderme de surface sus-jacent, induisant alors la mise en place de la placode cristallinienne. Le rapprochement de ces différentes parties entraîne des interactions qui induisent une invagination du neuroépithélium des vésicules optiques de sorte que l'EPR et la rétine neurale se retrouvent superposés. La vésicule optique devient alors la cupule optique, composée de deux couches : une couche interne qui fait face à la vésicule cristallinienne composée de progéniteurs rétiniens qui donnera la future rétine neurale et la couche externe qui donnera par la suite l'EPR (Heavner et al., 2012). La vésicule optique reste contiguë au diencephale via le pédoncule optique, dont la lumière contiendra le nerf optique (Xiang, 2013). Parallèlement, la placode cristallinienne se sépare de l'ectoderme de surface formant ainsi le cristallin. Chacune de ces étapes est régulée par des facteurs extrinsèques et intrinsèques, qu'il est important de comprendre dans le but de récapituler le développement embryonnaire de l'œil à l'aide de cellules souches pluripotentes humaines (CSPH).

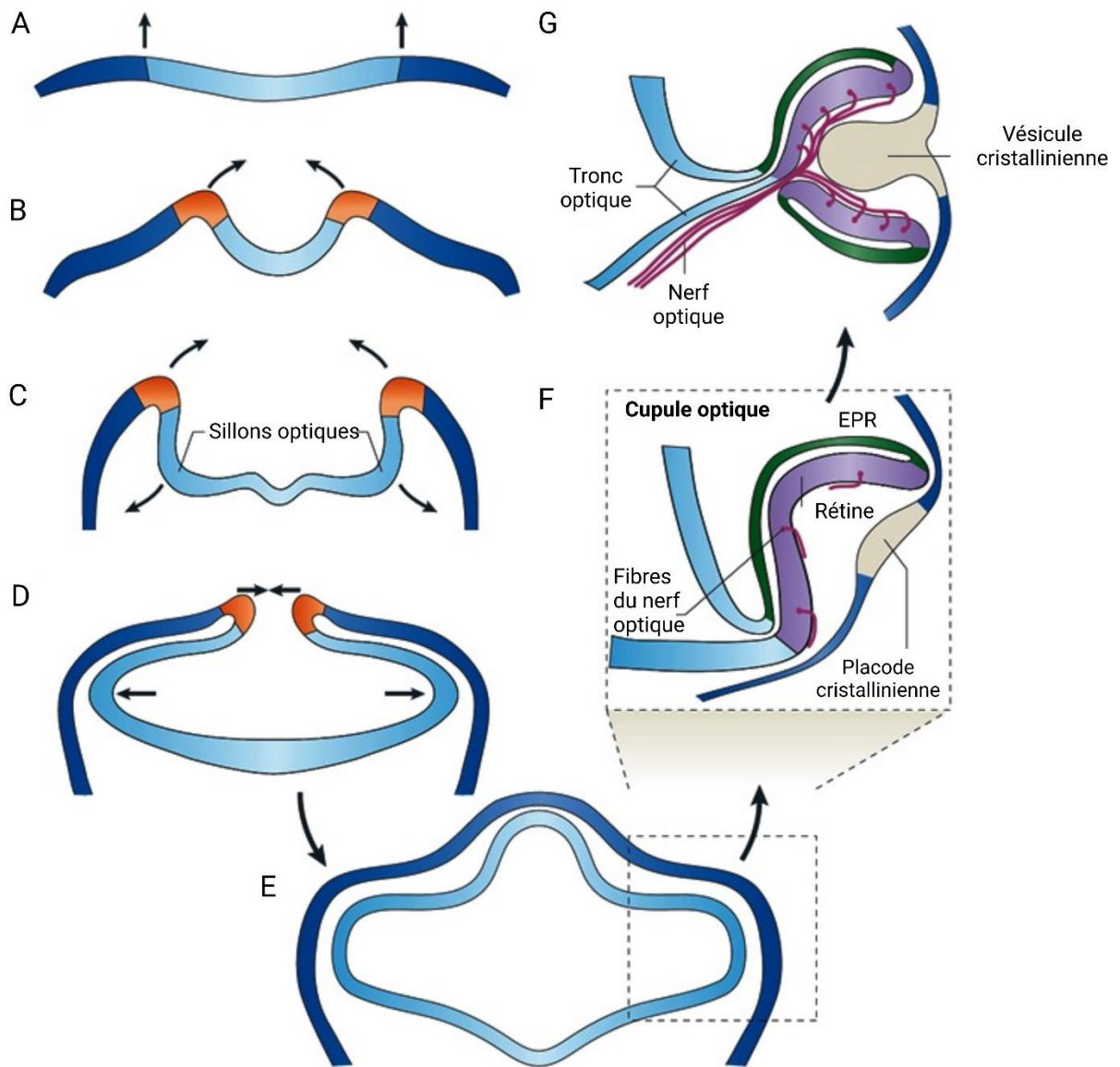


Figure 7: Développement embryologique de l'œil chez les vertébrés. (A) La plaque neurale est le point de départ du développement du tube neural. (B) La plaque neurale se plie vers l'intérieur et vers l'intérieur. (C) Les sillons optiques se forment et commencent à s'évagner. (D) Les extrémités des plis neuraux se rapprochent l'une de l'autre, et les vésicules optiques s'étendent vers l'extérieur. (E) Une fois le tube neural fermé, les vésicules optiques continuent de se développer vers l'extérieur. (F) Les vésicules optiques en expansion entrent en contact avec l'ectoderme de surface au niveau de la placode cristallinienne, induisant des changements dans les deux tissus. La vésicule optique apparaît maintenant invaginée, et la future rétine est étroitement apposée au futur EPR; le peu d'espace ventriculaire qui existait entre eux disparaît. Les cellules ganglionnaires rétiniennes en développement envoient leurs axones à travers la surface de la rétine. L'ectoderme de surface de la placode cristallinienne s'épaissit, formant la vésicule cristallinienne. (G) L'expansion de la cupule optique entraîne la fermeture de la fissure choroïdienne. Le tissu ectodermique continue à se différencier pour finalement former le cristallin. Adapté de [Lamb, 1995](#).

B. Spécification du champ oculaire

La spécification du territoire oculaire nécessite que les cellules de la plaque neurale antérieure adoptent une certaine identité: l'identité oculaire. Cette spécification repose sur une série d'événements d'induction et inhibition de voies de signalisation incluant l'inhibition de la voie BMP (Bone Morphogenetic Protein), l'inhibition de la voie canonique Wnt (Wingless integration site) et l'induction des voies FGF (Fibroblast Growth Factor) et IGF (Insuline-like Growth factor). L'ensemble de ces événements induit la surexpression du gène *Otx2* (Orthodenticle homeobox 2) et d'une association de facteurs de transcriptions: les Eye field Transcription Factors (EFTFs) (Figure 8). Les cellules constituant le champ oculaire expriment donc ces EFTFs qui sont hautement conservés chez les vertébrés (Moore et al., 2004, Zaghoul et al., 2005). Chez les vertébrés, les EFTFs comprennent *Pax6* (Paired box6), *Rax* (appelé aussi Rx, Retinal and anterior neural fold homeobox), *Six3* (Six homeobox 3) et *Lhx2* (LIM homeobox), *Tbx3* (T-box2 nommé ET), *Six6* (Six homeobox) et *Nr2e1* (Nuclear receptor subfamily 2) (Figure 8). Ils constituent un réseau de régulation hautement conservé entre les espèces nécessaire au développement de l'œil (Zuber et al., 2003, Bailey et al., 2004). Ces facteurs sont également impliqués dans le développement du cerveau antérieur, ce qui complique l'identification des voies de signalisation en amont spécifiquement impliquées dans l'établissement du champ oculaire (Hagglund et al., 2011).

Le facteur de transcription *OTX2*, exprimé dès l'embryogenèse précoce, est un des premiers facteurs intervenant dans le réseau transcriptionnel précédemment cité permettant la formation de l'œil (Simeone et al., 1993, Zuber et al., 2003). L'une des actions principales de ce facteur dans la rétine, grâce notamment à son interaction avec *Sox2* (Danno et al., 2008) de l'ectoderme neural, est d'activer l'expression du gène *Rax*. *Rax* en retour, une fois induit, réprime l'expression de *OTX2*. A son tour, *RAX* joue un rôle essentiel dans le développement précoce de l'œil comme le démontre un certain nombre d'études (Grindley et al., 1995, Bailey et al., 2004) dont notamment une étude ayant utilisé un modèle de souris porteuse d'une mutation dans le promoteur de *Rax*. Cette mutation induisait une absence d'expression des EFTFs et de ce fait une absence de formation de vésicules optiques donnant alors des souris dites « eyeless » (Mathers et al., 1997). *Pax6*, est un des EFTFs les plus connus: celui-ci, hautement conservé chez les vertébrés, permet de par sa seule expression, l'induction de la formation ectopique de l'œil dans certains tissus (Halder et al., 1995). Il interagit notamment avec *Lhx2* pour activer l'expression de *Six6*, un gène important dans la formation de la vésicule optique (Tétreault et al., 2009). Enfin, le facteur de transcription *Six3* joue un rôle majeur dans la mise en place du champ oculaire en inhibant l'expression de *Pax6*.

Au cours du temps, les études de gain et de perte de fonction relatives à chacun de ces facteurs ont permis d'étoffer les interactions dans ce réseau transcriptionnel essentiel à la formation de l'œil même si encore aujourd'hui les mécanismes moléculaires ne sont pas entièrement élucidés.

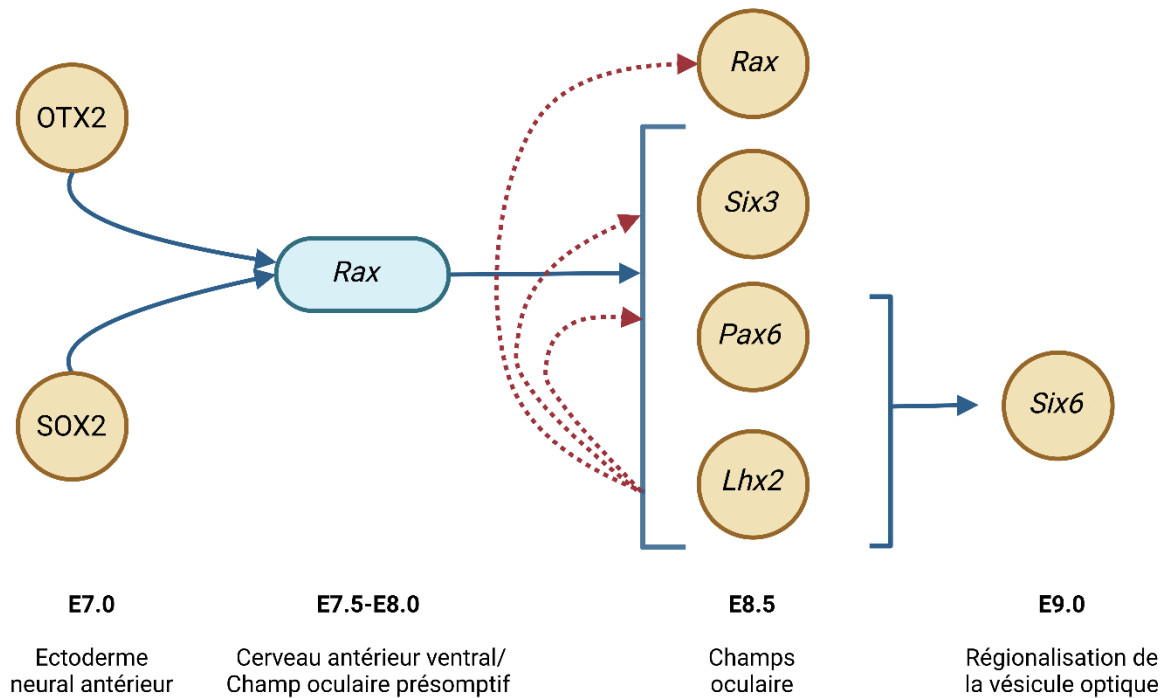


Figure 8: Réseau de facteurs de transcription dans l'établissement du champ oculaire. Les facteurs de transcription SOX2 et OTX2 de l'ectoderme neural activent l'expression de *Rax* dans le champ oculaire. RAX participe à la régulation positive des EFTFs *Lhx2*, *Pax6* et *Six3* dans le champ oculaire. Les flèches en pointillés indiquent que LHX2 peut coréguler l'expression de *Rax*, *Pax6* et *Six3* dans le champ oculaire, car l'expression de ces gènes est retardée chez les embryons *Lhx2*^{-/-} (Tétreault et al., 2009). Les EFTFs coordonnent ensuite les voies de signalisation intrinsèques et extrinsèques aux cellules qui régionalisent la vésicule optique le long de ses axes. Adapté de Heavner et al., 2012.

C. Division du champ oculaire

Le champ oculaire se divise en deux lors de la mise en place de la ligne médiane ventrale. Bien que les mécanismes impliqués dans ce processus morphogénétique soient encore mal compris, plusieurs facteurs ont clairement été démontrés comme essentiels à son déroulement. Le premier facteur est Sonic Hedgehog (Shh) exprimé dans le cerveau antérieur ventral et le mésoderme préchordal (Echelard *et al.*, 1993). Son expression est régulée directement par le facteur Nodal (Muller *et al.*, 2000) qui appartient à la superfamille TGF- β . De par leur interaction, ces deux facteurs participent à l'inhibition de l'EFTF *Pax6* dans la ligne médiane induisant ainsi à la formation de deux champs optiques et la mise en place de l'axe dorso-ventra (Li *et al.*, 1997). Des mutations altérant ces deux facteurs entraînent une incapacité du champ oculaire à se diviser, conduisant alors à un phénotype de cyclopie (Chiang *et al.*, 1996). Un autre acteur impliqué dans cette division est *Six3* exprimé dans tout l'ectoderme neural antérieur, avant de se limiter au cerveau antérieur ventral et au champ oculaire (Oliver G *et al.*, 1995). Celui-ci régulerait l'expression de Shh dans la ligne médiane ventrale (Geng *et al.*, 2008). Similairement à Shh et Nodal, des mutations entraînant une perte de fonction de *Six3* conduisent à un phénotype de cyclopie (Belloni *et al.*, 1996, Roessler *et al.*, 1996).

D. Mise en place des vésicules optiques : régionalisation et spécification

Une fois la division du champ oculaire établie, une extension des deux champs optiques va s'opérer avec une évagination des parois latérales du diencephale qui conduit à la formation des vésicules optiques. Au cours de cette évagination, une régionalisation des vésicules optiques en trois compartiments distincts a lieu; chacun ayant des fonctions et une morphologie caractéristiques ainsi qu'une expression spécifique de facteurs de transcriptions essentiels au développement du type cellulaire dans lequel ils sont exprimés. En effet, à ce stade nous pouvons distinguer :

- la région la plus dorsale qui représente le futur EPR, exprimant le facteur de transcription MITF (Microphthalmia-associated transcription factor);
- la région la plus distale qui donnera la future rétine neurale, exprimant alors la protéine VSX2 (Visual system homeobox 2; anciennement Chx10);
- et enfin la région ventrale exprimant PAX2 qui donnera lieu à la formation du tronc optique.

Il a été démontré que l'ensemble de ces facteurs de transcription et EFTFs participent à la régionalisation de la vésicule par des actions de répression transcriptionnelle réciproques. La première interaction essentielle à la régionalisation s'opère entre VSX2 et MITF. De nombreuses études ont mis en évidence la capacité de VSX2 à réprimer l'expression de MITF notamment chez la souris (Horsford *et al.*, 2005, Nguyen *et al.*, 2000) mais aussi dans des cellules souches induites à la pluripotence humaines (Gamm, 2019) assurant un devenir cellulaire de type rétinien neural ou épithélial pigmenté. Aussi, une relation antagoniste entre *PAX6* et *PAX2* se réprimant de manière réciproque et directe assure

ainsi la délimitation entre la région de la rétine neurale et celle du pédoncule optique (Schwarz et al., 2000). Parmi les autres facteurs ayant un rôle dans la régionalisation des vésicules optiques, *LHX2* tient une place essentielle. En effet, *LHX2* semblerait jouer un rôle dans la régionalisation notamment par la régulation de signaux BMPs sécrétés par les progéniteurs rétiniens (Yun et al., 2009).

Ces gènes sous le contrôle de voies de signalisation (Agathocleous et al., 2009, Fuhrmann 2010) impliquent de multiples facteurs présents dans les tissus environnants (mésenchyme extraoculaire, nerf optique et ectoderme de surface) influençant la destinée des cellules. Ainsi la voie de signalisation Shh active l'expression *Pax2* induisant la spécification du nerf optique tout en inhibant l'expression de *Pax6* (Perron et al., 2003, Schwarz et al., 2000). En effet, les souris porteuses d'une mutation sur *Shh* présentent en plus du phénotype de cyclopie précédemment cité, un élargissement de la zone d'expression de *Pax6* au détriment de *Pax2* (Chiang et al., 1996). La voie Wnt/ β -caténine, fortement activée dans l'EPR en cours de différenciation, semble jouer un rôle prépondérant. En effet, une mutation de la β -caténine dans la vésicule optique induit une transdifférenciation des cellules de l'EPR en RPCs (Westenskow et al., 2009).

Aussi des familles des facteurs de croissances interviennent dans ce processus comme la famille des FGFs, sécrétés par l'ectoderme de surface, induisant une inhibition de MITF (Gamm et al., 2019) et donc une spécification de la rétine neurale. La famille des facteurs TGF- β sécrétés par le mésenchyme périoculaire, induisent l'expression de gènes spécifiques de l'EPR comme *WNT13* et *MMP115* (Fuhrman, 2010) et inhiberaient celle des gènes marqueurs de la rétine neurale notamment *VSX2* dans les cellules dorsales de la vésicule optique évitant ainsi la répression de *MITF*. En parallèle de cette régionalisation a lieu une invagination commune de la placode cristallinienne et de la vésicule optique aboutissant au repliement de la partie dorsale de cette dernière: la vésicule optique devient alors la cupule optique bistratifiée.

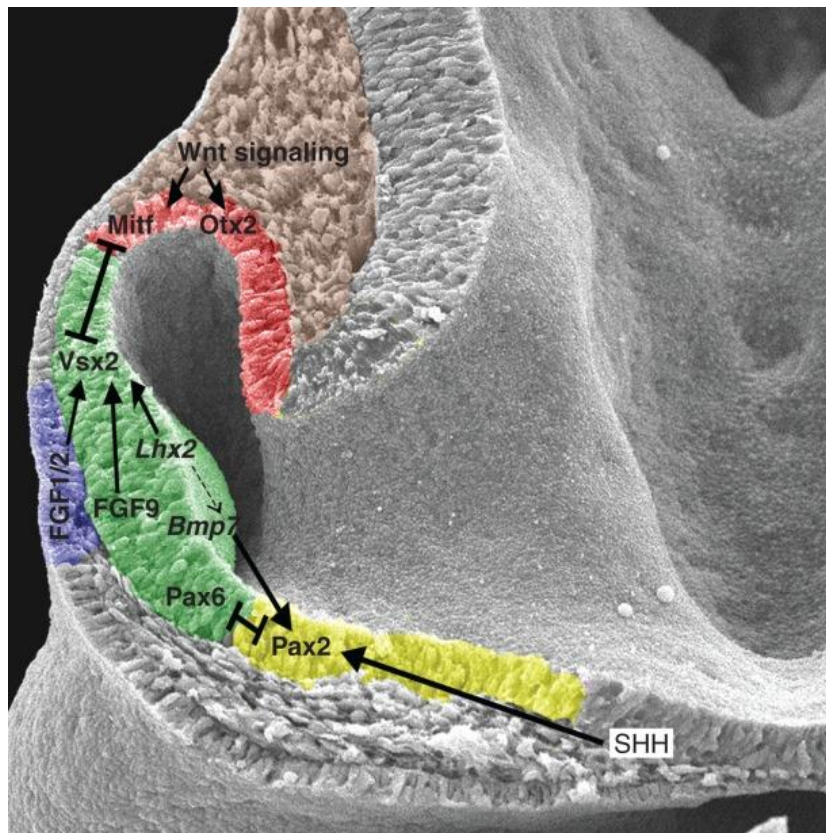


Figure 9: Les réseaux de signalisation établissant la vésicule optique. La partie dorsale est en haut, et la partie distale est à gauche. La vésicule optique se compose de 2 régions : l’ÉPR prospectif (en rouge, dorsal), la rétine neurale (en vert, central) et le pédoncule optique (en jaune, ventral). Les facteurs de transcription régionalisent la vésicule optique en se réprimant mutuellement. La placode cristalliniennne qui exprime des facteurs de croissance des fibroblastes (FGF1 et 2) importants pour la spécification de la rétine neurale, est représentée en bleu. Adapté de [Heavner et al., 2012](#).

Partie II : Les cellules progénitrices rétiniennes

1. Les progéniteurs rétiniens : acteurs clés de la rétino-génèse

A. La rétino-génèse

Il a été démontré que les cellules progénitrices rétiniennes (RPCs pour Retinal progenitor cells, en français cellules progénitrices rétiniennes) contenues dans la cupule optique en développement sont intrinsèquement multipotentes, c'est-à-dire capables de donner naissance à tous les types cellulaires rétiniens (Young 1985, Turner *et al.*, 1990, Turner et Cepko, 1987). Selon l'espèce étudiée au sein des mammifères, la rétino-génèse peut prendre plusieurs semaines à quelques mois. La rétine neurale des vertébrés est un tissu stratifié complexe et sensoriel dont la formation dépend de la synchronisation et de la coordination de multiples processus au cours du développement. En effet, elle tient compte de la génération d'un nombre et d'une proportion appropriés des différents types cellulaires et de leur organisation au sein de l'architecture laminaire classique de la rétine neurale mature. Les cellules progénitrices doivent d'abord subir des cycles de division répétés pour augmenter le nombre de cellules composant le pool de progéniteurs, avant de sortir du cycle cellulaire et s'engager vers une voie de différenciation (Dyer et Cepko, 2001a, Donovan et Dyer, 2005, pour des revues). Les RPCs doivent donc trouver un équilibre entre deux tendances opposées: tandis que certains progéniteurs doivent quitter le cycle cellulaire pour produire les premiers types cellulaires, d'autres doivent continuer à proliférer afin de produire un nombre suffisant de cellules pour générer les types cellulaires apparaissant plus tardivement. La genèse des différents types neuronaux composant la rétine s'effectue donc selon un ordre précis (Young 1985, Holt *et al.*, 1988) (Figure 10). Une première vague de différenciation laisse émerger les cellules ganglionnaires suivies en phases partiellement chevauchantes par les cellules amacrines, les photorécepteurs à cônes et les cellules horizontales tandis que les photorécepteurs à bâtonnets, les cellules bipolaires et les cellules gliales de Müller apparaissent en dernier.

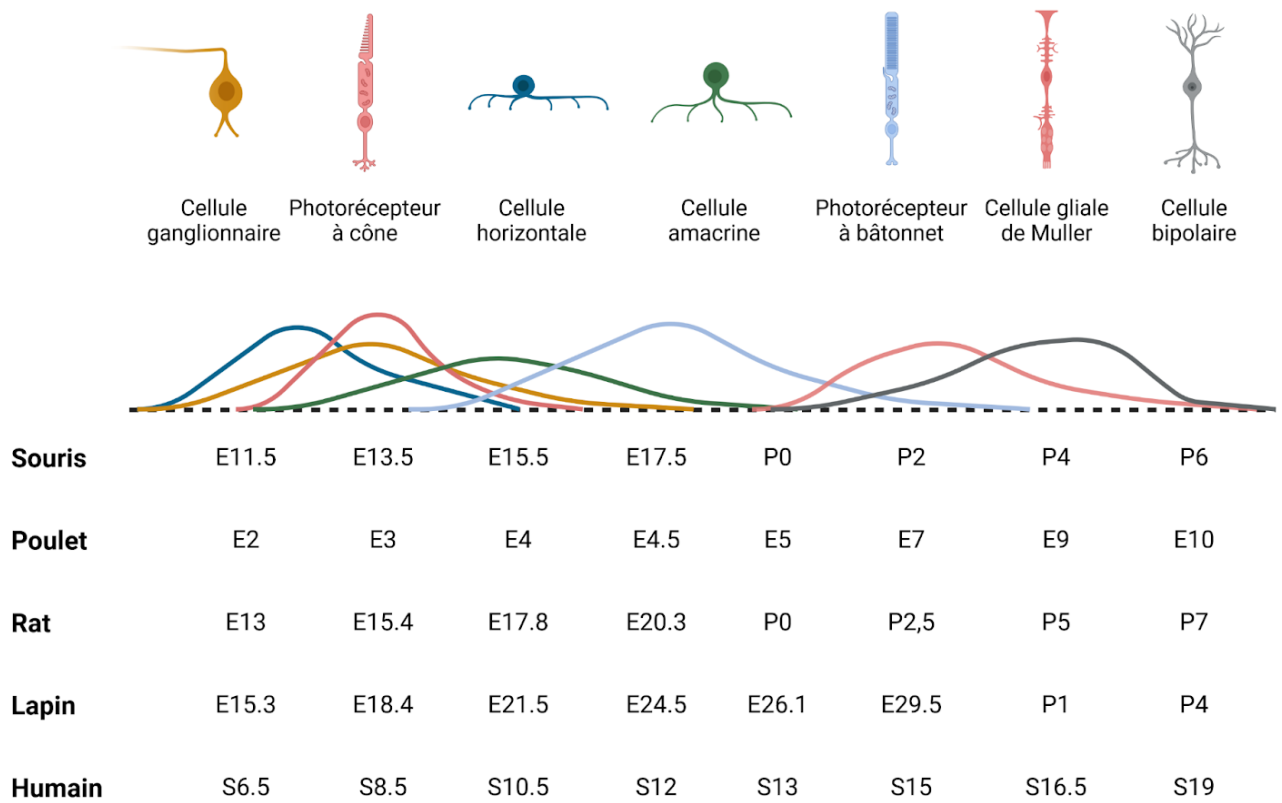


Figure 10: Ordre de naissance des différents types cellulaires rétiniens au cours de l'évolution chez divers modèles. La genèse des différents types neuronaux composant la rétine s'effectue selon un ordre précis. Ce processus est hautement conservé au cours de l'évolution à travers les différentes espèces. Adapté de [Martins et al., 2008](#).

Une question fascinante et encore aujourd'hui étudiée est de savoir comment cette diversité cellulaire est générée au cours du développement. Comment les cellules progénitrices arrivent-elles à se multiplier tout en sortant du cycle cellulaire au moment adéquat? Comment les phénomènes de division et de différenciation sont-ils coordonnés? Comment un progéniteur choisit-il son destin cellulaire?

B. Multipotence et modèles de compétence

a. Multipotence des RPCs

L'une des premières questions concernant les progéniteurs rétiniens se porte sur leur capacité de multipotence. Les études de lignage cellulaire sont d'une importance primordiale dans la compréhension du développement et de la régénération des tissus. En permettant de suivre une cellule et toute sa descendance, cette approche fournit des informations cruciales notamment sur le potentiel des cellules souches. Ainsi, diverses études de suivi de lignage des cellules entreprises ont été entreprises pour étudier les clones de cellules générés à partir des RPCs (Holt *et al.*, 1988, Turner et Cepko 1987, Fekete *et al.*, 1994, Reese *et al.*, 1999, Turner *et al.*, 1990). Les clones issus des RPCs se divisant à des stades particuliers du développement de la rétine ont été marqués à l'aide de multiples méthodes comme la transduction par des rétrovirus, l'injection de traceurs intracellulaires ou encore l'utilisation de marqueurs génétiques. En 1987, Turner et Cepko ont pu démontrer, par une étude de transduction virale dans une rétine postnatale de rat, que la multipotence des RPCs était maintenue tout au long du développement de la rétine. En effet, il a été montré que les clones cellulaires issus d'une RPC initiale étaient variables en termes de nombre de cellules mais aussi de leur composition en différents types cellulaires rétiniens (photorécepteurs à bâtonnets, cellules bipolaires, cellules gliales de Müller et cellules amacrines) (Turner et Cepko, 1987) confirmant l'existence d'un progéniteur commun pour les types cellulaires générés. Cette étude suggérant que la détermination du type cellulaire dans la rétine postnatale du rat est indépendante du lignage a été confirmée par la même équipe cette fois-ci dans des rétines d'embryons de souris. Ces études visant à suivre le devenir des RPCs précoces ont pu démontrer la multipotence de ces cellules, écartant alors l'hypothèse que la population de RPCs est hétérogène (c'est-à-dire qu'il existe différents pools de progéniteurs destinés à générer certains sous-types cellulaires). Une hypothèse qui en découle de ces travaux est que le destin cellulaire de cette population homogène de RPCs est contrôlé par des signaux extrinsèques de leur environnement.

b. Facteurs extrinsèques impliqués dans la rétino-génèse

Un des modèles expliquant la détermination du destin cellulaire des RPCs repose sur l'hypothèse que toutes les RPCs sont équivalentes en tout temps, capables de produire tous les types cellulaires rétiniens et où des signaux extrinsèques détermineraient leur devenir cellulaire. Dans ce modèle, les facteurs extrinsèques guident localement à eux seuls les RPCs, agissent de manière non autonome et correspondent à des molécules sécrétées de diverses natures incluant principalement des facteurs de croissance (Lawrence *et al.*, 1996). La communauté scientifique s'est alors attardée à tester l'influence de nombreux facteurs extrinsèques dans le destin cellulaire des RPCs et ont montré que plusieurs facteurs de croissances incluant notamment le TGF, l'EGF, le FGF, le CNTF et d'autres (Tableau 1) ont un rôle dans la différenciation rétinienne en induisant ou inhibant certains types cellulaires de la rétine. Plusieurs autres voies de signalisation sont actives dans la rétine précoce incluant les voies Wnt, Notch et Shh.

Signaux/Facteurs	Voies de signalisation	Rôles			
		Développement	Prolifération	Différenciation	Survie/Apoptose
Wnt (<i>Wingless integration site</i>)	Frizzled-GSK3- β -caténine		<p><u>Chez le poulet :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - son activation maintient le stock de progéniteurs dans la ZMC et la surexpression de Wnt2b dans des explants rétiniens favorise la prolifération (Kubo et al., 2003) 	<p><u>Chez le poulet:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - la surexpression de Wnt2b dans des explants inhibe la différenciation neuronale (Kubo et al., 2003) - l'expression de Wnt2b permet la stratification de précurseurs en culture réagregée (Nakagawa et al., 2003) <p><u>Chez la souris :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - la perte des β-caténines entraine un défaut de stratification de la rétine (Fu et al., 2006) - Induit la croissance des neurites des cellules ganglionnaires en culture (Udeh A, Dvorianchikova G, Carmy T, Ivanov D, & Hackam AS ,2019). 	
Famille Hedgehog	Patched-Smoothened-Gli SHH : Sonic Hedgehog IHH :Indian Hedgehog	Le gradient dorso-ventral SHH participe à la formation du patron tissulaire de la cupule optique (Yang et al., 2004)	<p><u>Chez la souris :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - l'activation de la voie Hedgehog induit la prolifération des progéniteurs (Moshiri et Reh 2004) - son activation favorise la sortie du cycle cellulaire (Agathocleous et al., 2007) 	<p><u>Chez le poisson zèbre :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Shh produit par les cellules ganglionnaires induit une vague de neurogénèse du centre vers la périphérie (Yang et al., 2004, Neumann et al., 2000) <p><u>Chez le rat :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Shh favorise la différenciation des photorécepteurs (Levine, 2000) <p><u>Chez la poule :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Shh inhibe la différenciation des cellules ganglionnaires (Yang et al., 2004) 	

			<ul style="list-style-type: none"> - Shh secrété par les CGs favorise la prolifération des progéniteurs - Si absence du récepteur Smo, la prolifération des RPCs est affecté (Sakagami et al., 2009) 	<p><u>Chez la souris :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - En absence du récepteur Smo, existe une production en excès de CGs (Sakagami et al., 2009) 	
Delta-Notch	Delta-Notch-Hes-Groucho	<p><u>Chez la souris :</u></p> <p>L'activation de la voie Notch dans les cellules gliales de Muller active la régénération en poussant ces cellules à se dédifférencier en RPC (Jadhav et al., 2009)</p>	L'inhibition latérale de la différenciation neuronale par les cellules ganglionnaires maintient la prolifération des progéniteurs et favorise la gliogénèse (Perron et Harris 2000).		
FGF1 et 2 <i>(Fibroblast Growth Factor 1 et 2)</i>	Voies de signalisation des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK)	FGF produit par l'ectoderme de surface, intervient dans la spécialisation de la rétine neurale par rapport à l'EPR (Yang et al., 2004)	<ul style="list-style-type: none"> - Favorise la neurogénèse, la prolifération et participe à la gliogénèse (Lillien et cepko 1992, Esteve et bovolenta 2006) - Stimule la différenciation des photorécepteurs dans des cultures de précurseurs rétiniens d'embryon de poulet (Tcheng et al., 1994) ou de rat nouveau-né (Hicks et courtois 1992) 	<p><u>Chez le poisson zèbre :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - l'expression d'une forme dominant négative du récepteur FGF1 entraine une dégénérescence des photorécepteurs (Hochman et al., 2012) 	

<p>EGF (<i>Epidermal growth factor</i>) et TGF-α (<i>Transforming growth factor α</i>)</p>	<p>Récepteurs de l'EGF, voies de signalisation RTK</p>		<p><u>Chez le poulet et chez l'homme :</u> - EGF stimule la prolifération des cellules souches de la marge ciliaire (Fisher et Reh 2000) <u>Chez le rat :</u> - TGFα favorise la prolifération des RPCs <i>in vitro</i> (Lillien et cepko 1992)</p>	<p><u>Chez le rat :</u> - La surexpression du récepteur à l'EGF diminue la différenciation des bâtonnets au profit des cellules gliales <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> (Lillien et al., 1995) - TGFα favorise la gliogénèse <i>in vitro</i> (Lillien et Cepko 1992).</p>	
<p>VEGF (<i>Vascular endothelial Growth Factor</i>)</p>	<p>Voies de signalisation des RTK</p>		<p>VEGF produit par les cellules ganglionnaires favorise la prolifération des RPCs (Hashimoto et al., 2006)</p>	<p>VEGF inhibe la différenciation des cellules ganglionnaires (Hashimoto 2006)</p>	
<p>GDNF (<i>Glial-cell-line-Derived Neurotrophic Factor</i>)</p>	<p>Voies de signalisation RTK, récepteur Ret et corécepteur GFRα1</p>			<p><u>Chez le poulet :</u> - GDNF favorise la différenciation des photorécepteurs à bâtonnets dans des culture de précurseurs de photorécepteurs réagregés (rétinosphéroides) (Rothermel et Layer 2003).</p>	<p>-</p>
<p>Famille: Insuline et IGF1-2 (<i>Insuline-like Growth factor 1-2</i>)</p>	<p>Voies de signalisation des récepteurs insuline IR</p>			<p><u>Chez le poulet :</u> - IGF1 favorise la neurogénèse rétinienne (Frade et al., 1996) - IGF1 et IGF2 jouent un rôle de stimulateur autocrine/paracrine dans la neurogénèse (Hernandez-Sanchez, 1995)</p>	<p><u>Chez le poulet :</u> - IGF1 exerce une action anti-apoptotique (Diaz, 2000)</p>

				<ul style="list-style-type: none"> - Insuline et FGF2 stimulent la dédifférenciation des cellules gliales, leur prolifération et la génération de nouveaux neurones (Fisher et al., 2002) <p><u>Chez le poisson :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Les IGF produits par les photorécepteurs à cônes favorisent la différenciation des photorécepteurs à bâtonnets (Zygar et al., 2005) 	
<p style="text-align: center;">TGFβ (<i>Transforming growth factor β</i>), BMP (<i>Bone Morphogenetic Protein</i>), Activine</p>	<p style="text-align: center;">Voie de signalisation Smad</p>	<p>Un gradient dorso-ventral de BMP participe à la morphogénèse de la cupule optique (Yang, 2004)</p>	<p><u>Chez le rat :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - TGFβ inhibe la prolifération des RPCs (Close et al., 2005) <p><u>Chez la souris :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - BMP favorise la prolifération des RPCs (Murali et al., 2005) 	<p><u>Chez la souris :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - BMP favorise la neurogénèse (Murali et al 2005) <p><u>Chez la poule :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - L'activine A inhibe la différenciation des photorécepteurs et favorise la différenciation des cellules amacrines dans des cultures de précurseurs rétiniens E7 (Belecky-Adams et al., 1999) <p><u>Chez le rat :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - L'activine A favorise la différenciation des photorécepteurs à bâtonnets dans de cultures de précurseurs rétiniens E18 (Yang et al., 2004) 	<p><u>Chez la poule :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - TGFβ favorise l'apoptose (Yang 2004) <p><u>Chez la souris :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - L'apoptose des cellules rétiniennes est inhibée par BMP (Yang, 2004)
<p style="text-align: center;">CNTF (<i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>)</p>	<p style="text-align: center;">Voie de signalisation Jak-STAT</p>			<p><u>Chez le poulet :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - CNTF stimule la production de photorécepteurs à cônes verts <i>in vitro</i> (Fuhrmann et al., 1995, Xie et Adler 2000) <p><u>Chez le rat :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - CNTF inhibe la différenciation des photorécepteurs à bâtonnets <i>in vitro</i> 	-

				<p>(Ezzeddine et al., 1997, Kirsh 1998, Schulz-Key 2002, Rhee et al., 2004)</p> <ul style="list-style-type: none">- CNTF oriente les RPCs vers un phénotype bipolaire <i>in vivo</i> (Morrow et al., 1998) <p><u>Chez la souris :</u></p> <ul style="list-style-type: none">- CNTF favorise la différenciation des cellules gliales de Muller à partir du pool de progéniteurs rétiniens postnatals (Goureau et al., 2004) .	
--	--	--	--	---	--

Tableau 1 : Facteurs extrinsèques impliqués dans la rétino-génèse.

La détermination précise de leurs effets est compliquée pour plusieurs raisons. Premièrement, les effets de ces facteurs dépendent du timing auxquels ils sont sécrétés. Deuxièmement, il a été observé des effets opposés selon l'espèce étudiée. Nous pouvons prendre l'exemple du CNTF. Des études ont montré qu'un traitement par du CNTF sur des RPCs post-mitotiques engagés dans la voie des photorécepteurs pouvaient être ré-orientées vers un autre type cellulaire: celui des cellules bipolaires (Ezzedine et al., 1997, Bhattacharya et al., 2004) démontrant une certaine plasticité des RPCs. Cependant, chez le poulet, il semblerait que le CNTF active l'expression des marqueurs des photorécepteurs à cônes (Fuhrmann et al., 1995) tandis que celui-ci inhibe la différenciation des photorécepteurs à bâtonnets chez la souris (Ezzedine et al., 1997) mais aussi chez le rat (Schulz-Key et al., 2002).

Par la suite, des travaux ont mis en évidence que l'environnement et les facteurs extrinsèques qu'il implique ont une influence limitée sur le destin cellulaire des RPCs. En 1989, Reh et Kljavin ont montré *in vitro* que les progéniteurs rétiniens isolés de rétines de rats se différencient en divers types cellulaires rétiniens selon l'âge des animaux auquel la rétine a été prélevée et dissociée. En effet, les progéniteurs dits précoces (prélevés et isolés à E14) ne se différencient qu'en cellules « précoces », comme les cellules ganglionnaires et ne se différencient jamais en photorécepteurs à bâtonnets, alors que les progéniteurs dits tardifs (prélevés et isolés au premier jour postnatal) ne se différencient qu'en cellules « tardives », comme les photorécepteurs à bâtonnets et pas en cellules ganglionnaires (Reh et Kljavin, 1989). D'autres expériences significatives ont confirmé la limite du modèle extrinsèque. Il a été observé que des progéniteurs précoces cultivés dans un environnement tardif ne se différencient qu'en types cellulaires précoces et inversement des progéniteurs tardifs cultivés dans un environnement précoce ne génèrent que des types cellulaires tardifs (Belliveau et al., 1999 Belliveau et al., 2000) invalidant définitivement l'hypothèse que seul l'environnement a un impact sur le destin cellulaire des RPCs. Ces résultats ont abouti à la proposition d'un autre modèle: le « modèle de compétence » où les RPCs passeraient par différents « états de compétence » au cours du temps.

c. Modèle de compétence et facteurs intrinsèques

Les travaux précédemment cités ont contribué à l'émergence d'un nouveau modèle dit de « transition de compétence » dans lequel les RPCs passeraient de manière progressive par différentes stades ou états de compétence au cours de la rétinogénèse limitant à certains temps la capacité de différenciation des RPCs à certains sous-types cellulaires (Cepko et al., 1996, Cepko et al., 1999). Dans ce modèle, la série temporelle d'états de compétence est définie par des facteurs intrinsèques minimisant ainsi l'impact des facteurs extrinsèques qui ne permettent que de contrôler la proportion de cellules produites au même moment par des RPCs d'un même état (Figure 11).

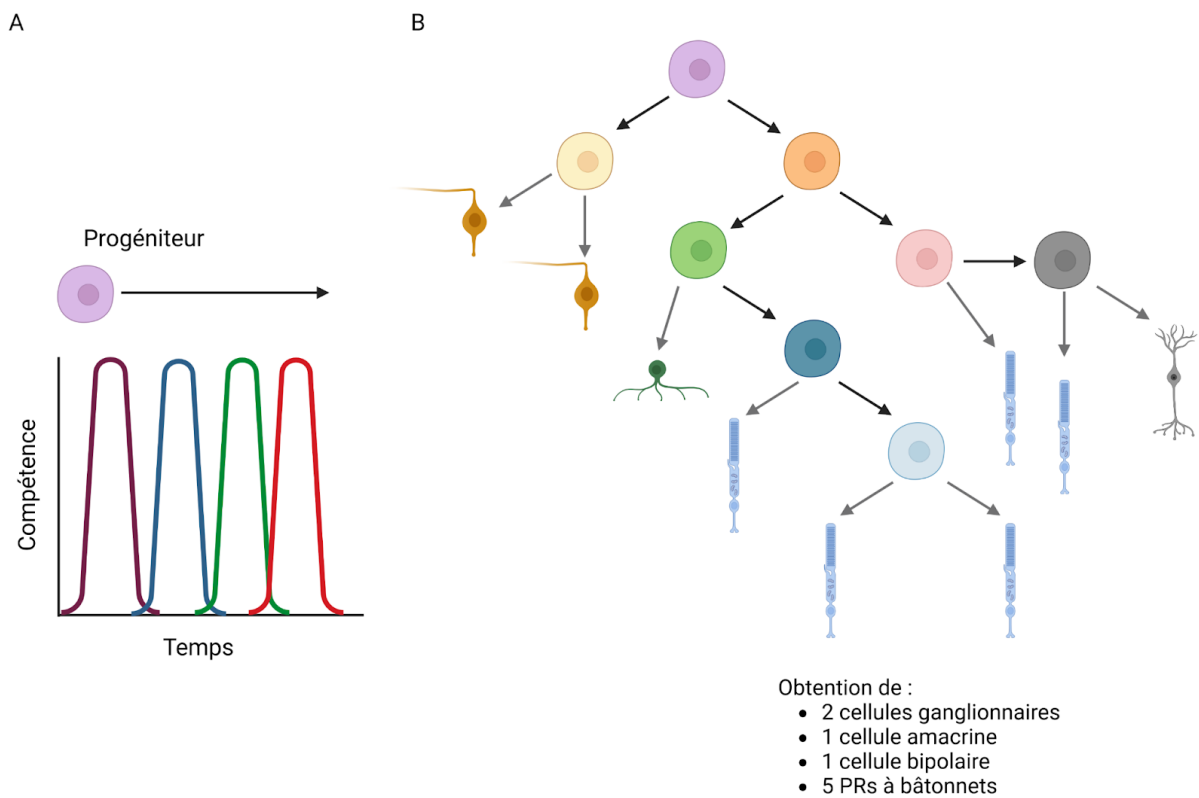


Figure 11: Le modèle de compétence. (A) Un progéniteur passe par différents états de compétences au cours desquels il n'est capable de générer qu'un sous-ensemble de types cellulaires rétiniens post-mitotiques. (B) Exemple d'un lignage construit sur la base de ce modèle. Les différentes couleurs montrent un état de compétence différent au cours du développement. Adapté de Livesey et Cepko, 2001.

Les facteurs de transcriptions ont un rôle prépondérant dans le destin des RPCs mais aussi le maintien de l'identité des cellules rétiniennes différenciées. La communauté scientifique s'est attardée sur l'étude d'un grand nombre de facteurs de transcription potentiellement impliqués dans la rétino-génèse (Cepko 2014, Basset et Wallace 2012, Shiao et al., 2021, Zagozewski et al., 2014). Toutefois, la majorité des facteurs intrinsèques ayant été identifiés ne sont exprimés qu'après la sortie du cycle cellulaire des RPCs, donc dans des progéniteurs post-mitotiques déjà engagés vers un destin cellulaire défini; ces facteurs intrinsèques n'induisent pas le passage d'un état de compétence à un autre. Plus récemment, l'identification de facteurs appelés « facteurs d'identité temporelle » (en anglais TIFs pour *temporal identity factors*) a grandement contribué à améliorer notre compréhension des phénomènes régissant la rétino-génèse. Ces facteurs contrôlent les états de compétence des RPCs afin de garantir leur passage d'un état à l'autre et ainsi assurer que chaque type cellulaire soit produit au bon moment (Pedro et al., 2022). Mais en quoi les TIFs diffèrent-ils des facteurs de transcription classiques impliqués dans le destin cellulaire des RPCs? Les TIFs ne favorisent pas la production de types cellulaires spécifiques, mais sont plutôt nécessaires et suffisants pour conférer la compétence à une RPC de générer un type cellulaire ou une combinaison de types cellulaires définis durant une fenêtre temporelle au cours de laquelle ils sont exprimés (Figure 12) .

L'activation et la répression séquentielles des différents TIFs permettent alors aux RPCs de modifier au cours du temps leur réponse aux signaux (intrinsèques et extrinsèques) déterminant leur destin cellulaire, expliquant ainsi la conservation de l'ordre chronologique de la naissance des cellules rétiniennes. Les TIFs identifiés à ce jour sont répertoriés dans le tableau 2. L'identification des facteurs intrinsèques et des TIFs a notamment été permise par l'amélioration des techniques d'analyse transcriptomique dont celles à l'échelle cellulaire (*Single cell RNA-sequencing*). En effet, de nombreuses analyses ont révélé une grande diversité au sein de RPCs de même stade qui serait liée aux différents états de compétence des cellules (Clark et al., 2019, Shiao et al., 2019, Sridhar et al., 2020, Mao et al., 2019).

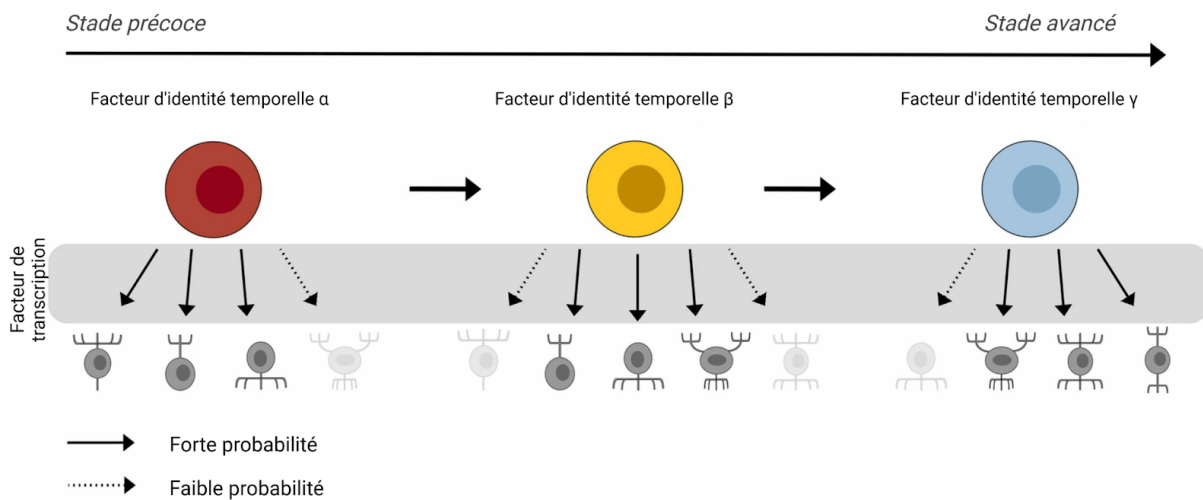


Figure 12: Facteurs d'identité temporelle et facteurs de transcription déterminants du destin cellulaire. Au cours du développement, les RPCs passent à travers différents états au cours desquels ils acquièrent la compétence de générer certains types cellulaires. Ce schéma illustre les facteurs d'identité temporelle (TIFs) qui orientent les progéniteurs vers la production de types cellulaires produits pendant leur fenêtre d'expression, tandis que les facteurs de transcription déterminants du destin cellulaire agissent en aval pour promouvoir les types cellulaires spécifiques possibles durant cette fenêtre temporelle. Adapté de [Pedro et al., 2022](#).

TIF	Temps	Fonctions		Références
		Gain de fonction	Perte de fonction	
Ikaros (Ikzf1)	Précoce	Induit la génération des cellules ganglionnaires , cellules amacrines et horizontales quand exprimés dans les RPCs dits « tardifs »	Inhibe la génération des cellule ganglionnaires , cellules amacrines et horizontales	Mattar et al., 2015 J. Elliot et al., 2008
Pou2f1/2	Précoce	Induit la génération des photorécepteurs à cônes, réprime destin cellulaire des photorécepteurs à bâtonnets, cellules bipolaires et de Muller	Inhibe la génération des photorécepteurs à cônes et des cellules horizontales	Oravecz et al., 2015
Onecut ½	Précoce	Induit la génération des cellules ganglionnaires, cellules horizontales, amacrines et photorecepteurs à cônes	Un double knock-out induit une absence de cellules horizontales et inhibe cellules ganglionnaires, potentialisent les cellules amacrines	F. Wu et al., 2013
FoxN4	Précoce/Intermédiaire	Induit la génération des photorécepteurs, cellules amacrines, horizontales. Inhibe celle des cellules ganglionnaires	Retarde la génération des photorécepteurs dans les stades précoces	L. Klimova et al., 2015 A. Sagner et al., 2021

miRNAs (Let-7/mi-125/mi-9)	Tardif	Les miRNAs inhibe la production des cellules ganglionnaires et assure la transition précoce/tardif	Un Knockout à des stades embryonnaires augmente les types cellulaires précoces. Un knock out à P1 induit une augmentation des cellule ganglionnaires	Vlark et al., 2019 Decembrini et al., 2008
Nfia/b/x	Tardif	Induit la génération des photorécepteurs à bâtonnets, cellules bipolaires, gliales de Muller et réduit le nombre de cellules ganglionnaires	Inhibe la génération des photorécepteurs à bâtonnets, cellules gliales de Muller, absence de cellules bipolaires, augmente les RPCs tardifs	H. Boije, 2014 R.B. Li et al., 2004
Cas1	Tardif	Induit la génération de photorécepteurs à bâtonnets et cellules bipolaires, réprime destin des cellules horizontales, amacrines, photorécepteurs à cônes et cellules gliales de Muller	Réduit le nombre de photorécepteurs à bâtonnets, augmente celui des cellules gliales de Muller, cellules horizontales et photorécepteurs à cônes	Kd Tran et al., 2008 P.Mattar et al., 2018

Tableau 2: Facteurs d'identité temporelle durant la rétino-génèse. Adapté de [Pedro et al., 2022](#).

d. Stochasticité

Les RPCs à un même état de compétence constituent une population hétérogène comme précédemment vu. En découle une autre hypothèse qui serait que le devenir des RPCs serait induit par des phénomènes stochastiques. Cette hypothèse a été illustrée par diverses expériences de traçage cellulaire corrélées à des modélisations mathématiques prédictives. Gomes *et al.*, ont développé un système de culture de RPCs de rats permettant de suivre le devenir des différents clones par vidéo microscopie. Dans cette étude, les auteurs se sont attardés sur les modes de division des cellules. Trois modes de division cellulaire sont possibles. Dans le premier mode, appelé « Progéniteur/Progéniteur » (Pr/Pr), la cellule progénitrice donne naissance à une paire de progéniteurs, ce qui entraîne une expansion de la population de RPCs. Dans le deuxième mode, « Progéniteur/Différenciée », elle donne naissance à un progéniteur et une cellule fille qui sort du cycle cellulaire (une cellule différenciée). Dans le troisième mode, il donne naissance à deux cellules filles différenciées, « Différenciée/Différenciée » (Figure 13-A). Ils mettent également en évidence que le choix de division est aléatoire avec une probabilité fixe de poursuivre un des modes. Aussi, cette expérience affirme que la probabilité de générer un type cellulaire particulier serait la même que la fréquence à laquelle est retrouvé ce même type cellulaire dans la rétine humaine. Par exemple, dans la rétine humaine nous retrouvons un nombre plus important de photorécepteurs à bâtonnets que de cellules horizontales; alors la probabilité d'obtenir des cellules à bâtonnets est plus grande (Figure 13-B) (Gomes *et al.*, 2011). Cependant, selon les auteurs, ce modèle ne permet pas d'expliquer l'ordre d'apparition séquentielle des cellules au cours du développement. L'étude de He *et al.*, l'année suivante a démontré au contraire que la probabilité de chaque mode de division n'est pas fixe au cours du temps. En effet, au cours du temps et des mitoses, les progéniteurs ont tendance à passer du mode Pr/Pr initialement majoritaire au mode Pr/D et enfin à celui D/D. Aussi, les auteurs émettent un lien entre le mode de division et le type cellulaire produit: selon l'étude, la plupart des cellules ganglionnaires seraient issues de division en mode Pr/D; les cellules amacrine des modes Pr/D ou D/D; et les cellules horizontales, photoréceptrices et bipolaires issues du mode de division D/D permettant alors d'expliquer l'ordre d'apparition des cellules au cours de la rétino-génèse (He *et al.*, 2012). L'ensemble de ces études a conduit à un modèle actuel hybride où il existe un lignage cellulaire prédéterminé mais soumis à des phénomènes stochastiques.

Pour conclure, la rétino-génèse est un processus complexe, dont l'initiation mais aussi la régulation fait intervenir une multitude de facteurs et de mécanismes dont certains n'ont pas été explicités ici comprenant la migration cellulaire, le cycle cellulaire ou encore les mécanismes épigénétiques. A ce jour, certains points restent encore non élucidés et l'étude de la rétino-génèse dans son entièreté a encore de beaux jours devant elle.

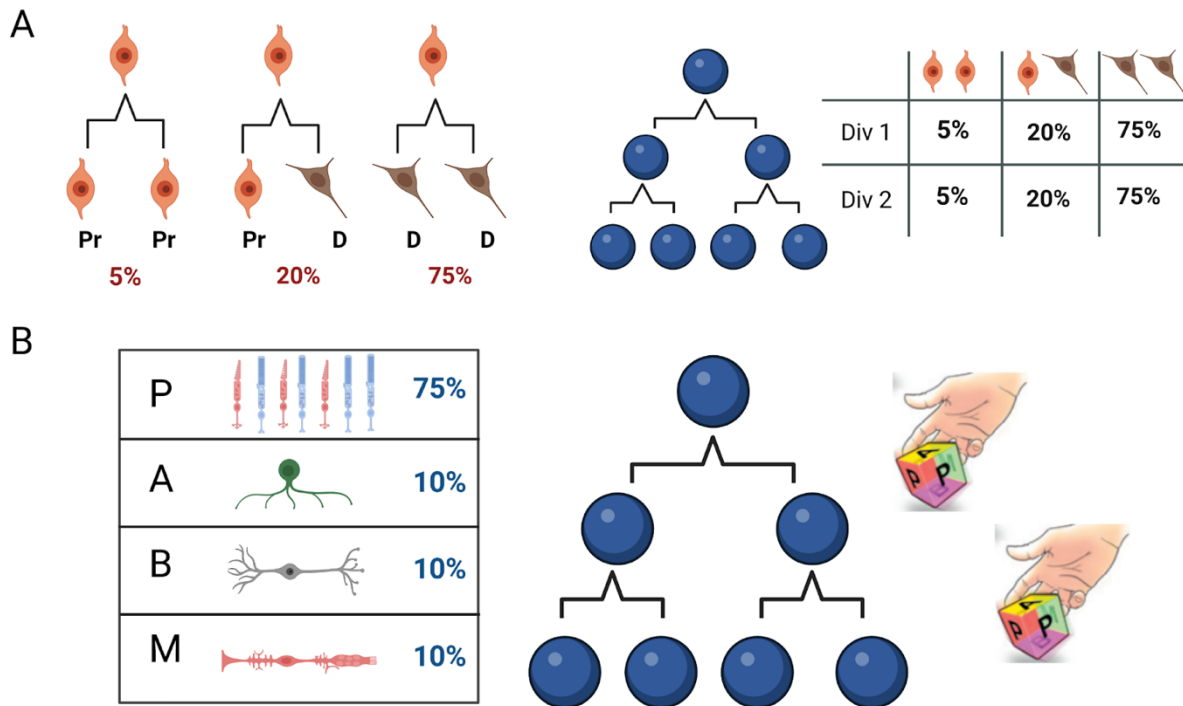


Figure 13: Reconstruction d'un lignage de progéniteurs rétiniens de rats. A) Fréquence de division aboutissant à deux progéniteurs (Pr/Pr) , un progéniteur et une cellule différenciée (Pr/D) ou deux cellules différenciées (D/D). Pour chaque division, il est observable par l'arbre de lignage sur la droite que la fréquence des différents résultats ne change pas. B) Choix du destin cellulaire en fonction de la position au sein du lignage. Le choix du destin cellulaire des cellules filles à chaque division se base sur un modèle stochastique où la probabilité d'obtenir un type de cellule donné est la même que la fréquence à laquelle on retrouve ce type cellulaire dans la rétine. Ainsi, à chaque division à laquelle une cellule fille se différencie, le choix du photorécepteur (P) est plus élevé (comme l'indique la pondération inégale des dés en faveur du choix 'P') par rapport aux autres destins cellulaires (A, amacrine ; B, bipolaire ; et M, Muller). Adapté de [Basset et Wallace, 2012](#).

2. Sources , utilisations et enjeux actuels des progéniteurs rétiniens pour des applications thérapeutiques

Les cellules souches multipotentes existent principalement à l'état embryonnaire et sont présentes à l'état adulte que dans certaines régions du système nerveux central. A ce jour, certaines populations de cellules multipotentes dans la rétine mature ont été identifiées comprenant: les cellules de la zone marginale ciliaire (ZMC) au niveau de la pars plana et la pars plicata, les cellules de l'EPR et les cellules gliales de Muller (Troppe et al., 2000, I. Ahmad et al., 2000). Chez les vertébrés non-mammaliens, ces types cellulaires participent à la croissance et à la régénération de la rétine. En effet, elles démontrent leur capacité à proliférer, à se différencier (ZMC) ou à réintégrer le cycle cellulaire pour être reprogrammées en neurones (cellules l'EPR et les cellules gliales de Muller) *in vivo* (Reh et Levine, 1998, Wetts et al., 1989, Perron et al., 1998). Chez les mammifères et les humains, la capacité proliférative est très limitée ce qui restreint leur potentielle utilisation pour des applications thérapeutiques. L'autre alternative a été donc d'isoler des cellules souches progénitrices rétiniennes issues de diverses sources qui garderaient leur potentiel prolifératif et multipotent *in vitro*.

A. Sources actuelles

Les propriétés spécifiques des progéniteurs rétiniens incluant leurs capacités de prolifération et de différenciation font de ces cellules une source attractive et prometteuse notamment pour la médecine dite « régénérative » afin de traiter les dystrophies rétiniennes. Depuis de nombreuses années, la communauté scientifique s'est concentrée sur l'obtention des RPCs non humaines et humaines (Figure 14).

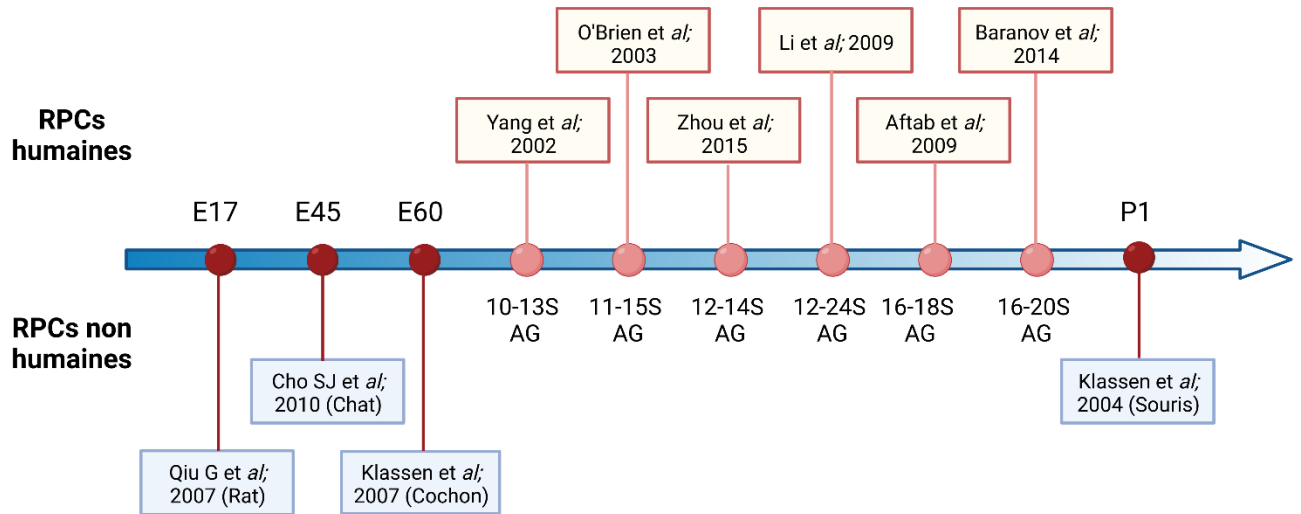


Figure 14: Les différentes périodes pour l'isolation et la culture de RPCs humaines et non humaines. (E, Embryonnaire; P, jour postnatal; A.G, âge gestationnel). Adapté de [Tang et al., 2017](#).

a. Sources non humaines

Des progéniteurs rétiniens ont été isolés à partir de diverses sources animales à différentes périodes gestationnelles ou postnatales (**Figure 14**). Des RPCs de rats ont été isolées à E17 et cultivées dans un milieu spécifique sans sérum et supplémenté d'EGF et de FGF2 basique (Qiu et al., 2004). Afin de tester leur potentiel de différenciation, elles ont été cultivées par la suite dans un milieu avec du sérum fœtal bovin et de l'acide rétinoïque (Qiu et al., 2005). Il a été démontré que les cellules en différenciation ont exprimé *in vitro* des marqueurs matures de la rétine neurale incluant celui de la protéine kinase C α (PKC), du neurofilament 200 (NF200), la protéine de liaison au rétinaldéhyde 1 (RLBP1) et de la rhodopsine (Qiu et al., 2007). Dans les travaux de Klassen et al., des RPCs ont été isolées de souris transgénique C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) au premier jour postnatal. Par la suite, elles ont été transplantées dans des souris rd (ayant un déficit en photorécepteurs à bâtonnets) et des souris invalidées génétiquement pour le gène de la Rhodospine (*Rho*^{-/-}). Après transplantation, les RPCs ont été identifiées comme des cellules photoréptrices (Recoverine +, Cone Opsine + et Rhodopsine +). Dans les rétines de souris, les cellules transplantées ont migré dans la couche nucléaire externe tandis que dans les souris *Rho*^{-/-}, celles-ci migraient vers la couche nucléaire interne (Klassen et al., 2004). Il a été observé chez les souris *Rho*^{-/-} transplantées un meilleure réponse à la lumière que dans le groupe contrôle. De nombreux scientifiques se sont concentrés sur l'étude des cellules progénitrices de la souris et du rat mais ont confirmé le potentiel thérapeutique des RPCs dans des modèles animaux de plus grande taille incluant le chat (Cho et al., 2010) mais aussi le porc (Klassen et al., 2007). Les études de transplantation chez le porc ont une grande importance de par la forte similarité entre l'oeil humain et porcine en termes de physiologie, d'anatomie et de métabolisme (Liu et al., 2017, Yu S et al., 2017).

b. Sources humaines

Chez l'homme, une des principales sources de cellules progénitrices humaines reste les tissus oculaires de fœtus issus d'interruption volontaire ou médicale de grossesse. L'âge du fœtus est un critère clé pour l'obtention de progéniteurs rétiniens humains: globalement, la communauté scientifique s'accorde pour affirmer que les fœtus d'un âge de 10 à 16 semaines étaient la meilleure source pour isoler des RPCs du fait que la différenciation rétinienne est bien définie durant ce temps (Liu et al., 2017, Semo et al., 2016). Les cellules progénitrices peuvent être amplifiées *in vitro* sur plusieurs passages en maintenant leur état multipotent (Yang et al., 2002). En 1995, Kelley et al., par des analyses plus poussées sur les rétines fœtales humaines, ont démontré la capacité des cellules à répondre à des facteurs de croissances et des hormones en culture et à se différencier en cellules du lignage des photorécepteurs (Kelley et al., 1995). Depuis, la recherche de conditions de culture permettant l'amplification des RPCs *in vitro* s'est poursuivie et a abouti à la génération de nombreux protocoles

d'isolation et expansion à partir de sources fœtales (Yang *et al.*, 2002, O'Brien *et al.*, 2003, Klassen *et al.*, 2004, SY Yin *et al.*, 2009, Aftab *et al.*, 2009, Baranov *et al.*, 2014, Zhou *et al.*, 2015, Semo *et al.*, 2006, Lieu Y *et al.*, 2017). D'autres sources d'origine humaine dans l'obtention de RPCs ont été exploitées incluant les sources post-mortem. L'équipe du professeur Schwartz a pu isoler des RPCs à partir de faux jumeaux à un âge gestationnel de 25 semaines décédés dans les 48 heures suivant leur naissance (Klassen *et al.*, 2004). L'isolation des RPCs peut se faire à partir de reliquats de tissus rétiniens obtenus de patients vivants ayant été opérés dans la prise en charge de pathologies rétiniennes. Dans cette optique, il a été possible d'utiliser des explants rétiniens de donneurs ayant subi une vitrectomie dans le cadre d'une prise en charge de leur décollement de la rétine rhégmato-gène. Ces explants après chirurgie sont généralement jetés et sont donc intéressants notamment par leur abondance dans les unités chirurgicales de la rétine (Too LK *et al.*, 2021). Des RPCs ont été isolées de membranes néovasculaires prélevées chez des patients atteints de rétinopathie de la prématurité de stade 4 et 5 qui aboutit à la croissance rapide et anormale des petits vaisseaux sanguins entraînant un décollement de la rétine (Ramos-Lopez *et al.*, 2004).

Du fait d'une quantité limitée de cellules progénitrices rétiniennes de départ obtenues à partir de ces tissus humains, la communauté scientifique s'est tournée vers une autre source potentielle: les cellules souches pluripotentes comprenant les cellules souches embryonnaires (ES) et les cellules souches induites à la pluripotence (cellule iPS). Plusieurs études marquantes ont été menées sur la génération des progéniteurs rétiniens à partir de cellules souches pluripotentes. Ikeda *et al.*; ont établi une méthode de différenciation de progéniteurs rétiniens à partir de cellules ES basée sur la culture flottante de corps embryoides sans l'utilisation de sérum (méthode SFEB). Des progéniteurs de la rétine neurale Pax+/Rx+ mais aussi de l'EPR Pax+/Mitf+ ont été obtenues grâce à une combinaison d'inhibiteurs de la voie Wnt (Dickkopf-1, Dkk1) et de la voie BMP/Nodal (Lefty-A) (Ikeda *et al.*, 2005). En 2006 Lamba *et al.*, ont combiné l'inhibiteur Dkk1, Noggin un antagoniste de la voie BMP et l'IGF-1 un facteur de croissance analogue à l'insuline pour la génération de cellules progénitrices rétiniens à partir de cellules ES humaines (Lamba *et al.*, 2006). D'autres équipes à partir de ces protocoles ont réussi à obtenir des progéniteurs rétiniens dérivés de cellules ES notamment par l'utilisation de divers facteurs de croissances (Meyer *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2011). Plus récemment, des RPCs ont été isolées à partir d'organoides rétiniens de 60 jours dérivés de cellules iPS. Cependant, aucune phase d'amplification *in vitro* a été entreprise; ces cellules ayant été utilisées pour une application directe de transplantation chez le cochon (Scruggs *et al.*, 2019). Bien que des études ont été entreprises pour permettre l'amplification des RPCs, celles-ci mettent en évidence une autre limite importante pour de futures applications qui est une perte de la multipotence de ces cellules (Mansergh *et al.*, 2010, Czekaj *et al.*, 2012, Ringuette *et al.*, 2014, Cicero *et al.*, 2009, Gualdoni *et al.*, 2010) En effet, au cours de leur culture, les RPCs perdent leur potentiel neurogénique (Wright *et al.*, 2015) se limitant progressivement à un destin glial (Gamm *et al.*, 2008).

B. Applications cliniques des progéniteurs rétiniens humains

Plusieurs études sur l'animal ont apporté la preuve de concept de l'utilisation des cellules progénitrices humaines d'origine fœtale ou issues de cellules souches pluripotentes dans le traitement des dystrophies rétiniennes. Aftab *et al.*, ont pu démontrer après transplantation de RPCs isolées à partir de fœtus âgés de 12 à 18 semaines dans des souris Rhodopsine^{-/-}, une migration des cellules transplantées dans la rétine hôte et une expression de la Rhodopsine (Aftab *et al.*, 2009). Li *et al.*; ont transplanté en sous-rétinien des RPCs fœtales humaines (12-24 semaines) dans des cochons nains atteints de dégénérescence rétinienne induite par la lumière. Il a été constaté qu'après 12 mois de transplantation, aucun signe de rejet du greffon n'a été détecté et les animaux ayant été greffés ont montré une amélioration fonctionnelle visuelle de par les résultats des tests d'électrorétinographie multifocale (Li *et al.*, 2009). Une prévention partielle de la détérioration de l'acuité visuelle a également été obtenue en greffant des RPCs provenant de fœtus humains de 16 semaines à des rats Royal College of Surgeons (RCS), un modèle de dégénérescence rétinienne causée par un dysfonctionnement de l'EPR (Luo *et al.*, 2014). Dans la même lignée, des RPCs obtenues à partir de fœtus âgés de 12 à 14 semaines préalablement triées par FACs selon l'expression des marqueurs de surface c-Kit⁺ et SSEA4⁻ (Stage-specific embryonic antigen 4⁻) afin d'exclure une population résiduelle de cellules souches embryonnaires du fœtus ont été transplantées dans des rats RCS. Bien qu'au cours de leur culture, les RPCs ont pu se différencier en photorécepteurs (cellules positives pour les marqueurs Otx2, Crx, rhodopsine et recoverine), en cellules ganglionnaires (Thy⁺) mais également en cellules gliales (GFAP⁺); 3 mois après transplantation seulement un petit nombre de cellules greffées (5,22±0,14%) exprimaient uniquement le marqueur recoverine (Zhou *et al.*, 2015). Qu *et al.*, ont pu quant à eux démontrer une amélioration de la fonction visuelle à plus long terme lorsque des RPCs issues de fœtus âgés de 11 à 13 semaines étaient transplantées avec des cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse humaine (Qu *et al.*, 2017). D'autres études ont été réalisées sur la transplantation de RPCs dérivées de source humaine fœtale dans divers modèles animaux (Caihui *et al.*, 2013, Semo *et al.*, 2016, Qu *et al.*, 2018). Aussi plus récemment, ont été entreprises des expériences avec des RPCs issues de cellule ES humaines (Shao *et al.*, 2017, Zou *et al.*, 2019) ou de cellules iPS humaines (Luo *et al.*, 2018, Salas *et al.*, 2021). Luo *et al.*, ont notamment mis en place une procédure chirurgicale en épitréinien afin de permettre une meilleure migration des cellules RPCs greffées dans des lapins et des macaques rhésus (Luo *et al.*, 2018). Salas *et al.*, ont évalué l'effet d'une transplantation combinée de cellules de l'EPR et de RPCs dérivées de cellules iPS humaines dans des rats RCS. Ils ont pu démontrer que 12 mois après transplantation, la transplantation combinée des deux types cellulaires permettait une meilleure conservation de la couche nucléaire externe et une meilleure réponse à la lumière comparativement aux groupes de rats ayant reçu uniquement des cellules de l'EPR ou des RPCs (Salas *et al.*, 2021). Les premières études cliniques de transplantation cellules neuro-rétiniennes fœtales humaines allogéniques (obtenues à partir de fœtus d'un âge gestationnel de 14 à 18 semaines) ont été

réalisées chez 14 patients atteints de RP par Das et *al.* Plusieurs mois après transplantation, une nouvelle sensation visuelle a été retrouvée et aucun signe d'inflammation, d'infection ou de rejet du greffon n'a été noté dans l'œil hôte (Das et *al.*, 1999). Sur la base de ces résultats encourageants, Klassen et *al.*; ont lancé en juin 2015 le premier essai clinique de phase I/IIa approuvé par la FDA (Food Drug Administration) utilisant des RPCs humaines d'origine fœtale (Clinical trial NCT02320812). Douze mois après la transplantation, des événements indésirables associés aux soins (EIAS) ont été signalés chez 21 patients et l'amélioration de la meilleure acuité visuelle corrigée moyenne variait de 8 à 14 lettres sans grande signification clinique. Ces résultats ont démontré une certaine sécurité et tolérance de la transplantation de RPCs humaines, qui doivent encore être améliorées. De ce fait, une étude ultérieure de phase IIb visant à évaluer les changements dans la fonction visuelle des patients atteints de RP après une injection unique 3 ou 6 millions de cellules progénitrices rétiniennes humaines a été entreprise (Clinical trial NCT03073733). Un essai clinique de phase III est prévu par Jcyte avec des critères d'inclusion basés sur les biomarqueurs mis en évidence au cours de la phase IIb. Similairement, un autre essai clinique de phase I/II approuvé par la FDA (Clinical trial NCT022464436) a été mené sur 21 sujets atteints de RP à des stades avancés à Boston et à Phoenix. Deux lignées de cellules progénitrices rétiniennes humaines fœtales ont été dérivées à partir de fœtus âgés de 10 à 13 semaines de gestation par la société ReNeuron. L'étude consiste en une étude d'escalade de dose dans laquelle les participants ont reçu une seule injection sous-rétinienne de cellules RPCs dans un œil afin d'évaluer la sécurité, la tolérance et l'efficacité du traitement. Bien que des résultats étaient attendus d'ici 2023, la société ReNeuron a pris récemment la décision de stopper leur essai clinique du fait de complications liées notamment à la procédure chirurgicale et une efficacité jugée comme très limitée. Enfin, Liu et *al.*, ont évalué la faisabilité et la sécurité à long terme de la transplantation de RPCs humaines chez huit patients atteints de RP à un stade avancé par injection sous-rétinienne (ChiCTR-TNRC-08000193) (Liu et *al.*, 2017). Malgré les signes d'une amélioration cliniquement significative de l'acuité visuelle notée dans cinq yeux et une augmentation de la réponse pupillaire chez trois patients entre 2 et 6 mois, celle-ci ne s'est pas poursuivie jusqu'à 12 mois.

Compte tenu des limites actuelles dans la transplantation des RPCs, outre des essais cliniques, il est nécessaire de mener à bien des études plus fondamentales pour une compréhension améliorée des mécanismes de prolifération et de différenciation des RPCs. Aussi, la communauté scientifique s'est focalisée sur la transplantation des RPCs dans le traitement de dystrophies rétiniennes aux dépens d'applications tout aussi prometteuses et moins risquées vis-à-vis des patients comme la modélisation de dystrophies rétiniennes à partir de cellules souches pluripotentes ou encore la découverte de molécules neuroprotectrices par criblage à haut débit.

Partie III : Les dystrophies rétiniennes et les approches thérapeutiques actuelles

1. Les dystrophies rétiniennes héréditaires

Les dégénérescences rétiniennes héréditaires constituent un groupe hétérogène de maladies affectant 1 personne sur 2000 (Berger *et al.*, 2010). Elles se traduisent par un dysfonctionnement des cellules de la rétine conduisant à une diminution du nombre de celles-ci entraînant la baisse progressive de la vision, voire la cécité à long terme. La rétine humaine est composée d'environ 130 millions de photorécepteurs avec 95% de photorécepteurs à bâtonnets et 5% de photorécepteurs à cônes (Sung *et al.*, 2010). La région centrale de la rétine est dominée par les photorécepteurs à cônes tandis que la périphérie possède une prédominance de photorécepteurs à bâtonnets. Selon le type prédominant de photorécepteurs affectés en premier et la région de la rétine impliquée, il est possible de distinguer les dystrophies atteignant majoritairement les photorécepteurs à bâtonnets, à cônes ou encore les deux types de photorécepteurs (Tableau 3). Cependant, de par leur clinique et leur génétique hétérogènes, plusieurs facteurs sont à prendre en considération pour un établir un bon diagnostic:

- l'identification du type cellulaire affecté: il peut être identifié par une anamnèse détaillée, un examen clinique, imagerie et test électrophysiologique;
- la distribution de l'atteinte rétinienne: elle reflète le type de cellules impliquées et peut être décrite comme centrale, péricentrale, sectorielle ou périphérique (Shintani *et al.*, 2009);
- le caractère stationnaire ou progressif: la dystrophie est caractérisée de principalement « stationnaire » si l'affection est présente à la naissance ou dès la petite enfance et tend à rester stable tout au long de la vie. Une maladie « progressive » tend à se manifester dans la première ou deuxième décennie de la vie et s'aggrave avec le temps;
- le mode de transmission: les dystrophies héréditaires rétiniennes peuvent être transmises de manière autosomique dominante, autosomique récessive, liée au chromosome X ou mitochondriale. L'hérédité digénique fait référence à la situation dans laquelle les variants responsables de la maladie sont nécessaires dans deux gènes pour que la maladie s'exprime (Michaelides *et al.*, 2016);
- et la présence ou absence d'atteintes autres qu'oculaires: on désigne de « syndromique » une maladie héréditaire rétinienne qui associera l'atteinte oculaire à l'atteinte d'autres tissus que l'œil (Chiang *et al.*, 2015).

	<i>Non syndromique</i>	<i>Syndromique</i>
<i>Dystrophies des bâtonnets-cônes</i>	<p>Dominant</p> <p>BEST1*, CA4, CRX, GUCA1B, HK1, IMPDH1, KLHL7, NR2E3, NRL, OR2W3, PRPF3, PRPF4, PRPF6, PRPF8, PRPF31, PRPH2, RDH12, RHO, ROM1, RP1, RP9, RP63, RPE65, SEMA A4, SNRNP200, SPP2, TOPORS</p> <p>Récessif</p> <p>ABCA4, ARL2BP, ARL6, BEST1*, CC2D2A, CERKL, CLRN1, CNGA1, CNGB1, C2orf71, C2orf37, CRB1, CYP4V2, DHDDS, DHX38, EMC1, EYS, FAM161A, GNPTG, GPR15, HGSNAT, IDH3B, IFT140, IFT172, IMPG2, KIAA1549, KIZ, LRAT, MAK, MERTK, MVK, NEK2, NEUROD1, NR2E3, NRL, PDE6A, PDE6B, PDE6G, PRCD, PROM1, RBP3, RDH11, RGR, RHO, RLBP1, RP1, RP16, RP22, RP29, RP32, RPE65, SAG, SLC7A14, SPATA7, TTC8, TTPA, TULP1, USH2A, ZNF408, ZNF513</p> <p>Lié à X</p> <p>OFD1, RP2, RP15, RP24, RP34, RPGR</p>	<p>Syndrome d’Usher</p> <p>(ABHD12, CDH23, CEP250, CIB2, CLRN1, DFNB31, GPR98, HARS, MYO7A, PCDH15, USH1A, USH1C, USH1E, USH1G, USH1H, USH1K, USH2A, USH2B)</p> <p>Syndrome de Bardet-Biedl</p> <p>(ARL6, BBIP1, BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS9, BBS10, BBS12, IFT27, IFT172, LZTFL1, MKKS, MKS1, NPHP1, SDCCAG8, TRIM32, TTC8, WDPCP)</p> <p>Syndrome de Joubert</p> <p>Syndrome de Loken Senior</p> <p>Maladie de Refsum</p> <p>Dyskinésie ciliaire primaire</p>

<p><i>Dystrophies des cônes-bâtonnets</i></p>	<p>Dominant</p> <p>AIPL1, BEST1*, BSMD, C1QTNF5, CORD1, CORD4, CORD17, CNG-B3, CRX, GUCA1A, GUCA1B, GUCY2D, EFEMP1, ELOVL4, FSCN2, HMCN1 HRG4, IMPG1, MCDR3, MCDR5, MDCC, PITPNM3, PROM1, PRPH2, RAX2, RCD1, RCD2, RIMS1, RP1L1, SEMA4A, TIMP3, VMD1</p> <p>Récessif</p> <p>ABCA4, ACBD5, ADAM9, CBorf37, C21orf2, CACNA2D4, CDH3, CDH23, CDHR1, CORD8, CNNM4, CNGA3, DRAM2, KCNV2, PDR6C, PDR6H, POC1B, RDH5, RLBP1, RPGRIP1, SEMA4A, TTLL5</p> <p>Lié à X</p> <p>CACNAF1, COD1, COD2, RPGR</p>	<p>Syndrome d'Alstrom</p> <p>Syndrome de Bardet-Biedl</p> <p>Hypotrichose</p> <p>Maladie infantile de Refsum</p> <p>Neurofibromatose 1</p> <p>Ataxie spinocérébrale</p>
<p><i>Dystrophies « généralisées »</i></p>	<p>Choroidéramie (lié à X)</p> <p>Atrophie giratoire (récessif)</p> <p>Amaurose congénitale de Leber (dominant/récessif)</p>	<p>Syndrome d'Alagille</p> <p>Syndrome de Joubert</p> <p>Lipofuscinose céréoïde neuronale</p> <p>Maladie de Refsum</p> <p>Syndrome de Loken senior</p>

Tableau 3: Classification des dystrophies rétiniennes héréditaires. Adapté de [Berger et al., 2010](#).

A. Dystrophies bâtonnets-cônes

Les principales dystrophies bâtonnets-cônes sont les rétinopathies pigmentaires qui peuvent être de type syndromique ou non syndromique. La rétinopathie pigmentaire (RP) représente la principale cause de cécité héréditaire dans les pays industrialisés avec une prévalence de 1 sur 3500 personnes. On estime à 40 000 le nombre de personnes atteintes de cette maladie en France et 2 millions dans le monde (Anasagasti et al., 2012). La RP fait référence à un ensemble de phénotypes pathologiques cliniquement similaires associés à des causes génétiquement hétérogènes (Verkabel et al., 2018). La RP est une affection évolutive de la rétine qui conduit progressivement à la cécité. Chez les personnes atteintes de cette maladie, les premiers signes cliniques sont des problèmes de vue quand l'intensité de la lumière est faible conduisant ainsi à une cécité nocturne et un rétrécissement progressif du champ visuel. Celui-ci induit alors une impossibilité pour les personnes atteintes de voir en haut, en bas et sur les côtés d'où l'appellation de « vision tunnel » (Figure 15). Ce phénomène est dû à la mort des photorécepteurs à bâtonnets situés en périphérie de la rétine (Athanasidou et al., 2008).

À la perte des photorécepteurs à bâtonnets s'ensuit une dégénérescence secondaire des photorécepteurs à cônes, notamment expliquée par l'absence d'un facteur trophique RdCVF (Rod-derived Cone Viability Factor), secrété normalement par les photorécepteurs à bâtonnets, et qui est essentiel pour la survie et l'intégrité des photorécepteurs à cônes (Leveillard et al., 2004). Aussi, la maladie implique généralement une dégénérescence de l'EPR, avec des groupes de pigments présents dans la rétine des patients atteints de RP, d'où le nom de la maladie. L'évolution de la RP est variable d'une personne à l'autre mais est généralement lente pouvant s'étendre sur plusieurs dizaines d'années.

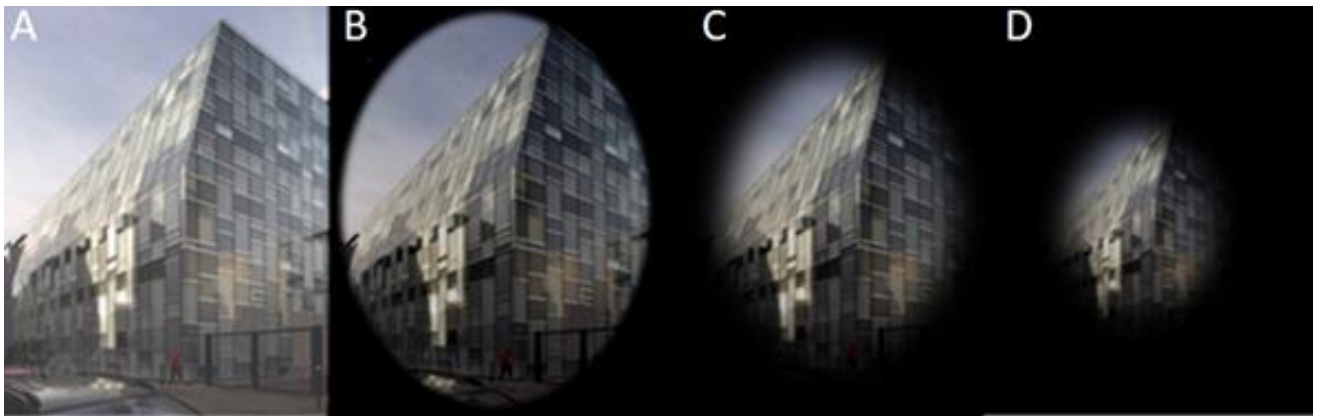


Figure 15 : Effets des rétinopathies pigmentaires sur le champ visuel. (A) Champ visuel d'un sujet sain (B-C-D) Rétrécissement progressif du champ visuel chez les personnes atteintes de RP développant une vision tunnel.

Les RP se transmettent principalement selon les modes autosomiques dominant (30-40% des RPs), récessif (50-60%) ou lié à l’X (5-15%). Il existe cependant de très rares cas de transmission mitochondriale et digénisme (3%) associés à des formes atypiques de RPs (Hartong *et al.*, 2006). L’hétérogénéité clinique des RPs est associée à une grande hétérogénéité génétique puisque des mutations dans plus de 250 gènes (<https://sph.uth.edu/retnet/>), codant pour des protéines aux fonctions cellulaires variées, ont pu être identifiées.

Les mutations altèrent pour la majorité des cas les cellules des photorécepteurs mais peuvent toucher des gènes spécifiques des cellules de l’EPR entraînant alors son dysfonctionnement. De par son implication primordiale dans le bon fonctionnement des photorécepteurs (notamment dans la phagocytose des segments externes, le recyclage des pigments visuels), une altération de l’EPR entraîne généralement la mort des cellules photoréceptrices. Concernant les mutations touchant les cellules des photorécepteurs, nous pouvons distinguer différents groupes de gènes selon la fonction et rôle biologique de la protéine codée: la phototransduction, le métabolisme rétinien, la structure cellulaire, l’épissage, le développement et la différenciation de la rétine (Berger *et al.*, 2010). Parmi les gènes impliqués dans la cascade de phototransduction, le gène de la *RHODOPSINE* est le plus fréquemment muté dans les formes autosomiques dominantes (25% des cas).

Parmi les formes syndromiques les plus fréquentes de RP, en termes de nombre de patients et gènes identifiés, on retrouve le syndrome d’Usher et le syndrome de Bardet-Biedl. Le syndrome de Usher représente la forme syndromique la plus courante transmise de manière autosomale récessive. Il peut être classé en 3 types (Tsang *et al.*, 2018):

- le type 1, étant le plus courant (70% des patients atteints du syndrome) comprenant une perte congénitale neurosensorielle auditive profonde, une absence de fonction vestibulaire et une RP. La RP apparaît alors avant l’âge de 10 ans et sa progression est lente;
- le type 2, concernant 26 % des patients, se caractérise par une surdité neurosensorielle congénitale modérée à sévère (principalement pour les hautes fréquences), une fonction vestibulaire normale et une RP qui se manifeste avant l’âge de 20 ans;
- et le type 3, représentant environ 4 % des patients, qui se caractérise par une surdité neurosensorielle progressive et une RP se manifestant au cours de la deuxième décennie. La fonction vestibulaire peut être affectée ou non.

Le syndrome de Bardet-Biedl est une autre RP syndromique qui représente 5-6% des cas de RPs, se caractérisant également 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 (Campo *et al.*, 1982).

B. Dystrophies cônes-bâtonnets

Les dystrophies cônes-bâtonnets sont plus rares que les dystrophies bâtonnets-cônes de type RP avec une prévalence de 1/40 000. Contrairement aux RP qui résultent d'une perte primaire des photorécepteurs à bâtonnets suivie d'une perte secondaire des photorécepteurs à cônes, les dystrophies cônes-bâtonnets se caractérisent par une atteinte primaire des photorécepteurs à cônes ou, parfois, par une perte concomitante des photorécepteurs à cônes et à bâtonnets, ce qui explique les symptômes prédominants des dystrophies cônes-bâtonnets : baisse de l'acuité visuelle, défauts de vision des couleurs, photo-aversion et diminution de la sensibilité dans le champ visuel central, suivis plus tard d'une perte progressive de la vision périphérique (voire d'une cécité nocturne). L'évolution clinique de ces pathologies est généralement plus grave et plus rapide que celle des RP, entraînant un handicap plus précoce. Ces dystrophies le plus souvent non syndromiques sont génétiquement hétérogènes. Les quatre principaux gènes responsables impliqués dans la pathogenèse des dystrophies cônes-bâtonnets sont *ABCA4* (qui cause la maladie de Stargardt et également 30 à 60 % des dystrophies cônes-bâtonnets autosomiques récessifs), *CRX* et *GUCY2D* (qui sont responsables de nombreux cas rapportés de dystrophies cônes-bâtonnets autosomiques dominants), et *RPGR* (qui cause environ 2/3 des RP liées à l'X et également un pourcentage indéterminé de dystrophies cônes-bâtonnet liées à l'X) (Hamel et al., 2007).

C. Dystrophies généralisées

L'amaurose congénitale de Leber (LCA) est l'une des causes les plus fréquentes de cécité chez les enfants: en effet, celle-ci est retrouvée chez environ 10 à 20% des enfants aveugles. La LCA affecte 3 personnes sur 100 000 représentant 5% des dystrophies rétiniennes et pouvant se transmettre selon les modes autosomiques récessif et dominant (Koenekoop et al., 2004). La maladie se caractérise principalement par une malvoyance sévère dès la naissance. Ainsi, les enfants atteints présentent des difficultés à fixer et à suivre du regard car ils n'ont pas ou très peu de sensibilité rétinienne aux stimuli visuels. Actuellement, plus de 26 gènes ont été identifiés comme porteurs de mutations chez les patients atteints de LCA, avec un mode de transmission héréditaire essentiellement autosomique récessif incluant des gènes de la cascade de phototransduction codant pour des canaux ioniques ou enzymes tels que *CRALBP*, *LRAT* ou encore *RPE65* (Chacon-Camacho et al., 2015).

2. Les approches thérapeutiques

Les dystrophies rétiniennes dont les RPs sont considérées encore aujourd'hui comme incurables. Toutefois, des approches multiples sont en voie de développement pour pallier à cette impasse thérapeutique. Bien que ces dystrophies soient génétiquement hétérogènes et pléiotropes et présentent un tableau clinique complexe, elles conduisent toujours à la mort des photorécepteurs et des dommages de la rétine suite à la dégénérescence de l'EPR. Le traitement le plus adapté pour les patients dépend du degré de sévérité de la maladie et donc du nombre de cellules photoréceptrices restantes (Figure 16).

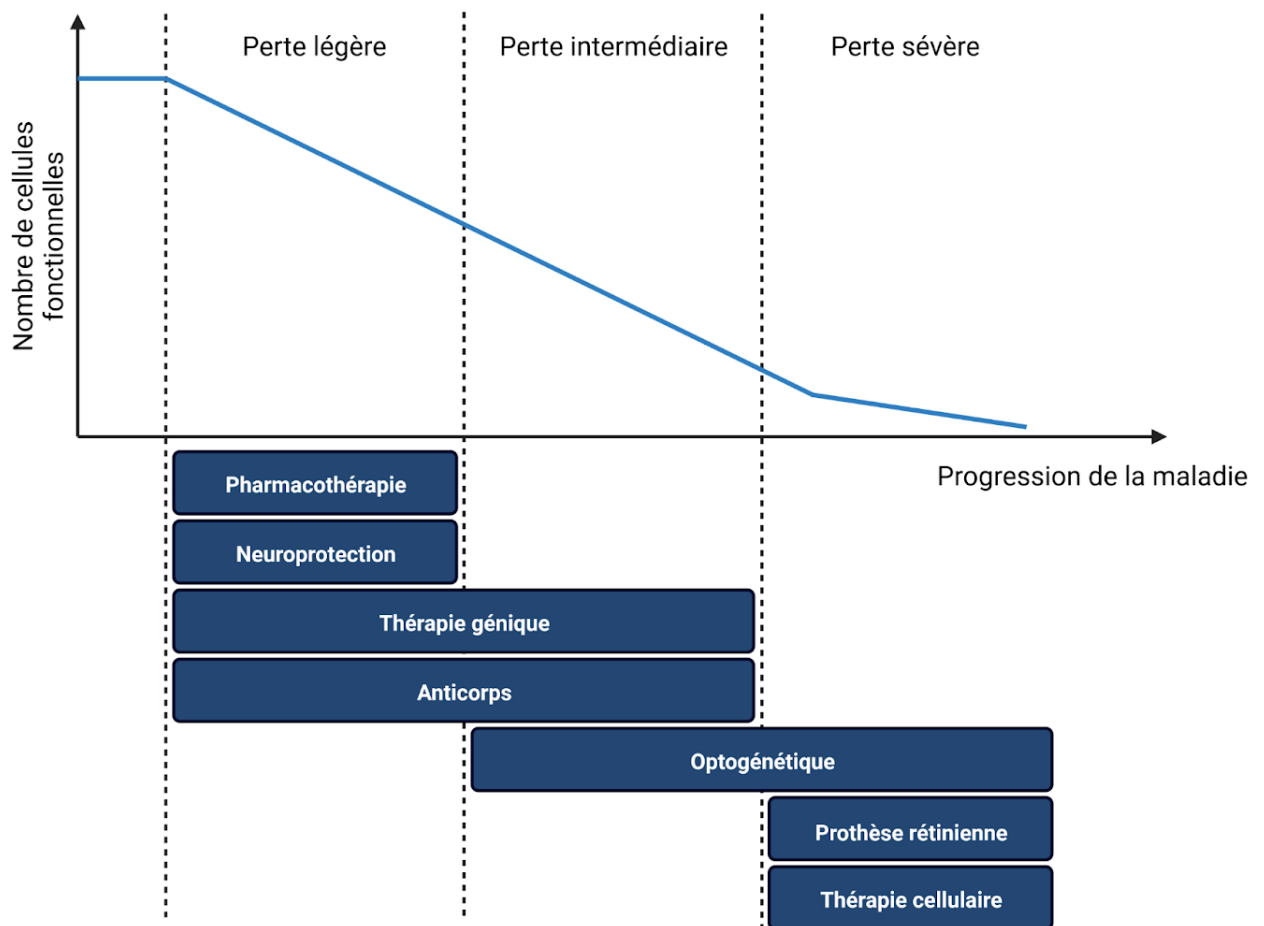


Figure 16 : Les stratégies thérapeutiques des dystrophies rétiniennes selon la progression de la maladie. Adapté de Santos-Ferreira et al., 2017.

Nous nous concentrerons sur les approches thérapeutiques pour les RPs dans le cadre de cette thèse.

A. Les thérapies par neuroprotection

La thérapie par neuroprotection est l'une des approches les plus largement utilisées, bien tolérées et présentant peu d'effets secondaires notamment dans les premiers stades de la maladie. Elle peut également servir de traitement adjuvant à des stades plus tardifs. L'intérêt de ces approches est qu'elles sont indépendantes des mutations impliquées dans la maladie d'intérêt et peuvent donc permettre de traiter un plus large panel de maladies dégénératives rétiniennes. Les agents neuroprotecteurs comprennent principalement des antioxydants, des facteurs neurotrophiques et des agents anti-apoptotiques. Concernant les approches pharmacologiques, le cis-diltiazem s'est montré efficace pour retarder la dégénérescence rétinienne chez la souris *rd1* (modèle animal pathologique de la RP) (Farber et al., 1994). Cette molécule, bloqueur des canaux calciques et/ou de canaux activés par la guanosine monophosphate cyclique 3' 5' (cGMP), permettrait non seulement de ralentir la dégénérescence des photorécepteurs à bâtonnets et des photorécepteurs à cônes chez la souris *rd1*, mais également de préserver la capacité des cellules rétiniennes à répondre aux stimuli lumineux (Frasson et al., 1999). La vitamine A a fait l'objet de la première étude clinique ayant montré un bénéfice dans les RPs à raison de 15.000 U par jour de palmitate de vitamine A par voie orale. La vitamine A est convertie en acide rétinoïque par une réaction oxydative induisant un effet trophique sur les photorécepteurs ce qui permettrait de retarder l'apparition de la RP chez les sujets ne présentant pas de symptômes ou dans les phases initiales de la maladie (Cunningham et al., 2015, Berson et al., 2010). Une supplémentation de 12 mg par jour de lutéine a également ralenti la maladie chez certains patients. D'autres molécules ont été étudiées dans le cadre du traitement de la RP telles que le 9-cis rétinol, le tartrate de brimonidine: un sympathomimétique agoniste des récepteurs α -2 adrénergiques, ou encore l'antiépileptique acide valproïque (Yamamoto et al., 2012). Bien que l'efficacité de ces thérapies ne soit pas prouvée et qu'on puisse s'attendre à ce qu'elles n'apportent qu'une légère amélioration de la vision ou un léger retard dans la progression de la RP, elles sont souvent utilisées en clinique chez les patients atteints de RP sans autre traitement disponible.

Les facteurs neurotrophiques sont de petites molécules, principalement des peptides, qui favorisent la croissance et la survie des neurones matures. L'action protectrice de différents facteurs trophiques et de survie a été démontrée par de nombreux travaux de recherche menés sur de multiples modèles animaux de dystrophies rétiniennes (Thanos et al., 2005). Parmi ces facteurs neurotrophiques, ont été étudié le facteur neurotrophique ciliaire (CNTF) (Liang et al., 2001, Huang et al., 2004, Buch et al., 2007, Delplace et al., 2019), le facteur neurotrophique dérivé de la glie (GDNF), le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) (Gupta et al., 2013) et la famille des FGFs (Hecht et al., 2012). Cependant, il est important de noter que pour que ces approches soient efficaces, elles nécessitent une libération continue de facteurs neurotrophiques. De ce fait, mais aussi du fait qu'il est impossible physiquement pour le patient de recevoir des injections répétées de facteurs neurotrophiques, des stratégies permettant l'apport du facteur d'intérêt ont vu le jour. Il est possible d'implanter dans la cavité

vitreuse des cellules modifiées programmées pour libérer de façon continue le facteur CNTF qui joue un rôle dans le développement et la survie des photorécepteurs rétiniens. Cette approche a été validée tout d'abord chez le chien (Tao *et al.*, 2002) avant le lancement de son développement clinique aux Etats-Unis par la société Neurotech (Clinical Trial NCT00447993 , Clinical trial NCT00447980). Une autre stratégie vise à faire exprimer le facteur par un type cellulaire par l'administration de gènes thérapeutiques à l'aide de virus adéno-associés (AAVs) afin d'augmenter sa production locale et prévenir la mort des photorécepteurs. En 2011, Dalkara *et al.*, ont démontré un significatif ralentissement de la dégénérescence rétinienne chez des rats atteints de RPs (TgS334-4ter) par l'administration du facteur GDNF via le recours à l'AAV ShH10, un variant viral transduisant spécifiquement les cellules gliales de Müller (Dalkara *et al.*, 2011). De la même manière, le facteur survie RdCVF, sécrété par les photorécepteurs à bâtonnets et essentiel pour la survie et l'intégrité des photorécepteurs à cônes (Leveillard *et al.*, 2004), a permis de prolonger la survie et fonction des photorécepteurs à cônes après son administration via l'utilisation d'AAVs dans des modèles de souris atteintes de RP (Byrne *et al.*, 2015 ; Dalkara *et al.*, 2016).

B. Les thérapies innovantes

Différentes approches de thérapie génique, de thérapie cellulaire et le développement de prothèses rétiniennes montrent des résultats prometteurs et ouvrent la voie à de nouvelles approches thérapeutiques pour la restauration de la vision. La majorité de ces traitements sont encore en phase de développement préclinique ou clinique.

La **thérapie génique** a pour but de modifier ou manipuler l'expression d'un gène ou d'altérer les propriétés biologiques de cellules natives, pour un usage thérapeutique. La thérapie génique est donc une technique modifiant l'expression des gènes liée à la maladie ou pas, directement au sein du tissu malade pour traiter ou guérir une maladie. Trois approches peuvent être envisagées : compenser la perte de fonction d'un gène par l'apport d'une séquence génétique normale (thérapie par remplacement ou augmentation de gène); inactiver ou corriger une altération génétique (ARN antisense ou CRISPR-Cas9) et introduire un nouveau gène permettant la synthèse d'une protéine thérapeutique. Le plus souvent, la thérapie génique s'effectue au moyen d'un vecteur viral, transportant le gène jusque dans les cellules cibles. Dans le cas des maladies monogéniques, le vecteur AAV s'est imposé progressivement comme un vecteur de choix. Son absence de pathogénicité, son large tropisme et sa capacité à transduire des cellules quiescentes sont autant d'avantages comparés à d'autres vecteurs utilisés en thérapie génique. La rétine de par sa petite taille, son accessibilité par des méthodes peu invasives mais aussi de par son isolement de la circulation systémique, lui donnant un caractère d'immunoprivilège, constitue une cible parfaite pour la thérapie génique. Selon le GlobalData's Intelligence Center, parmi les 24

thérapies actuellement en développement (phase I, phase II et phase III) pour le traitement de différentes formes de RP, 63% sont classées comme des thérapies géniques (Figure 17) ([Global data](#)). Cependant, même si un grand nombre de produits issus de thérapie génique sont en cours de développement, un seul traitement est à ce jour commercialisé pour des patients adultes et enfants atteints d'une dystrophie rétinienne héréditaire résultant de mutations bi-alléliques du gène *RPE65* et possédant suffisamment de cellules rétiniennes viables. Le principe actif de LUXTURNA, le voretigène néparvovec, est un vecteur viral adénoassocié destiné au transfert de matériel génétique au niveau de la rétine. Après injection sous-rétinienne, ce vecteur permet le transport du gène *RPE65* dans les cellules rétiniennes afin de relancer la production de l'enzyme manquante et de restaurer le cycle visuel ([Haute Autorité de Santé, Luxturna](#)).

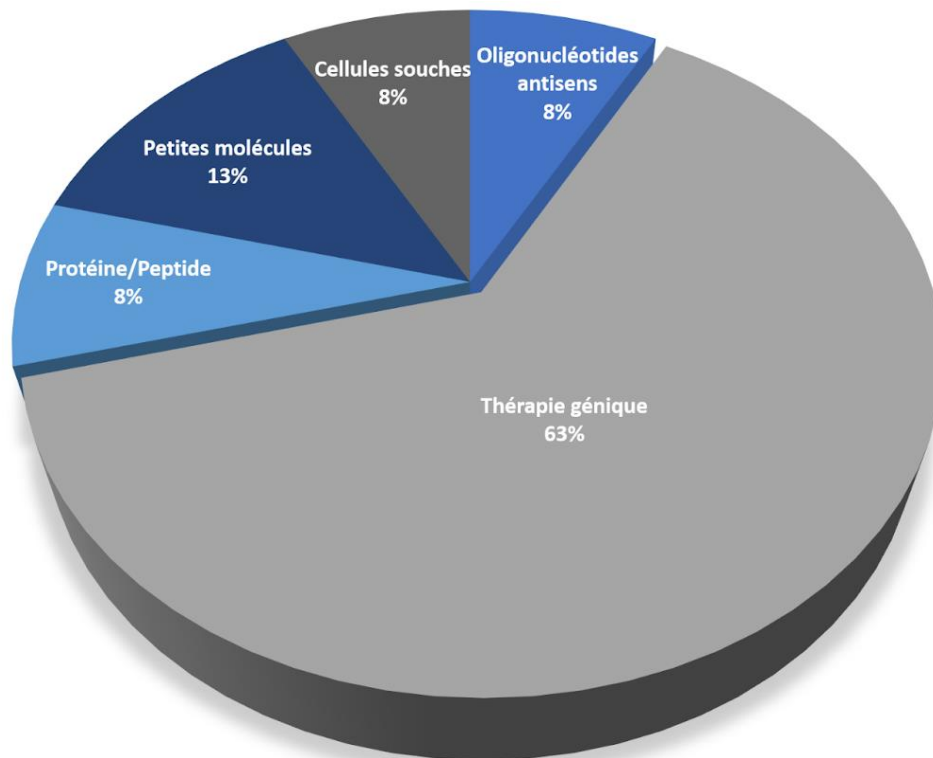


Figure 17: Répartition des différents types de stratégies thérapeutiques en cours de développement pour le traitement de la rétinopathie pigmentaire.

Les approches **optogénétiques** consistent à stimuler de façon spécifique les cellules rétiniennes initialement insensibles à la lumière par l'expression membranaire d'une opsine microbienne photosensible capable de changer le potentiel transmembranaire de la cellule en réponse à la lumière (Chuong *et al.*, 2014). Cette approche présente l'avantage d'être indépendante de toute mutation responsable d'une dystrophie rétinienne, et peut être donc appliquée à un large éventail de maladies dégénératives de la rétine. L'une des premières applications *in vivo* a été la réactivation fonctionnelle des cellules ganglionnaires de la rétine dans un modèle murin de dégénérescence rétinienne (Bi *et al.*, 2006) après injection d'un vecteur viral de type AAV permettant l'introduction d'un gène codant pour la channelrhodopsine ChR2 fusionnée à une protéine fluorescente verte sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire. La sécurité et l'efficacité de l'approche optogénétique dans les cellules ganglionnaires ont également été démontrées chez des primates non humains par la suite (Chaffiol *et al.*, 2017 ; McGregor *et al.*, 2020 ; Gauvain *et al.*, 2021 ; Sengupta *et al.*, 2016). Si l'optogénétique a bouleversé la recherche en neurosciences ces dernières années, c'est en 2021 que celle-ci a été corroborée de succès chez un patient atteint de RP à un stade très avancé avec l'injection d'un vecteur viral de type AAV permettant l'introduction d'un gène codant pour une autre channelrhodopsine appelée ChrimsonR dans les cellules ganglionnaires. Des lunettes dotées d'une caméra ont été développées afin de capter les stimuli lumineux, les intensifier et en produire des images projetées sur la rétine. Sept mois après l'injection, le patient a commencé à rapporter des signes d'amélioration visuelle. A l'aide de ses lunettes, le patient a pu localiser, compter et toucher des objets sur une table (Sahel *et al.*, 2021). Cependant, il manque actuellement des promoteurs spécifiques pour cibler de manière spécifique les cellules ganglionnaires. Une autre façon approche a été de sensibiliser les cellules bipolaires de la rétine en amont des cellules ganglionnaires. En utilisant des promoteurs spécifiques des cellules bipolaires ON, la channelrhodopsine ChR2 a été exprimée dans des cellules bipolaires dans un modèle murin de dégénérescence rétinienne (Lagali *et al.*, 2008) entraînant un traitement du signal intrarétinien spécifique des signaux ON. De nombreux groupes se sont focalisés sur l'élaboration de promoteurs spécifiques (Hulliger *et al.*, 2020) et de capsides AAVs (Mace *et al.*, 2015, Dalkara *et al.*, 2016) pour améliorer cette approche et grand nombre d'équipes de recherche contribuent aux approches optogénétiques à des fins de restauration de la vision qui ciblent les cellules ganglionnaires et bipolaires de la rétine (Kleinlogel *et al.*, 2020 ; Lu et Pan 2021 ; McClements *et al.*, 2020 ; Simon *et al.*, 2020 ; Klapper *et al.*, 2016). La vision humaine dépend principalement des photorécepteurs à cônes permettant la vision diurne des couleurs. Dans les RPs, on pensait que les photorécepteurs à cônes dégénéraient rapidement après être devenus insensibles à la lumière. Cependant, des rapports cliniques ont montré que des corps cellulaires de photorécepteurs à cônes en particulier dans la fovéa persistent chez certains patients atteints de RPs. Ces photorécepteurs à cônes dits « dormants » ont ensuite été ciblés par les approches optogénétiques pour être resensibilisés à la lumière (Busskamp *et al.*, 2010). La réactivation des photorécepteurs à cônes dormants dans la RP - tant que ces cellules persistent - représente une stratégie très prometteuse pour restaurer la fonction visuelle avec des approches d'optogénétique. Cependant, lorsque tous les corps cellulaires des

photorécepteurs ont dégénéré, les types cellulaires en aval doivent être ciblés, d'abord les cellules bipolaires, puis les cellules ganglionnaires du fait que plus le ciblage des optogènes est proche des couches externes de la rétine, meilleur est le signal renvoyé au cerveau car une grande partie du circuit naturel du signal est préservé (Gaub *et al.*, 2018).

La **thérapie cellulaire** concerne les produits biologiques à effet thérapeutique issus de préparation de cellules vivantes humaines ou animales. Cela consiste en l'injection de cellules humaines dans le but de prévenir, traiter ou atténuer une maladie. A partir du moment où une cellule vivante est utilisée à des fins thérapeutiques, on peut parler de thérapie cellulaire. L'objectif est de greffer des cellules plus ou moins purifiées, bien caractérisées, dans un organe ou dans un tissu cible, en quantité suffisante et dont la qualité fonctionnelle, contrôlée au préalable, permet aux cellules de restaurer une fonction déficiente ou dans un but d'immunomodulation. Contrairement à l'optogénétique et aux prothèses rétiniennes, la thérapie cellulaire tente de recréer le système rétinien fonctionnel préexistant en remplaçant les cellules perdues par de nouvelles cellules indépendamment de toute mutation. Pour cela, différents points sont à prendre en compte incluant la source et l'état de différenciation des cellules destinées à être transplantées; l'établissement de connexions synaptiques avec la rétine hôte et enfin la restauration de la fonction visuelle mesurable par divers tests fonctionnels (Seiler *et al.*, 2012). Dans le cas des RPs, les patients perdent généralement des cellules de l'EPR, des photorécepteurs ou les deux. Par conséquent, diverses sources cellulaires principales ont été envisagées dont les deux principales sont: d'une part, des cellules de l'EPR pour remplacer l'EPR dysfonctionnel et prévenir la perte de cellules photoréceptrices et, d'autre part, diverses sources pouvant remplacer les photorécepteurs perdus. Le bon fonctionnement des photorécepteurs dépendant de cellules de l'EPR sain, ces dernières ont été les premières sources de cellules étudiées dans des approches de thérapie cellulaire. Ainsi, Gouras *et al.*, ont réalisé la première transplantation de cellules de l'EPR chez le singe dans les années 1980 (Gouras *et al.*, 1984) et chez le modèle de rat RCS par la suite (Lopez *et al.*, 1989). La première source de cellules de l'EPR exploitée a été la source fœtale, les cellules de l'EPR prélevées de fœtus âgés de 10 à 21 semaines (Little *et al.*, 1996). Depuis les premières greffes de cellules de l'EPR, d'autres sources outrepassant notamment les limites éthiques de la source fœtale ont été exploitées et plus particulièrement les cellules de l'EPR dérivées de cellules souches pluripotentes (cellules ES ou cellules iPS) que nous exploiterons dans la partie IV de l'introduction. Différentes approches ont été utilisées pour la transplantation de cellules de l'EPR comprenant la transplantation sous forme de suspension cellulaire ou de feuillets de cellules de l'EPR. Bien que les cellules de l'EPR greffées se sont révélées être plus efficaces sous forme de feuillets en terme de restauration visuelle, ces approches plus complexes nécessitent une procédure chirurgicale plus invasive. Dans le cas de la transplantation des photorécepteurs, le succès de cette stratégie dépend de critères cruciaux. En effet, les principaux critères de réussite d'une transplantation de photorécepteurs sont d'une part la sécurité (non immunogénicité, non tumorigénicité) mais également l'intégration dans la rétine de l'hôte et le rétablissement de connexions synaptiques avec les cellules bipolaires de l'hôte

permettant ainsi une potentielle restauration visuelle à un degré satisfaisant et mesurable par différents tests fonctionnels notamment électrophysiologiques et comportementaux. Plusieurs articles de synthèse détaillés portent spécifiquement sur ce sujet (Jayakody *et al.*, 2015 ; Stern *et al.*, 2018 ; Santos-Ferreira *et al.*, 2016 ; Seiler et Aramant 2012 ; Gagliardi, Ben M'Barek, et Goureau 2019). De nombreuses études ont indiqué qu'un certain stade de développement des photorécepteurs est nécessaire pour leur survie et leur intégration dans la rétine hôte (Bartsch *et al.*, 2008). En 2006, MacLaren *et al.* ont montré que seuls les précurseurs des photorécepteurs sont capables de s'intégrer, de se différencier en photorécepteurs et établir des connexions synaptiques, améliorant ainsi la fonction visuelle (MacLaren *et al.*, 2006). Depuis, avec des succès certains dans le cas de transplantation de précurseurs de photorécepteurs et ce, même dans le cas de dégénérescence avancée (Singh *et al.*, 2013) les précurseurs de photorécepteurs sont devenus la source privilégiée pour de futures applications de médecine régénérative (Bartsch *et al.*, 2008, Pearson *et al.*, 2012, Lakowski *et al.*, 2011, Eberle *et al.*, 2011). Tout comme pour les cellules de l'EPR, différentes sources de cellules ont été exploitées comprenant les sources fœtales mais aussi les sources adultes. Néanmoins, nous nous attarderons plus précisément sur l'utilisation des CSPs dans la dernière partie de cette introduction.

Les **implants rétiniens** sont adressés aux personnes présentant une perte de vision profonde (dégénérescence très importante de photorécepteurs mais conservant des fibres optiques). Ils consistent à implanter une matrice d'électrodes à la surface de la rétine. En effet, cette technique repose sur la possibilité de générer des perceptions lumineuses (des phosphènes) en stimulant électriquement les neurones résiduels de la rétine (Allen *et al.*, 2021). On peut distinguer différents types de prothèses rétiniennes en fonction du type de cellules stimulées, mais aussi de la technologie permettant de transformer le signal lumineux en signal électrique se basant principalement soit sur une stimulation directe de la rétine soit sur stimulation par l'intermédiaire de diodes sensibles à la lumière. La qualité de l'image perçue par les patients est déterminée par le nombre d'électrodes ou de photodiodes sur l'implant, le type de stimulation et le réglage des niveaux de gris. Différents types d'implants sont discernables si l'on se base sur l'approche chirurgicale : les prothèses épirétiniennes, sous-rétiniennes, supra-choroïdiennes ou intra-sclérales. Les prothèses épi- et sous-rétiniennes offrent toutes deux une meilleure restauration visuelle qui permet au patient de lire des mots courts (Zrenner *et al.*, 2011). Parmi des exemples de prothèses sous rétiniennes, nous pouvons citer l'implant Argus II développé par la société Second Sight : premier implant à obtenir une autorisation de commercialisation en Europe et aux USA en 2013. Celui-ci, composé de 60 électrodes en platine, a été testé chez plus de 350 patients dans le monde, ce qui en fait la prothèse rétinienne la plus largement implantées dans le monde. Malgré cela, sa fabrication a été suspendue en 2019 manque d'investisseurs (Cruz *et al.*, 2013 Stiles *et al.*, 2021). L'implant allemand Alpha-AMS/IMS développé par Retina Implant est une prothèse sous rétinienne comprenant 1600 électrodes et autant de diodes sensibles à la lumière (Zrenner *et al.*, 1999). Celles-ci transforment la lumière en courants électriques qui sont amplifiés par un circuit électronique avant d'être

libérés au niveau des électrodes. Tout comme pour la prothèse Argus II, sa commercialisation a été arrêtée. L'implant Prima de la société française Pixium est un implant sous-rétinien de 2x2 mm composé de 378 électrodes de neurostimulation photovoltaïque qui n'est pas filaire. Il stimule électriquement les cellules bipolaires grâce à un matériau photovoltaïque sensible à la lumière infrarouge. Bien qu'il n'y ait pas de câble, cette approche nécessite l'utilisation de lunettes, qui transforment grâce à une caméra le signal lumineux en un signal infrarouge laser qui stimule l'implant (Lee et al., 2016, Lorach H and Palanker, 2016, Wang et al., 2012).

Partie IV : Les cellules souches pluripotentes humaines : applications en ophtalmologie

1. Les cellules souches pluripotentes humaines

Au cours du développement embryonnaire chez l'homme, la fécondation conduit à la formation d'une cellule-œuf dite zygote qui permettra par la suite de donner un organisme dans son intégralité: tissus embryonnaires et tissus extra-embryonnaires. Cette cellule de par cette propriété possède alors le plus haut potentiel de différenciation. Cependant, passés quelques jours de développement embryonnaire, les cellules en division voient leur potentiel de différenciation diminué de par leur engagement dans des types de tissus de plus en plus spécifiques (Rowe *et al.*, 2019). Une fois le développement terminé, ces cellules souches n'ont pas totalement disparu selon les organes ou tissus et sont responsables de leur régénération, comme la peau.

A. Généralités sur les cellules souches

Par définition, une cellule souche possède deux propriétés fondamentales : l'auto-renouvellement et la capacité de différenciation. L'auto-renouvellement correspond à la capacité de division tout en conservant un caractère indifférencié. Cette propriété permet ainsi la conservation des populations de cellules souches de l'organisme. Ce processus s'effectue soit par division cellulaire symétrique aboutissant à la naissance de deux cellules filles qui restent dans un état indifférencié ou par division cellulaire asymétrique donnant lieu à une cellule fille différenciée et une cellule fille indifférenciée. La capacité de différenciation est définie comme un processus d'acquisition d'un phénotype moléculaire et fonctionnel spécialisé. Selon le potentiel de différenciation nous pouvons distinguer :

- les cellules **totipotentes** qui peuvent donner à partir d'une cellule un individu complet une fois implantées, elles correspondent aux cellules embryonnaires du stade zygote jusqu'au stade 8 cellules;
- les cellules **pluripotentes** qui peuvent se différencier en n'importe quel type de cellules issues des trois feuilletts embryonnaires (endodermique, ectodermique, mésodermique). Celles-ci correspondent aux cellules de la masse cellulaire interne du stade blastocyste du développement embryonnaire et peuvent être maintenues *in vitro*: ce sont les cellules souches embryonnaires;
- les cellules **multipotentes** dotées de la capacité d'auto-renouvellement mais ayant une capacité de différenciation limitée; elles donnent des types cellulaires appartenant à un seul lignage cellulaire;

- les cellules **bi ou unipotentes** qui gardent la capacité d'auto-renouvellement mais ne pouvant donner respectivement qu'un ou deux types cellulaires.

Il est néanmoins intéressant de noter que des niveaux de cellules intermédiaires entre les cellules multipotentes et les cellules spécialisées existent: on les appelle progéniteurs tels que les lymphoblastes B et T, eux-mêmes issus du progéniteur lymphoïde et évoluant vers la formation respectivement des lymphocytes B et T, mais aussi les cellules progénitrices rétiniennes (RPCs) capables de générer tous les types cellulaires de la rétine ([Fekete et al., 1994](#)).

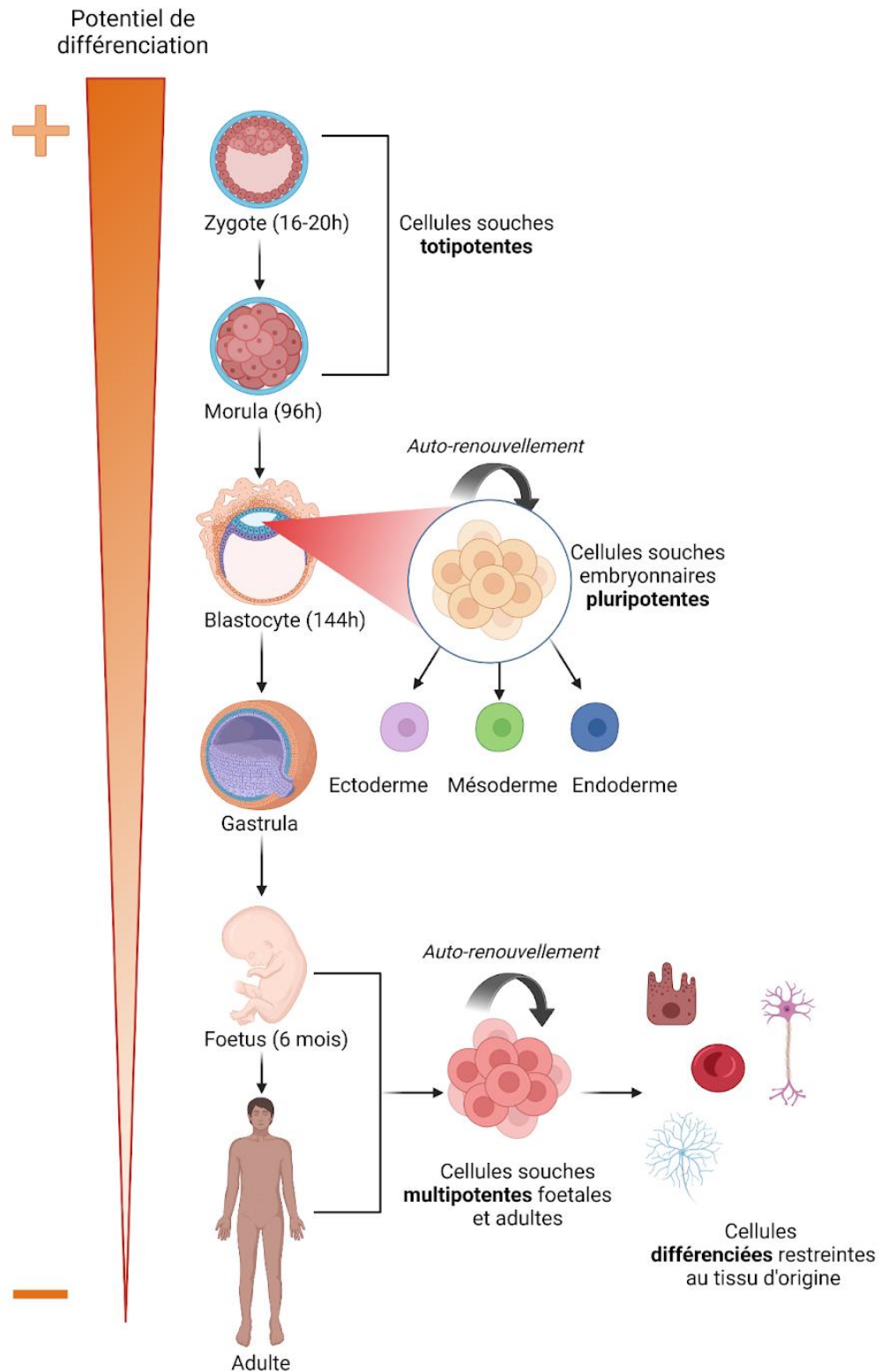


Figure 18: De l'œuf fécondé aux cellules adultes différenciées : les différents types de cellules souches au cours du développement.

B. Les cellules souches pluripotentes humaines : des cellules souches embryonnaires ou cellules souches induites à la pluripotence

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons aux cellules souches pluripotentes (CSPs) et leurs applications dans la modélisation de dystrophies rétiniennes héréditaires. Les cellules souches pluripotentes peuvent s'auto-renouveler et se différencier en n'importe quel type cellulaire de l'organisme issu des trois feuillets embryonnaires, comme précédemment énoncé. De par ces précieuses propriétés, leur exploitation pour la génération de tissus et d'organes humains *in vitro* a été rapidement entreprise. Nous pouvons discerner de CSPs pouvant être maintenues en culture: les cellules souches embryonnaires (cellules ES) obtenues à partir de la masse cellulaire interne (MCI) ou de l'épiblaste des blastocystes et des cellules induites à la pluripotence (cellule iPS).

a. Les cellules souches embryonnaires

Au début des années 60, a émergé la recherche sur les cellules souches pluripotentes avec la formation de tératocarcinomes après transplantation de crêtes génitales fœtales dans des testicules adultes de souris. En effet, le docteur Stevens avait remarqué que les tératocarcinomes générés chez la souris permettaient la génération de différents tissus tels que la peau, les muscles, les cheveux mais également une population de cellules restant indifférenciées qu'il désigna de « cellules souches embryonnaires de carcinome » (Stevens *et al.*, 1964). Leur étude a été déterminante dans la découverte et l'obtention par Evans et Kaufman en 1981 des cellules souches embryonnaires murines issues de la masse cellule interne de blastocystes murins. En effet, ces derniers présentèrent des méthodes expérimentales d'une part pour l'isolation de ces cellules, mais aussi pour leur maintien en culture (Evans *et al.*, 1981).

C'est en 1998 que fut établie la première lignée de cellules ES humaines par Thomson *et al.* (Thomson *et al.*, 1998). Des embryons humains surnuméraires issus de fécondation *in vitro* et avec le consentement des familles étaient cultivés jusqu'au stade blastocyste soit 5 à 7 jours post fécondation. Les cellules souches embryonnaires humaines étaient prélevées comme pour la souris à partir de la MCI et mises en culture sur une couche nourricière de fibroblastes embryonnaires de souris. *In vitro*, ces cellules conservaient sur un grand nombre de passages leur caractéristique de pluripotence, ainsi qu'un caryotype normal. Les cellules ES humaines sont caractérisables par l'expression de marqueurs de surface spécifiques tels que l'antigène membranaire spécifique SSEA-4 et les antigènes apparentés au sulfate de kératane TRA-1-60 et TRA-1-81 (Thomson *et al.*, 1998). En Mars 2017, selon le registre des CSPh, 378 lignes cellulaires différentes ont été approuvées, provenant chacune d'un unique embryon (NIH Registre). Leur utilisation en recherche fondamentale comme dans des essais cliniques nécessite une caractérisation précise et rigoureuse.

L'utilisation des cellules souches embryonnaires humaines à des fins de recherche médicale suscite encore de nos jours des controverses et des avis qui divergent dans la mesure où elle peut nécessiter la destruction d'embryons. L'origine de ces divergences est relative au statut de l'embryon. Certaines personnes considèrent l'embryon au stade blastula comme un être à devenir; détruire l'embryon reviendrait donc à tuer un enfant à naître. D'autres pensent que la blastula ne peut être considérée ainsi dans la mesure où si celle-ci n'est pas implantée dans la paroi de l'utérus, elle ne pourra pas se développer et donner un futur enfant. Chaque année, les cliniques de fertilité créent de nombreuses blastulas qui sont détruites car produites plus que nécessaires. Ceux qui soutiennent la recherche sur les cellules souches embryonnaires pensent qu'il vaudrait mieux utiliser les cellules de ces blastulas surnuméraires pour la recherche et le développement de traitements médicaux, qui pourraient améliorer ou même sauver des vies humaines, plutôt que de les jeter. Chaque pays a une législation spécifique quant à l'utilisation d'embryons surnuméraires. En France, leur utilisation est débattue depuis le milieu des années 90 aboutissant au fil du temps à une succession de lois. En 2021, le statut de la recherche sur les cellules souches embryonnaires en France a changé. En effet, on la distingue maintenant de la recherche propre à l'embryon, ces deux types de recherches ne conduisant pas aux mêmes questionnements éthiques. Il est possible désormais en faisant une déclaration préalable auprès de l'Agence de biomédecine, et non plus une demande d'autorisation d'utiliser des cellules souches embryonnaires humaines. Une des limites des cellules ES réside aussi dans le fait que le diagnostic préimplantatoire n'est possible que pour un nombre restreint de maladies génétiques donnant une possibilité limitée d'obtention de lignées mutantes disponibles. Ainsi, en 2012 Ben-Yehudah et al. recensaient « seulement » 150 lignées de cellules ES humaines mutantes dans le monde ([Ben-Yehudah et al., 2012](#)). En 2018, le rapport de l'agence française de la biomédecine faisait état de 314 maladies génétiques différentes ayant bénéficié d'une mise au point en vue d'un diagnostic préimplantatoire ([Rapport annuel d'activité de diagnostic préimplantatoire 2018](#)), alors qu'on dénombre entre 6000 et 8000 maladies génétiques différentes. Pour surmonter les obstacles éthiques et administratifs qui limitent la recherche avec des cellules ES humaines, les scientifiques ont cherché d'autres sources de cellules souches pluripotentes.

b. Les cellules souches induites à la pluripotence

En 2006, alors que l'obtention et l'utilisation des cellules ES se heurtaient toujours à des questions éthiques, l'équipe du Pr. Yamanaka a identifié chez la souris quatre facteurs de transcription (Oct3/4, Klf4, Sox2, et c-myc) suffisants pour reprogrammer une cellule somatique en cellule ayant des caractéristiques similaires aux cellules ES: les cellules induites à la pluripotence (induced pluripotent stem cells), les cellules iPS (Takahashi *et al.*, 2006). Cette avancée, ayant donné lieu au prix Nobel de médecine de 2012, a été amorcée notamment par l'élucidation du contrôle du destin cellulaire en 1987 lorsqu'il a été possible de reprogrammer des fibroblastes en myoblastes par l'introduction de gènes spécifiques via des vecteurs rétrovirus, que l'on appellera par la suite des facteurs de transcription (Davis *et al.*, 1987). Ces facteurs de transcription, et plus particulièrement des combinaisons de ces facteurs de transcription, régulent donc des gènes qui déterminent le destin cellulaire (Iwafuchi *et al.*, 2016). Cette découverte a incité à s'appuyer sur l'étude des facteurs de transcription particulièrement exprimés dans les ovocytes et le maintien des cellules ES. C'est ainsi que S. Yamanaka identifia une combinaison dite minimale de 4 facteurs de reprogrammation (appelée OSKM), trouvée parmi une liste de 24 gènes codant pour des facteurs de transcription ayant un rôle potentiel dans la régulation transcriptionnelle spécifique aux cellules pluripotentes (Takahashi *et al.*, 2006). Ces quatre facteurs de transcription sont impliqués dans les premières étapes de l'embryogenèse et permettent le maintien de l'état de pluripotence des cellules souches embryonnaires: **Oct3/4** (Octamer-binding transcription factor3/4) appelé également Pou5f1, intervenant dans le passage du stade morula à celui de blastocyte; **Sox2** (SRY-box2) impliqué dans l'auto-renouvellement et le maintien de la pluripotence des cellules ES et formant un hétérodimère avec Oct4; **Klf4** (Kruppel-like transcription factor) pouvant activer ou réprimer la transcription et **C-myc**, un oncogène exprimé dans les cellules à fort potentiel prolifératif (Figure 19).

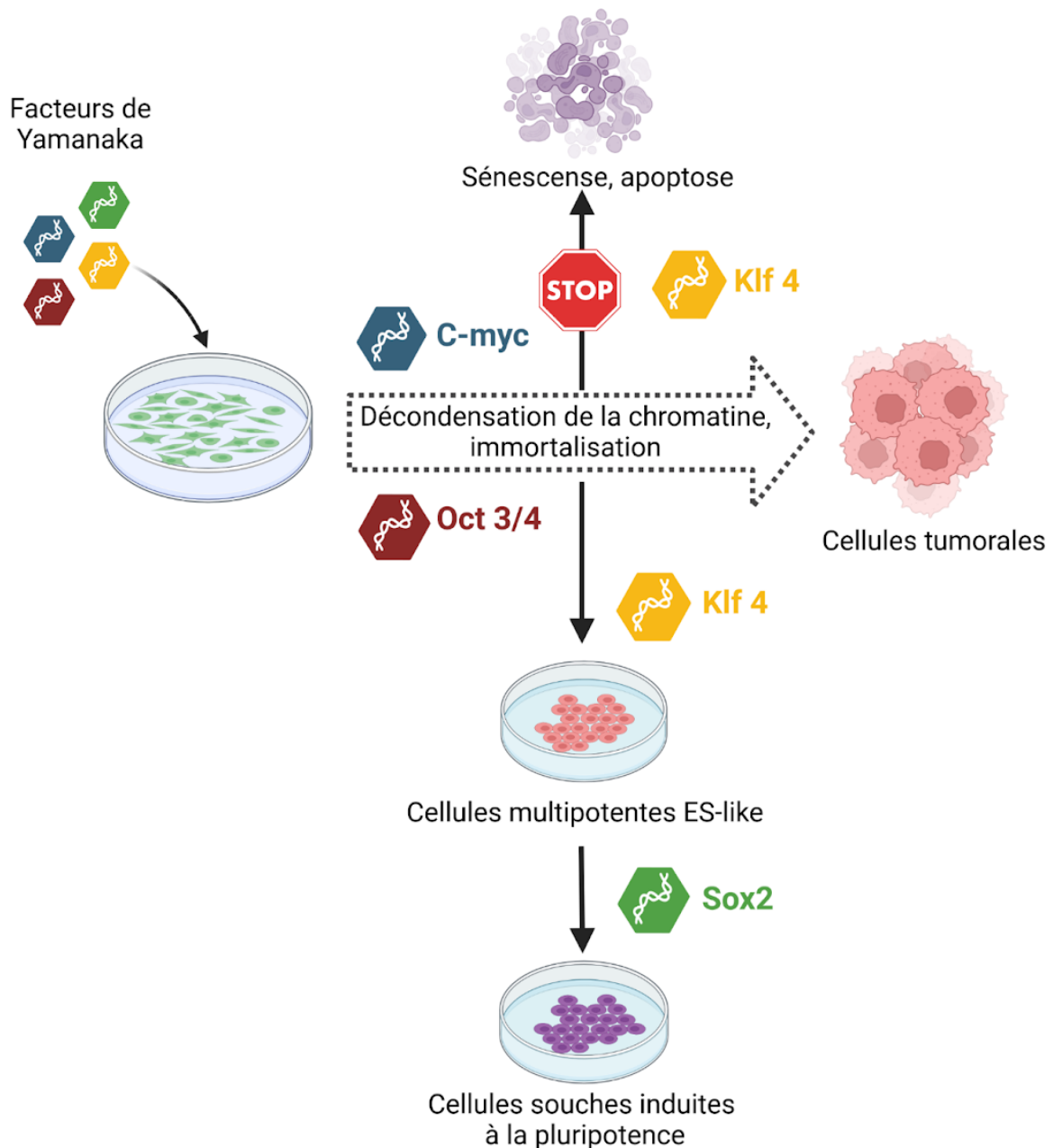


Figure 19: Le rôle des facteurs "OSKM" dans l'induction des cellules iPS: les cellules souches pluripotentes sont immortelles avec une structure chromatinienne ouverte et active. Il est probable que le facteur c-Myc induise ces deux propriétés en se liant à plusieurs sites sur le génome et par le recrutement de multiples complexes d'histones acétylases. Cependant, c-Myc induit également l'apoptose et la sénescence et cet effet peut être antagonisé par Klf4. Oct3/4 modifie probablement le sort des cellules tumorales en cellules de type cellules ES, tandis que Sox2 contribue à la pluripotence.

Une année après la reprogrammation de fibroblastes murins en cellules iPS, la même équipe appliqua cette méthode à des fibroblastes humains issus de la peau (Takahashi *et al.*, 2007). Peu de temps après, l'équipe du Pr. Thomson démontra la possibilité de reprogrammer des fibroblastes humains avec un autre cocktail de facteurs (Oct4, Sox2, Nanog et Lin28) apportés par des lentivirus (Yu *et al.*, 2007), qui, présente l'avantage de ne pas inclure l'oncogène c-myc dont la réactivation ectopique est connue pour provoquer un accroissement de tumeurs. Ce dernier, même s'il améliore grandement l'efficacité de la reprogrammation, n'est pas indispensable (Okita *et al.*, 2007). Dans ce contexte, afin d'améliorer la reprogrammation des cellules somatiques en cellule iPS, la communauté scientifique s'est concentrée sur la recherche d'autres facteurs de reprogrammation, alternatifs aux quatre facteurs de Yamanaka, soit en combinant des facteurs moléculaires et chimiques avec ceux-ci ou en remplaçant un ou plusieurs d'entre eux (Ebrahimi *et al.*, 2015).

Le processus de reprogrammation induit par l'utilisation des facteurs de Yamanaka a été décrit comme se déroulant en deux étapes « transcriptionnelle » successives (Buganim *et al.*, 2012) (Figure 20). La première étape est dite **stochastique** où l'expression de facteurs exogènes conduit à des événements aléatoires aux effets hétérogènes. Durant cette étape, il y a notamment une augmentation de l'expression des gènes induits par le stress entraînant une sénescence et l'apoptose des cellules somatiques. A la fin de cette étape, seules les cellules ayant échappé à la mort cellulaire poursuivront la reprogrammation (Takahashi *et al.*, 2016). Malgré une connaissance incomplète quant aux mécanismes précis impliqués dans la reprogrammation cellulaire, il a été admis que l'inefficacité importante de la reprogrammation serait due à cette première étape stochastique (Hanna *et al.*, 2009). La seconde étape, dite **déterministe**, débute lorsque les gènes endogènes liés à la pluripotence sont réexprimés (Stadtfield *et al.*, 2008) entraînant des événements permettant le maintien de l'état pluripotent tels que l'élongation des télomères (Maherali *et al.*, 2008) mais aussi la déméthylation des histones et de l'ADN (Wang *et al.*, 2011). A l'issue de cette étape, seules quelques cellules réussiront à activer et maintenir le circuit endogène de la pluripotence (Polo JM *et al.*, 2012).

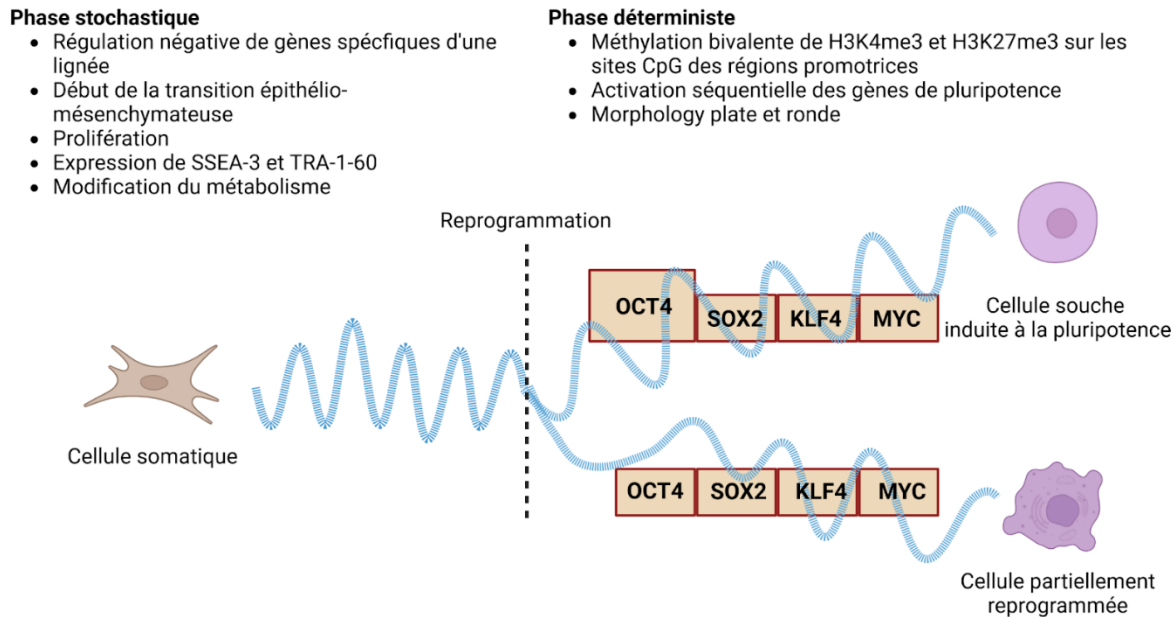


Figure 20: Les deux phases de reprogrammation. La reprogrammation cellulaire passe par deux phases, une phase précoce ou stochastique et une phase tardive ou déterministe. L'expression endogène de Sox2 représenterait le point de transition (ligne pointillée) entre ces deux phases (Buganim *et al.*, 2013). La plupart des cellules amorcent la reprogrammation lorsque les facteurs de reprogrammation sont induits, mais peu d'entre elles la terminent. Il a été constaté que la probabilité d'une reprogrammation complète dépend de l'expression relative d'Oct4 par rapport à Sox2, de l'isoforme de Klf4 et d'autres facteurs. Par rapport à l'isoforme la plus courte, l'utilisation de l'isoforme la plus longue de KLF4 entraînera une diminution du nombre de cellules initiant la reprogrammation, mais une augmentation du nombre de cellules la terminant. Adapté de Karagiannis *et al.*, 2019.

Depuis la preuve de concept par l'équipe de S. Yamanaka, différents types cellulaires ont pu être reprogrammés tels que les kératinocytes (Aasen *et al.*, 2008) les cellules endothéliales (Féraud *et al.*, 2016a ; Haase *et al.*), les cellules souches neurales (Kim *et al.*, 2009a) pour en citer quelques-uns parmi tant d'autres. Plusieurs points sont à considérer quant au choix de la cellule somatique à reprogrammer. Tout d'abord, selon le type cellulaire choisi, les facteurs de reprogrammation utilisés ne seront pas toujours les mêmes. En effet, certains types cellulaires tels que les cellules neurales (murines ou humaines) expriment de manière endogène SOX2, KLF4 et plus rarement c-myc. De ce fait, celles-ci ont pu être reprogrammées uniquement avec la surexpression du facteur Oct4 (Kim *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2008). Le choix du type cellulaire à reprogrammer tient compte également de son accessibilité par des méthodes le moins invasives possible mais aussi de la facilité à être cultivé et amplifié *in vitro* pour obtenir un nombre de cellules suffisant à reprogrammer (Figure 21). Même si les cellules iPS obtenues quelle que soit l'origine des cellules de départ répondent à des critères communs, il a été démontré que l'origine des cellules peut avoir une influence sur l'efficacité et la cinétique de la reprogrammation, mais aussi sur le potentiel de différenciation par la suite (Kim *et al.*, 2010). A titre d'exemple, il a ainsi été montré une meilleure efficacité de reprogrammation à partir de progéniteurs CD34+ que de cellules mononuclées matures telles que les lymphocytes T (Loh *et al.*, 2009) ou les monocytes, indiquant que l'efficacité varie aussi selon le niveau de maturation de la cellule somatique.

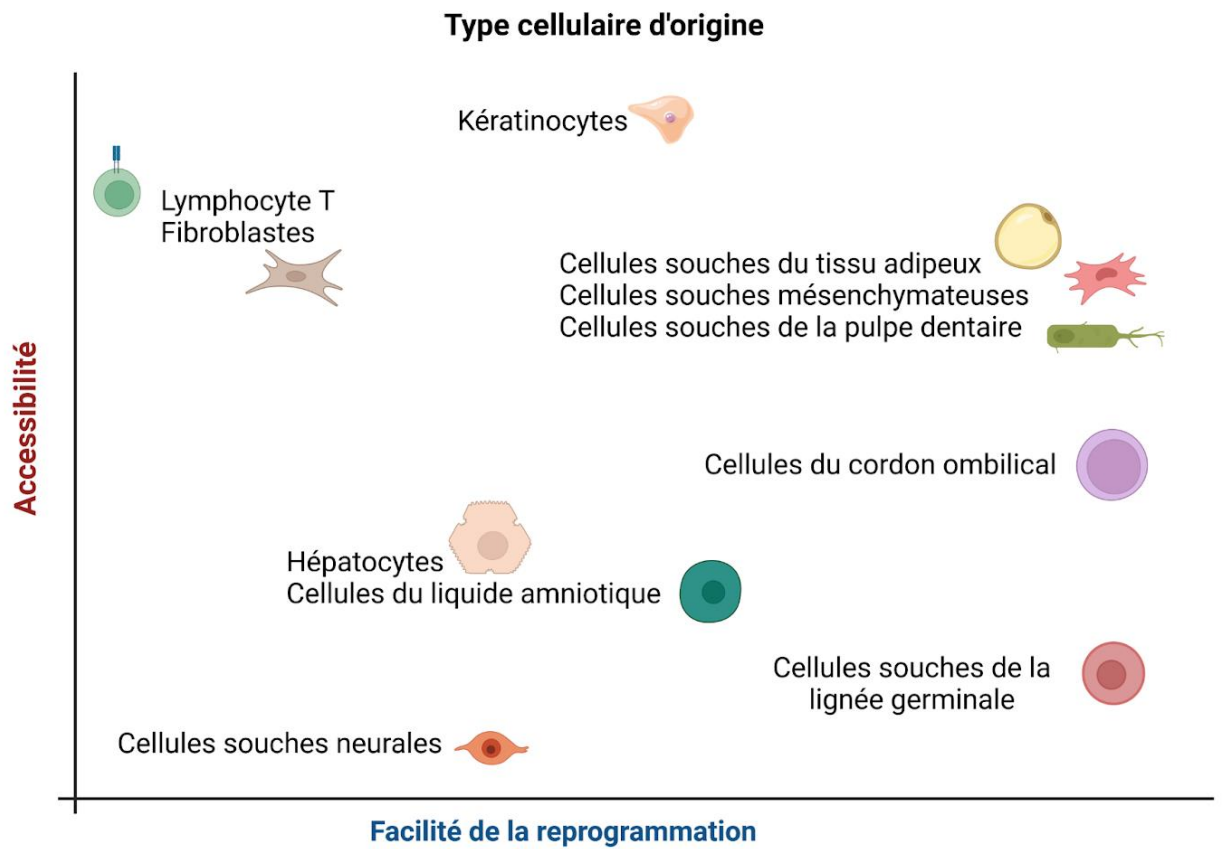


Figure 21: Accessibilité et facilité de la reprogrammation cellulaire en fonction du type cellulaire d'origine. Adapté de [Gonzalez et al, 2011](#).

De nos jours, un grand nombre de méthodes de reprogrammation existent permettant l'apport de facteurs de transcription sous différentes formes (ADN, ARN, protéines). Ces méthodes se distinguent principalement par leur caractère intégratif ou pas et selon l'utilisation de vecteurs viraux ou non. Les rétrovirus et les lentivirus sont les deux vecteurs viraux les plus couramment utilisés et tous deux sont des systèmes intégratifs. En effet, ils permettent l'intégration des transgènes dans le génome de la cellule hôte induisant une expression constante des facteurs de reprogrammation et présentent en général une efficacité de reprogrammation supérieure. Ces systèmes intégratifs permettent une forte expression des facteurs de transcription mais comportent des risques en termes de sécurité (Figure 23). En effet, de par leur caractère intégratif, des risques d'insertion mutagène au sein de gènes suppresseurs de tumeurs ou des oncogènes - des problèmes sont présents et ont déjà été observés dans une étude de thérapie génique utilisant un rétrovirus (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003). Ces risques compromettent alors l'utilisation des cellules iPS en clinique. Afin de s'affranchir des problèmes liés à l'intégration des rétrovirus et lentivirus, d'autres techniques ont été développées. En effet, les systèmes non intégratifs conduisent à une expression plus modérée des facteurs de transcription mais limitent les risques d'insertion et de destruction du génome.

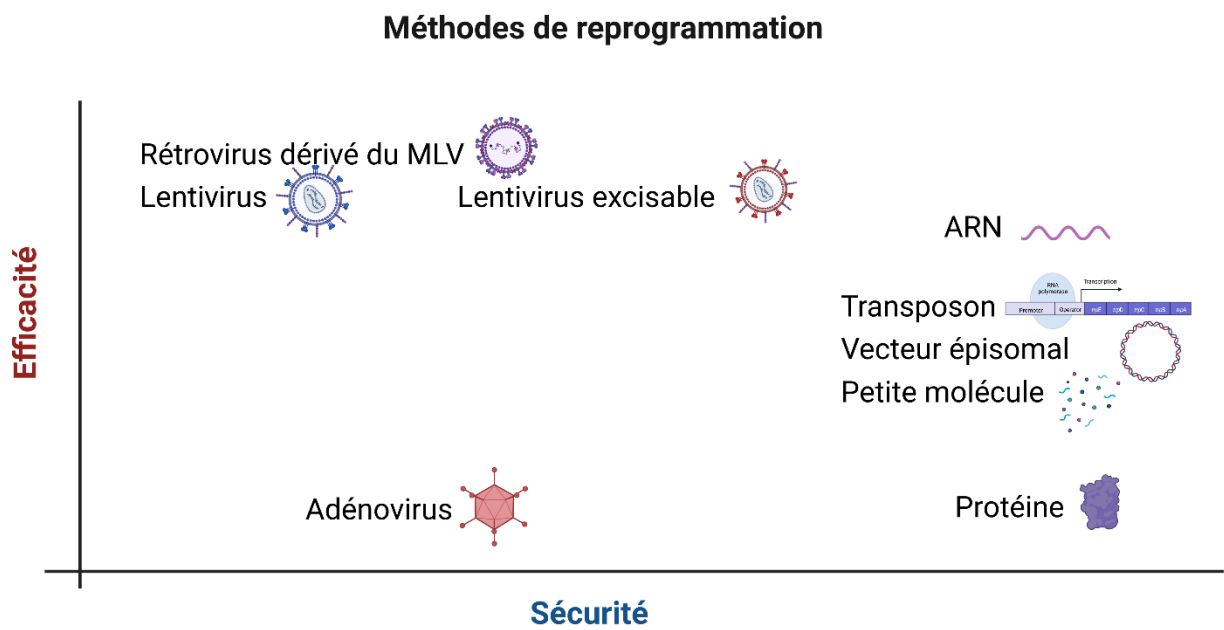


Figure 23 : Graphique illustrant la relation entre l'efficacité et la sécurité des différentes méthodes de reprogrammation cellulaire. *MLV*: Virus de la leucémie murine. Adapté de Gonzalez et al., 2011.

Force est de constater que les cellules iPS sont devenues en quelques années un versant incontournable dans le domaine des cellules souches. Mais quels sont les avantages et limites des cellules iPS comparées cellules ES ?

L'un des intérêts principaux des cellules iPS est que leur utilisation permet de s'affranchir d'un grand nombre de problèmes éthiques associées aux cellules ES. Il est possible également d'avoir une approche personnalisée de traitement avec des cellules souches et des médicaments spécifiques au patient (Chun *et al.*, 2011). La technologie des cellules iPS peut réduire considérablement le nombre d'animaux sacrifiés lors des essais précliniques et permettre une détection précoce de la toxicité, le tout réduisant les dangers et les coûts liés aux essais précliniques et cliniques (Chun *et al.*, 2010). Enfin, la révolution des techniques d'édition du génome avec l'outil CRISPR/Cas9 permet le ciblage des gènes pour corriger des mutations spécifiques impliquées dans les maladies. Malgré ces nombreux avantages, cette technologie a également ses limites. Celles-ci se rapportent principalement au processus de reprogrammation. En effet, comme vu précédemment, l'efficacité de la reprogrammation est généralement faible. De par les méthodes virales utilisées, des risques de mutagenèse insertionnelle et donc accroissement de la génération de tumeurs sont à prendre en compte (Okita *et al.*, 2007). Il est à noter qu'au cours de la génération de cellules pluripotentes, pour les cellules ES comme pour les cellules iPS, des anomalies génomiques et épigénétiques peuvent apparaître (Lund *et al.*, 2012). Concernant les cellules iPS, ces anomalies peuvent avoir différentes origines comprenant leur culture mais aussi plus en amont la méthode de reprogrammation utilisée pour leur génération. En effet, cette dernière entrainerait une instabilité génomique caractérisée par l'apparition de CNVs (copy number variation) impliquant des gènes intervenant dans la régulation du cycle cellulaire connus et la suppression de tumeurs (Hussein *et al.*, 2011, Gore *et al.*, 2011, Mayshar *et al.*, 2010).

Une autre question est tout aussi intéressante et légitime: les cellules iPS sont-elles différentes des cellules ES? Malgré une grande similitude mise en évidence entre ces deux types de cellules souches pluripotentes par des études ayant porté sur un grand nombre de CSPs (Bock *et al.*, 2011), certaines équipes ont signalé d'importantes différences concernant le transcriptome (Chin *et al.*, 2009), la méthylation de l'ADN (Deng *et al.*, 2009) et la capacité de différenciation (Kim *et al.*, 2011, Takahashi *et al.*, 2016). L'une des principales différences repose sur la notion de mémoire épigénétique. En effet, on observe des similitudes sur les profils de méthylation de l'ADN des cellules iPS et des cellules somatiques du donneur, ce qui laisse penser que les cellules iPS ont des marques épigénétiques résiduelles de « mémoire ». La mémoire épigénétique résulterait d'une élimination incomplète de la méthylation de l'ADN des cellules somatiques au cours de la reprogrammation. Cependant, la notion de mémoire épigénétique est l'objet de divergences scientifiques. Ces différences épigénétiques seraient particulièrement discernables dans les cellules iPS à bas passage (Kim *et al.*, 2010) et éliminées peu à peu au cours des passages. Il a été démontré qu'après dix passages, la mémoire épigénétique était

presque éliminée et après seize passages, les cellules étaient indiscernables en fonction de leur origine (Polo et al., 2010). Cette mémoire pourrait tout de même compromettre la capacité de différenciation des cellules iPS qui auraient alors tendance à se différencier vers un type cellulaire proche de celui d'origine (Kim et al., 2011). D'autres études ont nuancé cette notion de mémoire en démontrant qu'une partie des variations du profil épigénétique étaient dues aux conditions de cultures (Newman et al., 2010) mais encore aux différences de fond génétique des différentes lignées plutôt qu'aux cellules d'origine utilisées pour les générer (Rouhani et al., 2014).

2. De la cellule souche pluripotente humaine à la cellule rétinienne : les protocoles de différenciation

Les connaissances du développement de l'œil et de la rétino-génèse sont primordiales pour établir des protocoles de différenciation de cellules souches pluripotentes en cellules rétinienne. Des protocoles ont été développés dans le but de mimer *in vitro* les différentes étapes du développement de l'œil. La première étape consiste à déterminer les conditions de culture qui permettent aux cellules iPS et cellules ES d'adopter une identité neuroectodermique, puis celle du territoire oculaire et enfin d'orienter leur différenciation vers un lignage rétinien (EPR ou rétine neurale). Plusieurs stratégies visant à orienter spécifiquement la différenciation des cellules iPS et cellules ES en cellules de la rétine neurale de manière robuste, reproductible et efficace ont été mises en place. Pour la plupart, ces stratégies passent par une étape transitoire de formation corps embryoides, composés de cellules précurseurs. Ces stratégies nécessitent plusieurs étapes de culture qu'elles soient en 2D ou 3D.

Le premier protocole permettant de générer des cellules neuro-rétiniennes a été développé à partir de cellules ES de souris en utilisant des facteurs requis durant les inductions neurale et rétinienne antérieures (Ikeda *et al.*, 2005). Ce protocole utilise la culture flottante de corps embryoides sans l'utilisation de sérum (méthode SFEB) à laquelle est ajoutée une combinaison d'inhibiteurs de la voie Wnt (Dickkopf-1, Dkk1) et de la voie BMP/Nodal (Lefty-A) permettant la génération de progéniteurs neuronaux de type rostral (Figure 24). Ce protocole requiert une étape de culture 2D avant laquelle l'ajout de sérum et d'Activine-A induit une culture enrichie à 25-30% de progéniteurs rétiens coexprimant les marqueurs Pax6 et Rax. Cependant les cellules ne se différenciaient efficacement en précurseurs de photorécepteurs uniquement en culture avec des cellules rétinienne embryonnaires.

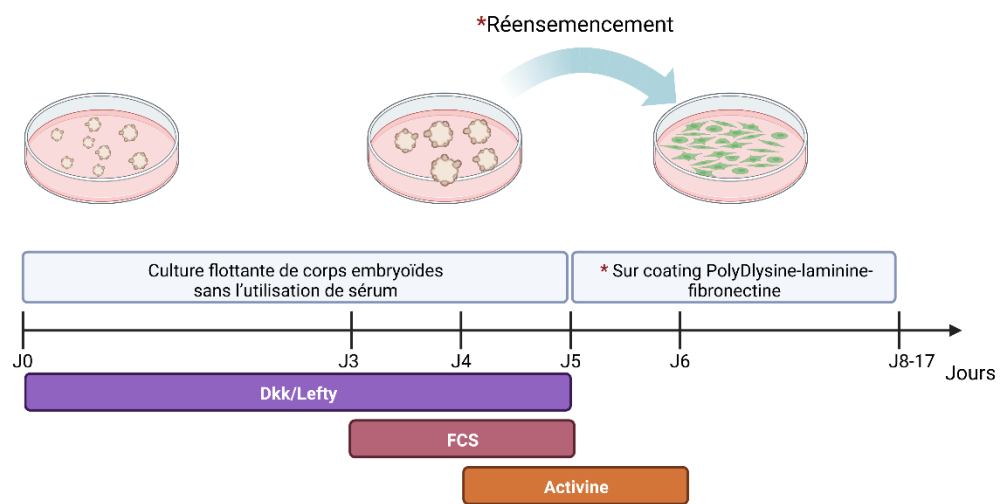


Figure 24 : Premier protocole de différenciation de cellules ES de souris en cellules rétiniennes.

Adapté de Ikeda *et al.*, 2005.

A partir de ce concept de spécification séquentielle, en 2006 Lamba *et al.*, ont été les premiers à établir les conditions permettant de générer efficacement des cellules rétiniennes à partir de cellules ES humaines (Lamba *et al.*, 2006). Le protocole requiert dans un premier temps l'utilisation du système SFEB auquel sont ajoutés l'inhibiteur Dkk1, Noggin un antagoniste de la voie BMP et l'IGF-1 un facteur de croissance analogue à l'insuline pour induire une différenciation neurale. Dans un second temps, les cellules étaient ensemencées pour une différenciation plus poussée avec la même combinaison d'inducteurs neuraux mais aussi du FGF2 et des milieux proneuraux contenant les suppléments N2 et B27. En se basant sur ce protocole et par une combinaison de culture en suspension SFEB et de cultures adhérentes sur différents revêtements en présence de morphogènes spécifiques, d'autres groupes ont apporté des changements permettant d'obtenir des quantités plus importantes de progéniteurs rétiniens et de photorécepteurs précurseurs et matures (Osakada *et al.*, 2008 et 2009, Hiramani *et al.*, 2009, Lamba *et al.*, 2010). En 2011, le groupe de David Gamm ajouta une troisième étape de repiquage manuel permettant la sélection des structures 3D neuro-épithéliales apparentes (Meyer *et al.*, 2011). Ces structures expriment les EFTFs et présentent un profil génétique proche de celui des progéniteurs rétiniens des vésicules optiques lors du développement rétinien *in vivo*. Dans cette étude, a été démontrée que l'expression endogène de DKK1 et NOGGIN est suffisante pour induire la formation de ces structures sans l'addition de facteurs exogènes. Après isolement et resuspension, ces structures de type vésicule optique continuaient de se différencier vers le lignage des photorécepteurs avec l'expression de CRX et RECOVERINE entre 45 et 60 jours de cultures, et l'expression de marqueurs de photorécepteurs matures (RHODOPSINE ou S-OPSINE) après 100 jours de culture (Meyer *et al.*, 2011, Phillips *et al.*, 2012). Il est important de noter, que ces structures perdaient rapidement leur lamination, caractéristique de la rétine neurale.

A la même période, à partir de cellules ES de souris, Eiraku *et al.*, ont mis au point un protocole innovant permettant la formation de structures auto-organisées rétiniennes en trois dimensions. Ces structures se replient sur elles-mêmes de manière spontanée pour générer une cupule bistratifiée récapitulant ainsi les mouvements morphogénétiques observés lors du développement de la rétine *in vivo* (Eiraku *et al.*, 2011). Ce protocole fut ensuite adapté par la même équipe aux cellules ES humaines tout en observant des résultats similaires. En effet, en 2012, Nakano *et al.*, ont mis en place un protocole de différenciation de cellules ES humaines permettant la formation de structures similaires à la vésicule optique que l'on appelle organoïdes rétiniens, composés de deux couches superposées (Nakano *et al.*, 2012). Comme dans le développement de l'œil, la partie interne se différencie en rétine neurale et la partie externe en épithélium pigmentaire (Figure 25). Une adaptation simplifiée de ces protocoles 3D/2D/3D par Zhong *et al.*, démontre l'obtention de cellules de types vésicules optiques à partir de cellules iPS humaines contenant notamment des photorécepteurs matures (photorécepteurs à cônes et à bâtonnets) fonctionnels capables pour certains de répondre à des stimuli lumineux (Zhong *et al.*, 2014).

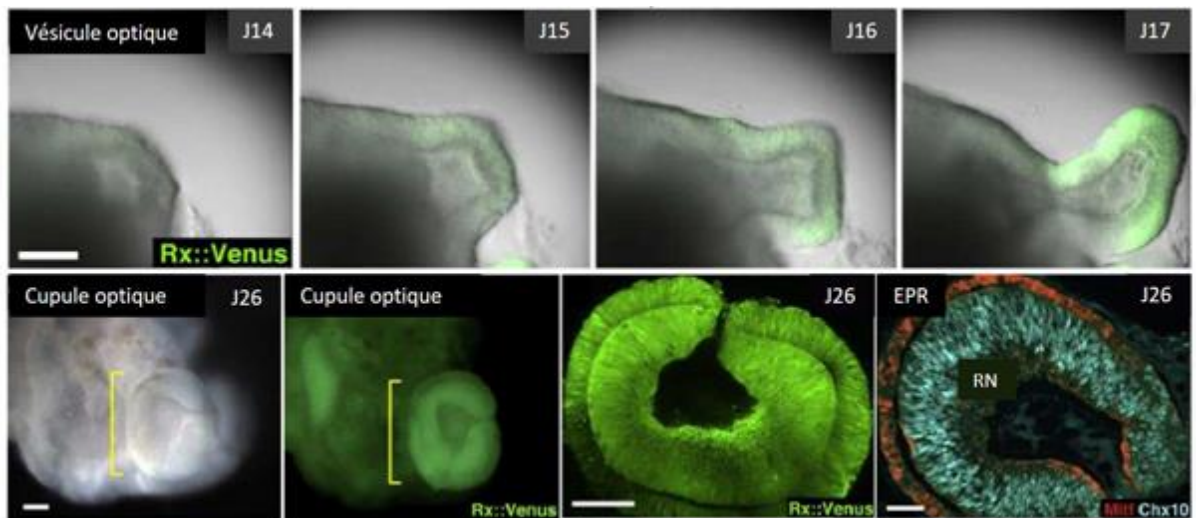


Figure 25: Autoformation de structures organisées de type cupules optiques à partir de cellules souches embryonnaires. Adapté de [Nakano et al., 2012](#).

Dans le but d'une potentielle application clinique, il est nécessaire de développer des protocoles simples, robustes et reproductibles en réduisant le recours à des facteurs exogènes et sérum. Notre équipe a ainsi développé un protocole de différenciation rétinienne basée sur la confluence de cellules iPS humaines adhérentes, en contournant la formation de corps embryoides et leur mise en culture adhérente dans un second temps (Reichman *et al.*, 2014, Reichman *et al.*, 2017). Les auteurs démontrent qu'en l'absence du facteur de pluripotence FGF2, les cellules iPS subconfluentes sont capables de produire Dkk1 et Noggin, deux inhibiteurs des voies de signalisation WNT et BMP/TGF β (inhibition primordiale chez l'embryon pour la différenciation du neuroectoderme et la spécification de la rétine). De par la présence de supplément N2, les cellules iPS peuvent se différencier en structures neuro-épithéliales auto-organisées (Figure 26). Ces structures présentent un phénotype de vésicule optique similaire à ce qui est observé au cours du développement embryonnaire et révélé par le profil d'expression de facteurs de transcription spécifiques tels que PAX6, RAX, VSX2 et MITF. La mise en culture en suspension de ces structures permet dans un second temps la formation d'organoïdes rétiniens contenant l'ensemble des types cellulaires d'une rétine mature humaine (Reichman *et al.*, 2014, Reichman *et al.*, 2017). Si les organoïdes âgés de 28-42 jours sont majoritairement composés de progéniteurs rétiniens en prolifération, une séparation en deux couches est observable dès le 35^{ème} jour avec une couche externe et une couche interne correspondant respectivement à la future couche des photorécepteurs et à celle des neurones internes et ganglionnaires. Dans les stades tardifs, les photorécepteurs matures sont discernables avec la formation de segments externes et internes (Reichman *et al.*, 2014, Reichman *et al.*, 2017)

Une optimisation récente de ce protocole cherchant à générer des organoïdes présentant une structure pseudo-laminée similaire à la rétine humaine *in vivo* avec la présence de segments externes des photorécepteurs (Slembrouck-Brec *et al.*, 2019). Ce protocole consiste à cultiver les organoïdes dans un milieu proneural plus riche, supplémenté en sérum, en glutamine, et précurseur d'acide rétinoïque (vitamine A) sur un temps défini, ayant déjà démontré leur bénéfice sur la survie des cellules rétinienne différenciées à partir de cellules iPS humaines (Zhong *et al.*, 2014). D'autres groupes proposent également des protocoles uniquement en 2D, où des tissus 3D rétiniens étaient générés et maintenus sur du Matrigel en utilisant du milieu neurobasal supplémenté de N2 et B27 avec l'addition de Noggin, remplacé ensuite par du Dkk1 et de l'IGF-1. La limite de cette méthode réside dans l'impossibilité de cultiver ces tissus rétiniens sur plus de 10 à 12 semaines empêchant alors la maturation des cellules rétinienne incluant celle des photorécepteurs (Singh *et al.*, 2015). Différentes approches ont été développées à partir de CSPH et sont en cours de développement afin d'augmenter le taux de génération de cellules rétinienne spécifiques (Tableau 4).

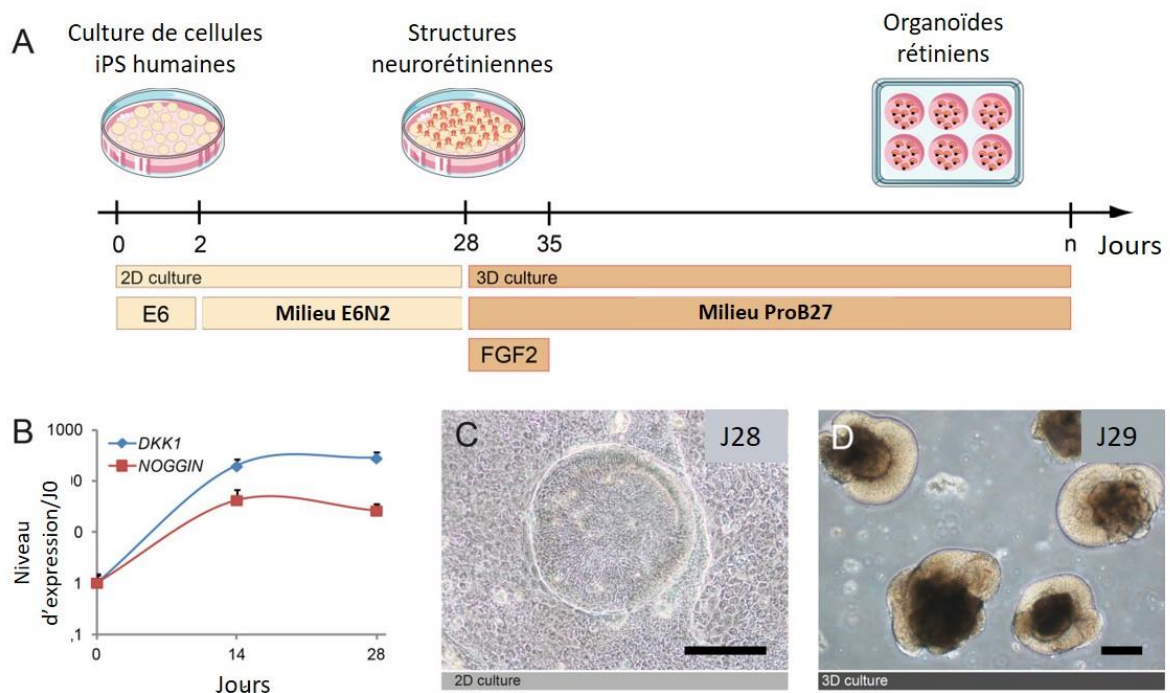


Figure 26: Protocole de différenciation de cellules iPS en organoïdes rétiniens (A) Protocole de différenciation d'organoïdes rétiniens à partir de cellules iPS (B) Analyse RT-qPCR de *DKK1* et *NOGGIN* pendant la différenciation à J0, J14, et J28. (C) Structures neuro-rétiniennes adhérentes à J28. Échelle = 100 μ m. (D) Morphologie des organoïdes rétiniens isolés à J29. Échelle = 100 μ m. Adapté de Reichman *et al.*, 2017.

Référence	Source cellulaire	Protocole de différenciation	Suppléments/facteurs utilisés	Marqueurs des photorécepteurs et temps d'apparition
Lamba et al., 2006	Cellules ES, Cellules iPS (fibroblastes)	Cultures flottantes (EB ou petits amas cellulaires), suivies d'un ensemencement (sur Matrigel)	N2 et B27/IGF-1, Dkk1, Noggin et FGF2 pendant 3 semaines	CRX, NRL (J20), RECOVERINE, RHODOPSINE, S-OPSINE (J60)
Jin et al., 2011 Fumitaka Osakada et al. 2008 Osakada et al., 2009	Cellules ES, Cellules iPS (fibroblastes)	Cultures flottantes (agrégats de type EB), suivies d'un réensemencement (sur polylysine/laminine/fibronectine)	N2/Dkk1 (ou CXI-7), Lefty (ou SB431542), acide rétinoïque et taurine	CRX, RECOVERINE (J50), NRL, RHODOPSINE, OPSINE (J120)
Meyer et al., 2011	Cellules ES, Cellules iPS (fibroblastes, cellules T)	Cultures flottantes (amas cellulaires), suivies d'un ensemencement (sur laminine) et isolation (J20-25) des structures type vésicules optiques (culture en suspension)	N2 et B27/optionnel : Noggin (ou Dorsomorphine) et Dkk1 (ou XAV939)	CRX, NR1, RECOVERINE (J40 -J70), RHODOPSINE, S-OPSINE (J80-J100)
Amirpour et al., 2011	Cellules ES	Cultures de cellules adhérentes suivies par une isolation de structures type tube neural (J16) et ensemencement (sur laminine/poly-ornithine)	N2 et B27/IGF-1, Dkk1, Noggin, FGF2 et Shh (optionnel)	RHODOPSINE, S-OPSINE (J40-J50)

Mellough <i>et al.</i> , 2012	Cellules ES, Cellules iPS (fibroblastes)	Cultures flottantes (amas cellulaires), suivie par une isolation (J30) et ensemencement (sur laminine/poly- ornithine)	N2 et B27/IGF-1, Dkk1, Noggin, Lefty, SHH, T3, FGF2, acide rétinoïque et Taurine	RHODOPSINE, S-OPSINE (J45-J60)
Nakano <i>et al.</i> , 2012	Cellules ES	Cultures flottantes (agrégats de type EB) dans 1% de Matrigel : auto-formation de structures type cupules optiques	KSR, FBS, N2/IWR1e (inhibiteur Wnt), SAG (SHH mimétique), CHIR99021 (inhibiteur GSK3), acide rétinoïque et taurine	CRX, RECOVERINE (J35 -40) NRL; RHODOPSINE, S-OPSINE (J120)
Boucherie <i>et al.</i> , 2013	Cellules hES, Cellules hiPS	Cultures flottantes (amas cellulaires) en présence de Matrigel	N2 et B27/SHH, T3, FGF1, FGF2, Acide rétinoïque et Taurine	CRX (J10), RHODOPSINE (J30)
Tucker <i>et al.</i> , 2013	Cellules iPS (fibroblastes, kératinocytes)	Cultures flottantes (agrégats de type EB) suivies d'une isolation (J5) et ensemencement (synthemax culture plates): auto-formation de structure type de cupule optique	N2 et B27/IGF-1, Dkk1, Noggin, FGF2, DAPT et FGF1	RECOVERINE (J90), RHODOPSINE (J120)
Yanai <i>et al.</i> , 2013	Cellules ES	Cultures flottantes suivies par une isolation (J4) et ensemencement (revêtement Matrigel)	N2 et B27/Noggin, Dkk1, IGF1, FGF2, taurine et T3	CRX (J20)

Zhong <i>et al.</i> , 2014	Cellules iPS (fibroblastes)	Cultures flottantes (amas cellulaires), suivies d'un ensemencement (revêtement Matrigel) et isolation (J21-28) de structures rétinienne (culture en suspension)	N2 et B27 et FBS/Héparine, Acide rétinoïque et taurine	RECOVERINE (J100), TRANSDUCINE, RHODOPSINE, S- OPSINE, L/M-OPSINE (J120-150)
Reichman <i>et al.</i> , 2014	Cellules hES, Cellules hiPS (fibroblaste)	Cultures flottantes (amas cellulaires) sur Matrigel suivies par isolation (jour 5) et ensemencement (sur Matrigel)	N2 et B27	CRX (J20 -40)
Wang <i>et al.</i> , 2015	Cellules ES	Cultures de cellules adhérentes suivies d'une isolation (J16) de structures neuro- épithéliales (culture en suspension)	N2 et KSR/FGF2, Nicotinamide	CRX (J40-45)
Mellough <i>et al.</i> , 2015	Cellules ES	Cultures flottantes (amas cellulaires)	KSR, N2 et B27/IGF-1, Dkk1, Noggin, Lefty, SHH, T3, FGF2, Acide rétinoïque et taurine	S-OPSINE (J30), CRX, RECOVERINE, RHODOPSINE (J90)
Singh <i>et al.</i> , 2015	Cellules ES	Cultures de cellules adhérentes (revêtement Matrigel)	N2 et B27/IGF-1, Dkk1, Noggin, FGF2 et FGF9	CRX (J40-45), RECOVERINE, No NRL, RHODOPSINE, PNA

Zhou et al., 2015	Cellules ES	Cultures flottantes (agrégats de type EB), suivies par ensemencement (sur Matrigel)	N2 et B27/IGF-1, Dkk1, Noggin, FGF2 et COCO	CRX, S-OPSINE (J21)
Barnea-Cramer et al., 2016	Cellules hES, Cellules hiPS	Cultures de cellules adhérentes (revêtement Matrigel), suivies par culture de sphères neurales (J19-23) et réensemencement sur revêtement Matrigel	N2 et B27/Insuline, Noggin, BDNF, CTNF, DAPT et RA	CRX, NR1, NR2E3 (J90-J100)
Völkner et al., 2016	Cellules ES	Cultures flottantes (agrégats de type EB) dans 2% de Matrigel : auto formation de structure type cupules optiques, suivies par (J18) dissection d'organoïdes rétiniens manuellement	KSR, FBS, N2/IWR1e, SAG, EC23 (rétinioïde synthétique)	<i>Non rapporté</i>
Reichman et al., 2014; Sacha Reichman et al., 2017	Cellules iPS (fibroblates)	Cultures de cellules adhérentes suivies d'une isolation (J28) de structures rétiniennes neurales (culture en suspension)	N2/B27	CRX (J25-30), RECOVERINE, CD73 (J35-50), RHODOPSINE, L/M-OPSINE (J120-150)
Wahlin et al., 2017	Cellules hES, Cellules hiPS	Cultures flottantes (agrégats de type EB) dans 1% de Matrigel : auto formation de structure type cupules optiques	B27 FBS/IWR1, SAG, RA, DAPT et taurine	RECOVERINE (J45), L/M-OPSINE (J160)

Gonzalez-Cordero et al., 2017	Cellules hES, Cellules hiPS	Culture de cellules adhérentes suivies par isolation (D28-49) de vésicules neurorétiniennes (culture en suspension)	N2 et B27 et FBS/RA et taurine	RECOVERINE (J70), RHODOPSINE (J105), S-OPSINE (J84), L/M-OPSINE (J120)
Capowski et al., 2019	Cellules hES, Cellules hiPS	Cultures flottantes (agrégats de type EB) dans 1% de Matrigel et repiquage pour culture en suspension	B27,FBS, taurine, acide rétinolique et BMP4	RHODOPSINE L/M-OPSINE maintenus jusqu'à J470
Kaya et al., 2019	Cellules hES, Cellules hiPS	Cultures flottantes (agrégats de type EB) et repiquage structure type VO pour culture en suspension	B27,FBS, taurine, et 9 cis-rétinal	RHODOPSINE (J120) , S OPSIN (J90) , L/M-OPSINE (J120)
Slembrouck and Rodrigues et al., 2019	Cellules hiPS	Cultures de cellules adhérentes suivies d'une isolation (J28) de structures rétiniennes neurales (culture en suspension)	N2, B27, Glutamax, FBS, vitamine A	CRX (J56) , RHODOPSINE, S OPSIN, L/M-OPSINE (J175)
Gonzales-Cordoro et al., 2022	Cellules hES, Cellules hiPS	Culture de cellules adhérentes suivies par isolation (D28-49) de vésicules neurorétiniennes (culture en suspension)	N2 et B27 et FBS/RA et taurine , Acide docosahexaénoïque, fatty acid-free BSA	RECOVERINE (J70), RHODOPSINE (J105), S-OPSINE (J84), L/M-OPSINE (J120) et Amélioration du développement des segments externes (J182) avec PERIPHERIN-2 , MITOCHONDRIA

Tableau 4: Les différents protocoles de différenciation de cellules souches pluripotentes humaines en photorécepteurs.

Les cellules pluripotentes peuvent se différencier en cellules de la rétine neurale mais également en cellules de l'épithélium pigmentaire (Dehghan et al., 2022) en jouant également sur les systèmes alternatifs de cultures 2D et 3D, et l'ajout de facteurs et suppléments orientant cette fois si la différenciation vers un lignage EPR (Tableau 5). Deux méthodes sont utilisées pour cela: la première est basée sur la capacité des cellules pluripotentes à se différencier spontanément en cellules de l'EPR en utilisant un système de culture adhérente; la seconde méthode inclut une étape de formation de corps embryoides ou structures 3D comme précédemment vu (Brandl et al., 2019).

Référence	Source	Protocole de différenciation	Suppléments/facteurs utilisés	Temps de différenciation
Osakada <i>et al.</i> , 2008	Cellules hES	3D (SFEB) puis adhérent (poly-D-lysine/laminine/fibronectine)	Activine, Lefty A et Dkk-1	J60
Vugler <i>et al.</i> , 2008	Cellules hES	adhérent - spontanée	FGF2	J7 à J21
Meyer <i>et al.</i> , 2009	Cellules hES, Cellules hiPS	3D (EB) puis adhérent (laminine)	N2, héparine	J40
Hirami <i>et al.</i> , 2009	Cellules hiPS	3D (SFEB) puis adhérent (poly-D-lysine/laminine/fibronectine)	Lefty A et Dkk-1	J35
Osakada <i>et al.</i> , 2009	Cellules hES, Cellules hiPS	3D (SFEB) puis adhérent (poly-D-lysine/laminine/fibronectine)	Y-27632, CKI-7 et SB431542	J40-60
Idelson <i>et al.</i> , 2009	Cellules hES	3D puis adhérent (laminine)	Activine 1, SB431542, TGF β 1 et FGF2	J28
Nistor <i>et al.</i> , 2010	Cellules hES	3D puis adhérent (collagène)	T3, taurine, acide hyaluronique, Dkk1, Lefty A, FGF, acide rétinoïque et B27	J35-40
Zahabi <i>et al.</i> , 2012	Cellules hiPS	adhérent (Matrigel)	Noggin (SB431542), FGF2, acide rétinoïque et Shh	J60

Kokkinaki et al., 2011	Cellules hiPS	3D (SFEB) puis adhérent (poly-D-lysine/laminine)	SVF, nicotinamide, SB431542 et activine A	J28
Zhu et al., 2011	Cellules hES, Cellules hiPS	3D (EB) et adhérent (Geltrex)	SVF, Matrigel, N2, B27, Noggin, Dkk1, IFG1, FGF2 et Activine 1	J28-56
Krohne et al., 2012	Cellules hiPS	Adhérent (Matrigel)	Nicotinamide et activine A	J42
Nakano et al., 2012	Cellules hES, Cellules hiPS	3D (EB- Matrigel)	Matrigel, IWR1, FBS, SAG et CHIR99021	J26
Phillips et al., 2012	Cellules hiPS	3D (EB) puis adhérent (laminine)	N2, héparine	J40-50 jour
Buchholz et al., 2013	Cellules hES, Cellules hiPS	Adhérent (Matrigel)	Noggin, IGF1, Dkk1, NIC, FGF2, Activine A, SU5402, et VIP	J14
Singh R et al., 2013	Cellules hiPS	3D (EB) puis adhérent (laminine)	N2, B27, sérum	J30-40
Maruotti J et al., 2013	Cellules hES, Cellules hiPS	Adhérent (Matrigel)	B27	J50
Zhong et al., 2014	Cellules hiPS	3D (EB- Matrigel)	N2, B27, héparine	J21-28

Lane et al., 2014	Cellules hES	Adhérent	Dorsomorphine	–
Reichman et al., 2014 2017	Cellules hiPS	Adhérent	N2	J30-48
Leach et al., 2015	Cellules hES	Adhérent	Noggin, IGF1, Dkk1, NIC, FGF2; activine A, SU5402, et CHIR99021 ou VIP	J14
Choudhary et al., 2017	Cellules hES, Cellules hiPS	Adhérent (Matrigel ou Cell-Start)	LDN-193189 SB-431542 BMP 4/7 Activine A	J45
Takao et al., 2019	Cellules hiPS	Adhérent-Spontané	PD0325901, PD173074, Gö6983, LDN-193189, CHIR99021, SB431542, SAG, SU5402, CKI-7 and Fasudil	J14-J21

Tableau 5: Les différents protocoles de différenciation de cellules souches pluripotentes humaines en cellules de l'EPR. Adapté de [Leach et al., 2015](#)

3. Applications des CSPh en ophtalmologie

L'utilisation des cellules iPS ouvre ainsi la voie à de nombreuses études de recherche fondamentale et clinique allant de la compréhension du développement humain à la thérapie cellulaire en passant par la recherche pharmacologique. De plus, la possibilité de générer des cellules iPS à partir de cellules somatiques de patients permet de modéliser diverses pathologies et ainsi de mieux les comprendre et de développer de nouvelles applications thérapeutiques (Figure 27).

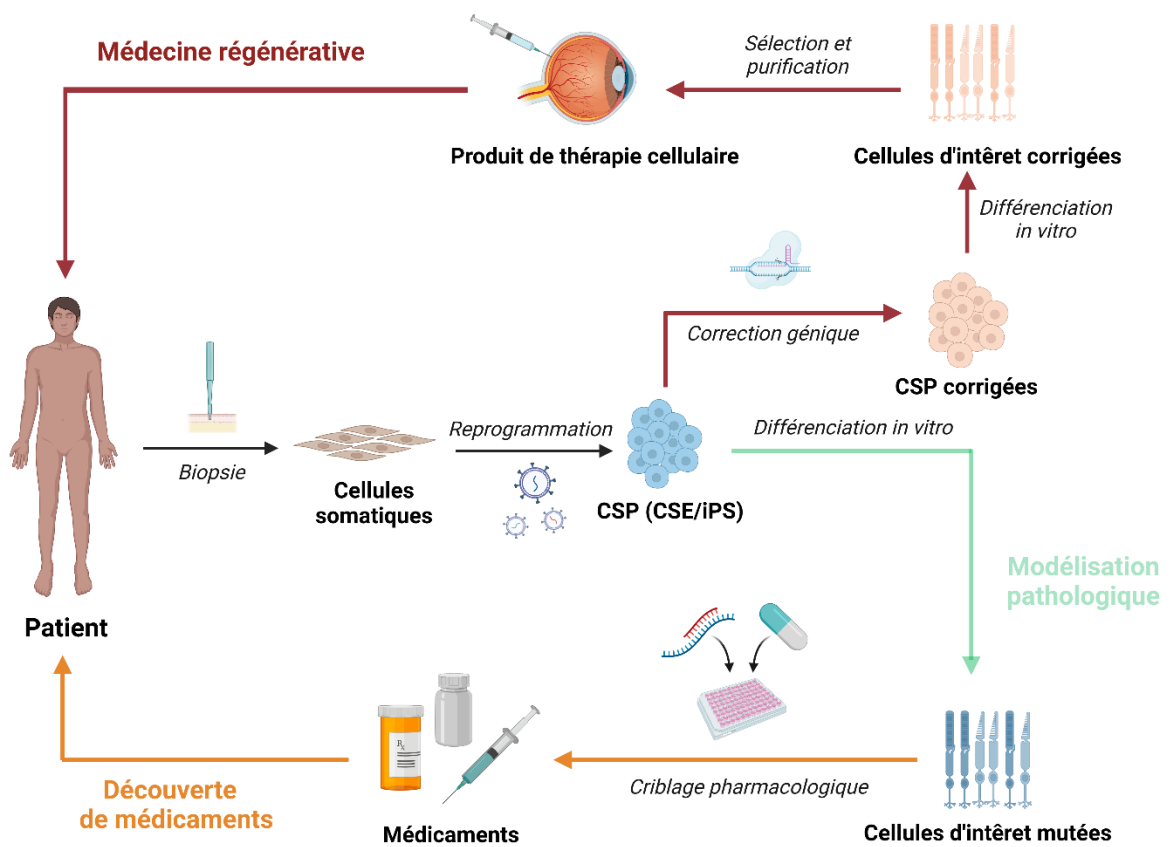


Figure 27 : Les potentielles applications des cellules souches induites à la pluripotente issues de cellules iPS de patients. Créée avec Biorender.com

a. La médecine régénérative

La « médecine régénérative » représente l'utilisation des produits biologiques à des fins de reconstruction de tissus et organes. De nos jours, celle-ci repose notamment sur la thérapie cellulaire à partir des cellules souches pluripotentes qui ont permis de générer des quantités potentiellement illimitées de cellules rétinienne humaines à partir de cellules ES ou de cellules iPS, offrant alors des alternatives aux greffes d'organes traditionnelles. L'utilisation des CSPh dans les transplantations doit tenir compte de plusieurs critères conditionnant la sécurité et l'efficacité de celle-ci incluant la qualité génétique des cellules sources utilisées, la pureté des cellules injectées, la survie et l'intégration post-transplantation.

Les deux principales sources cellulaires à des fins de transplantation pour les RPs sont les cellules de l'EPR et les photorécepteurs, qui sont perdus au cours de la maladie (Barber *et al.*, 2013). La transplantation des cellules de l'EPR peut être réalisée sous forme de suspension cellulaire ou sous forme de feuillet cellulaire (dits sheets). Dans des modèles de dégénérescence murins (rat RCS), a été observé un ralentissement de la dégénérescence des photorécepteurs et une préservation des fonctions visuelles à la suite de transplantation de cellules de l'EPR dérivées de CSPh (Idelson *et al.*, 2009, Carr *et al.*, 2009, Lu *et al.*, 2009, Vugler *et al.*, 2015). Concernant la transplantation sous forme de feuillets, la viabilité des cellules de l'EPR dérivées de cellules ES après transplantation dans l'espace sous-rétinien de rats nude était plus élevée lorsqu'elles étaient délivrées sous forme de feuillet plutôt que de suspension cellulaire (Diniz *et al.*, 2013). Il en est de même pour l'amélioration de la fonction visuelle après transplantation de cellules EPR dérivées de cellules ES et cellules iPS dans des modèles de rats RCS et modèle porcine (Ben M'Barek *et al.* 2017, Sharma *et al.*, 2019). De même que pour les cellules de l'EPR dérivées de CSPh, les cellules photoréceptrices à différents stades de différenciation peuvent être délivrées sous forme de suspension cellulaire ou sous forme de feuillet organisé. Les premières transplantations de photorécepteurs dérivés de cellule ES humaines ont été entreprises par le groupe de T. Reh (Lamba *et al.*, 2009, Lamba *et al.*, 2010). En se basant sur leur protocole de différenciation de cellule ES générant des cultures enrichies à 80% de cellules rétinienne (Lamba *et al.*, 2006), ils ont pu transplanter et suivre *in vivo* jusqu'à 6 semaines post injection les photorécepteurs transplantés exprimant une protéine fluorescente verte (GFP) chez des souris *Crx*^{-/-}. Deux à trois semaines post injection sous-rétinienne, une restauration partielle de la réponse à la lumière a été détectée par analyse électrorétinographique dans les yeux ayant reçu l'injection comparativement aux yeux contralatéraux non injectés (Lamba *et al.*, 2009). La même équipe entreprit plus récemment des essais de transplantation chez des primates non humains mais aucun photorécepteur marqué (GFP+) n'a été détecté dans la rétine de l'hôte (Chao *et al.* 2017). La transplantation de feuillet de cellules rétinienne dérivées de CSPh a été également réalisée dans divers modèles animaux (Iraha *et al.*, 2018 ; McLelland *et al.*, 2018 ; Shirai *et al.*, 2016 ; Tu *et al.*, 2019).

Les résultats encourageants de transplantation de cellules rétiniennes dérivées de CSPh chez les divers modèles animaux ont mené à la mise en place d'une application clinique chez l'Homme. La première étude clinique utilisant des cellules de l'EPR dérivées de cellules ES humaines a été entreprise par Schwartz *et al.*, en 2011 ([NCT01345006](#) et [NCT01344993](#)). Dans cet essai clinique de phase I/II approuvé par la FDA, des patients présentant des formes avancées de la maladie de Stargardt ou de la forme atrophique (sèche) de la DMLA ont reçu sous forme de suspension cellulaire une faible dose de cellules (50 000 à 150 000) dans l'espace sous-rétinien ([Schwartz *et al.*, 2012](#)). L'objectif principal de l'essai était d'évaluer la sécurité et la tolérance, et aucun événement indésirable majeur n'a été signalé. Bien que des améliorations mineures de la meilleure acuité visuelle corrigée (BCVA) aient été rapportées pour 6/14 sujets au cours du suivi de 12 mois, celles-ci n'étaient pas corrélées au nombre de cellules transplantées et il n'y avait pas de preuve évidente d'efficacité. Le groupe du Dr. Masayo Takahashi (RIKEN à Kobe, Japon, septembre 2014) a réalisé le premier essai clinique utilisant des feuillets de cellules de l'EPR dérivées de cellules iPS humaines ([UMIN000011929](#)) chez une patiente atteinte de DMLA de type humide après reprogrammation de ses propres fibroblastes. Cependant l'étude a été interrompue en mars 2015 après la découverte de mutations génétiques dans les cellules thérapeutiques qui n'étaient pas présentes dans les cellules d'origine dont elles étaient issues ([Garber *et al.*, 2015](#)). Une transplantation cette fois ci allogénique a été entreprise par la suite chez un patient atteint de DMLA humide. Depuis, d'autres essais cliniques ont été entrepris dont la majorité se base sur la transplantation de cellules de l'EPR dérivées de CSPh pour la DMLA ou la maladie de Stargardt (Tableau 6).

Etude	Sponsor/Collaborateur	Cellules greffées	Phase	Nombre de sujets	Période	Statut	Study IDa
A study of transplantation of autologous induced pluripotent stem cell (iPSC) derived retinal pigment epithelium (RPE) cell sheet in subjects with exudative age-related macular degeneration	The Laboratory for Retinal Regeneration, RIKEN Center for Developmental Biology	Feuillet cellules de l'EPR dérivées iPS	I	1	Octobre 2013/ Septembre 2018	Complète	UMIN000011929
Interventional Study of Implantation of hESC-derived RPE in Patients With RP Due to Monogenic Mutation	Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie (CHNO) des Quinze-Vingts, Paris, France, 75012	Feuillet cellules de l'EPR dérivées de hES	I/II	12	Août 2019/ Décembre 2026	En recrutement	NCT03963154
Autologous transplantation of induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium for geographic atrophy associated with age-related macular degeneration	National Institutes of Health Clinical Center, Bethesda, D, USA	Feuillet cellules de l'EPR/PGLA dérivées iPS	I/II	20	July 2020/Mars 2029	En recrutement	NCT04339764
A study of implantation of retinal pigment epithelium in subjects with acute wet age-related macular degeneration	Moorfields Eye Hospital NHS Foundation Trust, London, UK	PF-05206388	I	2	Juin 2015/Décembre 2019	Actif, pas en recrutement	NCT01691261
Study of subretinal implantation of human embryonic stem cell-derived RPE cells in advanced dry AMD	Retinal consultants of Arizona LTD, Phoenix, AZ, USA/Retina-Vitreous Associates Medical Group, Beverly Hills, CA, USA and others	CPCB-RPE1 (Cellules de l'EPR dérivées hES)	I/IIa	16	July 2019/Juin 2023	Actif, pas en recrutement	NCT02590692
A study of transplantation of allogeneic induced pluripotent stem cell (iPSC) derived retinal pigment epithelium (RPE) cell suspension in subjects with neovascular age-related macular degeneration	The Laboratory for Retinal Regeneration, RIKEN Center for Developmental Biology	Cellules EPR dérivées iPS	I	5	Février 2017/Octobre 2021	Actif, pas en recrutement	UMIN000026003
Safety and tolerability of subretinal transplantation of human embryonic stem cell derived retinal pigmented epithelial (hESC-RPE) cells in patients with Stargardt's macular dystrophy (SMD)	Astellas Institute for Regenerative Medicine/Astellas Pharma Inc., USA	Cellules de l'EPR dérivées hES (MA09-hRPE)	I/IIa	15	Novembre 2011/Septembre 2015	Complète	NCT01469832

A follow-up study to determine the safety and tolerability of subretinal transplantation of human embryonic stem cell derived retinal pigmented epithelial (hESC-RPE) cells in patients with Stargardt's macular dystrophy (SMD)	Astellas Institute for Regenerative Medicine/Astellas Pharma Inc., USA	Cellules de l'EPR dérivées hES (MA09-hRPE)		12	Janvier 2013/Octobre 2019	Complète	NCT02941991
Subretinal transplantation of hESC derived RPE(MA09-hRPE) cells in patients with Stargardt's macular dystrophy	Astellas Institute for Regenerative Medicine/Astellas Pharma Inc., USA	Cellules de l'EPR dérivées hES (MA09-hRPE)	I/IIa	13	Avril 2011/Août 2015	Complète	NCT01345006
Safety and tolerability of subretinal transplantation of hESC derived RPE (MA09-hRPE) cells in patients with advanced dry age-related macular degeneration	Astellas Institute for Regenerative Medicine/Astellas Pharma Inc., USA	Cellules de l'EPR dérivées hES (MA09-hRPE)	I/IIa	13	Avril 2011/Août 2015	Complète	NCT01344993
A Phase I/IIa, open-label, single-center, prospective study to determine the safety and tolerability of subretinal transplantation of human ES cell derived RPE (MA09-hRPE) cells in patients with advanced dry age-related macular degeneration (AMD)	Astellas Institute for Regenerative Medicine/Astellas Pharma Inc., USA	Cellules de l'EPR dérivées hES (MA09-hRPE)	I/IIa	12	Septembre 2012/Juin 2020	Pas en recrutement	NCT01674829
A Phase I, open-label, prospective study to determine the safety and tolerability of subretinal transplantation of human embryonic stem cell derived retinal pigmented epithelial (MA09-hRPE) cells in patients with Stargardt's macular dystrophy(SMD)	CHABiotech Co., Ltd	Cellules de l'EPR dérivées hES (MA09-hRPE)	I	3	Septembre 2012/Mars 2015	Inconnu	NCT01625559
A safety surveillance study in subjects with macular degenerative disease treated with human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelial cell therapy	Astellas Institute for Regenerative Medicine/Astellas Pharma Inc., USA	Cellules de l'EPR dérivées hES (MA09-hRPE)	I/IIa	36	Janvier 2018/Décembre 2029	Sur invitation	NCT03167203
A Phase I/IIa, open-label, single-center, prospective study to determine the safety and tolerability of subretinal transplantation of human ES cell derived RPE (MA09-hRPE) cells in patients with advanced dry age-related macular degeneration (AMD)	Astellas Institute for Regenerative Medicine/Astellas Pharma Inc., USA	Cellules de l'EPR dérivées hES (MA09-hRPE)	I/IIa	12	Septembre 2012/Juin 2020	Actif, pas en recrutement	NCT01674829
Safety and efficacy study of OpRegen for treatment of advanced dry-form age-related macular degeneration	Lineage Cell Therapeutics, Inc./CellCure Neurosciences Ltd., Israel	OpRegen	I/II	24	Août 2015/Décembre 2024	En recrutement	NCT02286089

Safety study of allogeneic HiPSC-retinas in retinitis pigmentosa	Sumitomo Dainippon Pharma	Feuillets de rétine allogéniques dérivés iPS	I	2	Juin 2020/Septembre 2022	Actif,, pas en recrutement	jRCTa050200027
Clinical research of allogeneic iPSC-RPE cell suspension transplantation for RPE impaired disease	Kobe Eye Hospital	Suspension cellules EPR dérivées iPS	I/II	50	Janvier 2021/Février 2031	En recrutement	jRCTa050200122

Tableau 6: Essais cliniques se basant sur des cellules rétiniennes dérivées de cellules souche pluripotentes humaines.

b. La modélisation des pathologies

Un des stéréotypes liés aux cellules iPS est que leur meilleure application médicale est la thérapie par transplantation de cellules. Cependant, la modélisation de maladies *in vitro* et la découverte de nouveaux médicaments sont au moins aussi importants que la thérapie cellulaire. L'utilisation des modèles animaux en particulier celui de la souris dont les caractéristiques génétiques sont aujourd'hui bien définies a permis depuis de nombreuses années d'élargir nos connaissances dans le domaine de la modélisation pathologique. Cependant l'expérimentation animale connaît de multiples limites. Dans un premier temps, un modèle animal ne peut reproduire totalement les aspects de la biologie et de la maladie humaine. Dans le cas de la souris, il existe des différences majeures avec l'Homme en termes de croissance, de taille, d'anatomie mais aussi de physiologie entraînant alors des disparités dans l'expression de certains gènes. Certains traitements en phase préclinique ayant montré de bons résultats ne sont pas aussi efficaces une fois appliqués chez des patients. Aussi l'usage des animaux dans la recherche entraîne de nombreux débats qui convergent tous vers les mêmes conclusions : « *la recherche biomédicale est une nécessité sociétale ; à défaut de pouvoir expérimenter sur l'homme, l'expérimentation animale est indispensable* » (Russel et al., 1959). Cependant celle-ci doit respecter la règle des 3R (Raffiner, Remplacer, Réduire) énoncée dès 1959 par Russell et Burch Russell (Russel et al., 1959). Enfin les modèles animaux sont coûteux et longs à créer et utiliser. Les limites associées aux modèles *in vivo* ont encouragé le développement et la validation de divers modèles *in vitro* issus de cellules primaires et immortalisées de l'animal et de l'homme. Les modèles basés sur les cellules offrent l'avantage d'être plus simples, plus rapides à construire, relativement moins coûteux et plus reproductibles. Cependant, les modèles *in vitro* basés sur des cellules primaires ont une division et croissance cellulaire limitées et peuvent être difficiles à maintenir en culture. Dans cette optique, par leur capacité de prolifération et de différenciation, les cellules souches pluripotentes offrent de nouvelles perspectives dans la modélisation pathologique.

La modélisation pathologique permet d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires d'une maladie, permettant ainsi la mise en lumière de nouvelles cibles thérapeutiques. Cette approche se révèle pertinente pour des maladies génétiques affectant des tissus difficiles d'accès ou bien des types cellulaires compliqués à amplifier *in vitro* telles que les cellules rétiniennes. Les cellules souches pluripotentes portant des mutations génétiques peuvent être obtenues soit à partir de cellules de patients reprogrammées en cellules iPS ou à partir d'un embryon porteur d'une mutation identifiée lors d'un diagnostic préimplantatoire et enfin; ou par l'introduction de modifications génétiques dans des cellules ES dérivées d'un embryon surnuméraire normal. De nombreux paramètres sont à prendre en considération lors de la modélisation pathologique. Ainsi, toutes les maladies ne sont pas faciles à modéliser. Les maladies monogéniques qui apparaissent précocement permettent de reproduire plus facilement les aspects de la maladie, ce qui n'est pas le cas des maladies polygéniques à apparition

tardive ou des maladies d'origine multifactorielle. En effet, la modélisation de maladies monogéniques permettra de confirmer plus exactement la conséquence de la mutation cible sur le phénotype de la maladie. Un modèle pathologique peut mettre en lumière la cause d'un phénotype anormal d'une cellule ou d'une maladie entraînant alors des symptômes. Dans le cas des dystrophies rétiniennes, un médecin doit d'abord identifier les défauts structurels de la rétine, puis diagnostiquer correctement la dystrophie en question et enfin identifier la mutation génétique associée (Burns *et al.*, 2019). Selon Foltz *et al.*, un modèle pathologique normé remplirait les quatre critères suivants (Figure 28): le modèle inclurait des lignées de cellules souches provenant de plusieurs patients porteurs de la même mutation; le modèle comparerait les cellules issues de patients présentant le phénotype pathologique des patients malades à des cellules ayant été modifiées génétiquement; le modèle inclurait un contrôle supplémentaire de type sauvage, adapté à l'âge et au sexe; et enfin toute restauration fonctionnelle serait liée d'une manière ou d'une autre à la fonction du gène muté. Il n'est cependant pas toujours possible d'atteindre ce niveau de contrôle dans chaque modèle cellulaire.

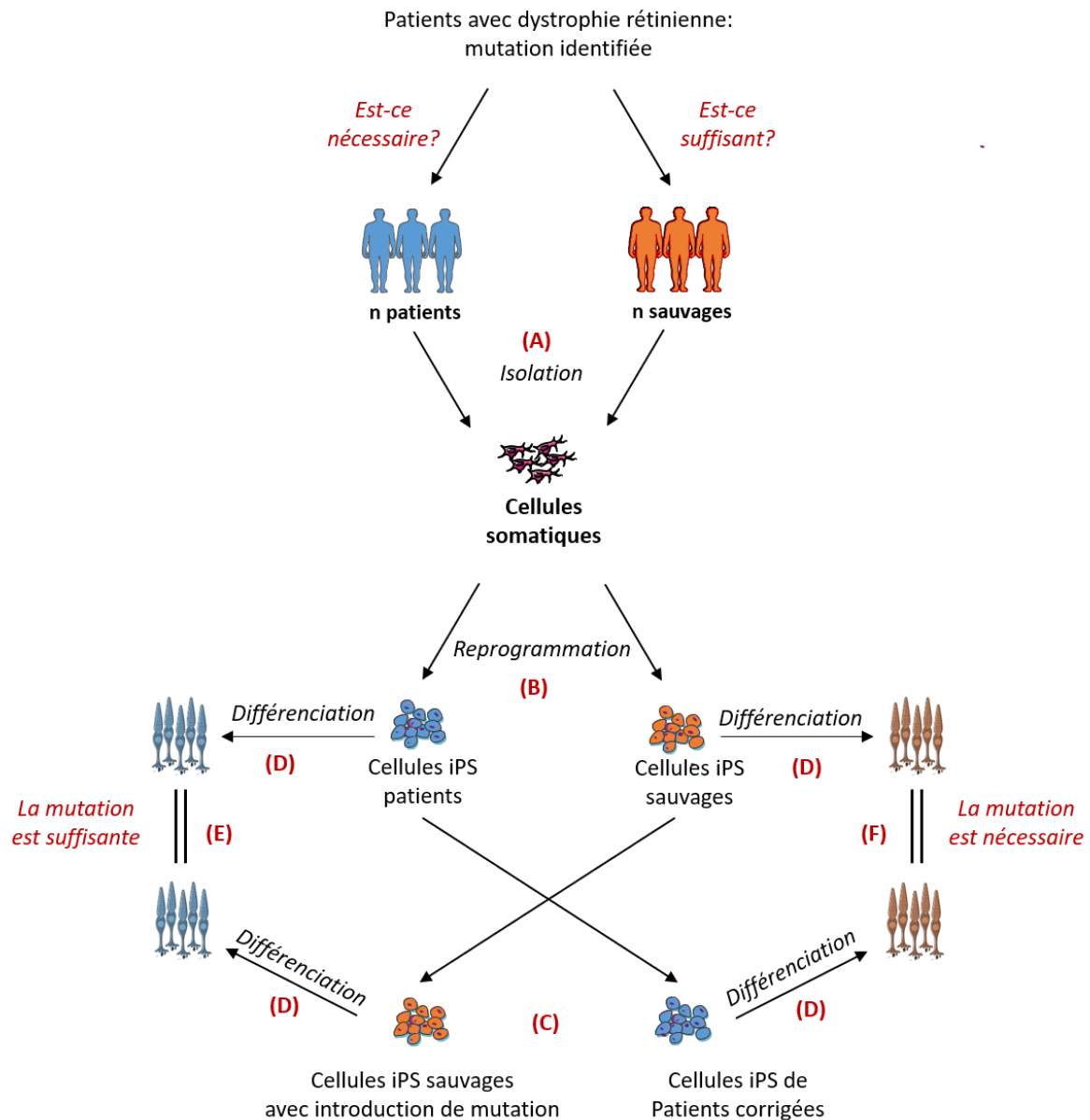


Figure 28 : Workflow pour le design d'un modèle pathologique à partir de cellules iPS. (A) Un ou plusieurs (n) patients et un ou plusieurs (n) individus de type sauvage sont identifiés pour isoler des cellules somatiques et produire des cellules iPS. (B) Lors de la reprogrammation, les cellules du patient porteront la mutation d'intérêt (cellules iPS bleues) et non les cellules de type sauvage (cellules iPS oranges). (C) Des techniques d'édition génomique peuvent être utilisées pour corriger la mutation du patient ou introduire la mutation du patient dans les échantillons de type sauvage. (D) Après la différenciation, les cellules avec et sans mutation peuvent être génétiquement et fonctionnellement analysées. (E) Si l'introduction de la mutation imite les cellules du patient, la mutation est suffisante pour provoquer le phénotype de la maladie observée. (F) Si la correction de la mutation imite les cellules de type sauvage, la mutation est nécessaire pour provoquer le phénotype de la maladie observée. Adapté de [Foltz et Clegg, 2019](#).

En ophtalmologie, si nous prenons l'exemple des RPs, celles-ci représentent un groupe de maladies génétiquement hétérogènes impliquant des mutations dans plus de 80 gènes différents (Bravo-Gil *et al.*, 2017). Il apparaît alors difficile de créer des modèles animaux pertinents pour chacune de ces maladies. Dans ce contexte, les CSPh offrent une opportunité unique de modéliser ces pathologies dont les mécanismes demeurent souvent méconnus. Nous distinguerons par la suite la modélisation pathologique de RPs à partir de cellules rétiniennes en culture adhérente (2D) de celle effectuée à partir d'organoïdes rétiniens (3D).

Modèles pathologiques de rétinopathies pigmentaires en culture adhérente (2D)

Le premier modèle de RP reporté à partir de cellules iPS a étudié cinq lignées cellulaires issues de cinq patients différents couvrant quatre mutations causales connues dans les gènes *RPI* (Axonemal microtubule associated protein), *RP9* (Pim-1 kinase associated protein), *PRPH2* (Periphérin2) et *RHO* (Jin Z-B *et al.*, 2011). Comme observé dans les RPs, les photorécepteurs à bâtonnets dérivés des différentes lignées de cellules iPS dégénéraient *in vitro*. Aussi, des niveaux élevés de protéines liées au stress du réticulum endoplasmique (pour la mutation du gène *RHO*) et au stress oxydatif (pour la mutation du gène *RP9*) ont pu être observés dans une autre étude du même groupe (Jin *et al.*, 2012). Plusieurs groupes ont réussi à modéliser des RPs dues à des mutations dans le gène *RHO* en utilisant des modèles 2D de photorécepteurs. Jin *et al.*, ont étudié la différenciation de cellules iPS porteuses de mutations G188R et Yoshida *et al.*, la mutation E18K démontrant que les photorécepteurs en cours de différenciation présentaient des niveaux élevés de protéines liées au stress du réticulum endoplasmique. Cette mutation E18K pouvait être corrigée dans les cellules iPS des patients par un transfert de gène à l'aide d'un vecteur adénovirus (Yoshida *et al.*, 2014). La technologie des cellules iPS pour des approches de modélisation peut être également utile dans l'identification de nouvelles mutations. En effet, 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 cette forme, qui est l'insertion d'une séquence Alu homozygote dans l'exon 9 du gène *MAK* (*Male germ associated kinase*) perturbant ainsi l'épissage du gène *MAK* et donc la production d'une protéine *MAK* fonctionnelle normalement exprimée dans les segments internes des photorécepteurs, les corps cellulaires et les axones des photorécepteurs à cônes et bâtonnets (Tucker *et al.*, 2011). En 2013, Tucker *et al.*, ont étudié la pathogénicité de mutations dans le gène *USH2A* (*Usherin*) (Tucker *et al.*, 2013) à la base d'une forme de RP autosomique récessive du syndrome de Usher (mutation R419H du gène *USH2A*). A l'aide de techniques de séquençage, l'analyse des transcrits a permis la mise en évidence d'un décalage du cadre de lecture dans l'intron 40 entraînant un codon stop prématuré. Les photorécepteurs dérivés bien que présentant un phénotype normal montraient des niveaux élevés de protéines liées au stress du réticulum endoplasmique suggérant que la pathologie serait induite par un mauvais repliement des protéines *USH2A*. Quand les cellules étaient transplantées dans l'espace sous-

rétinien de souris, les cellules des patients étaient capables de se différencier en photorécepteurs matures. Cela indiquerait alors que ces mutations n'ont pas d'impact sur le développement normal de la rétine mais plutôt sur la survie des photorécepteurs à long terme. D'autres équipes se sont concentrés sur des modèles de RPs ciblant l'EPR. Des mutations dans le gène *MFRP* (*Membrane frizzled related protein*) codant un récepteur spécifique des cellules l'EPR ont été identifiées comme étant à l'origine de RP autosomiques récessives. Les cellules de l'EPR dérivées à partir de cellules iPS de deux patients montrent une désorganisation des fibres d'actine, et une morphologie anormale incluant une faible pigmentation et une perte des jonctions serrées. A l'aide d'un transfert du gène *MFRP* par un vecteur AAV8, ce groupe de chercheurs a permis de retrouver une organisation des fibres d'actine (Li Y et al., 2014). Plus récemment, Schwarz et al., ont dérivé des cellules de l'EPR à partir de cellules iPS d'un patient atteint de RP liée à l'X induit par la mutation non-sens R120X dans le gène *RP2* induisant l'apparition précoce d'un codon stop (Schwarz et al., 2015). Les cellules dérivées présentent des perturbations dans le trafic de l'appareil de Golgi et une mauvaise localisation de la protéine RP2, spécifique du cil. Ce groupe de chercheurs introduisit l'utilisation de molécules capables de réexprimer des gènes porteurs d'une mutation non-sens (en anglais *Translational Read through inducing drugs*, TRIDs) dans le cas de cette mutation dans l'EPR. En 2017, leur utilisation a été étendue à des organoïdes rétiniens (Schwarz et al., 2017). Une autre modélisation pathologique des cellules de l'EPR portée par des mutations dans le récepteur à activité tyrosine kinase MER (myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase) montre des altérations de la phagocytose dans les cellules de l'EPR dérivées de cellules iPS de patient (Lukovic et al., 2015). L'utilisation de TRIDs a permis de restaurer le récepteurs MERTK et de rétablir une phagocytose fonctionnelle (Ramsden et al., 2017).

Modèles pathologiques de rétinopathies pigmentaires à partir d'organoïdes rétiniens

Parmi les premiers travaux de modélisation pathologique sur structures tridimensionnelles, Phillips et al., présente un modèle de la microphthalmie causée par la mutation R200Q sur le gène *VXS2* permettant d'étudier les facteurs de transcription et les voies de signalisation qu'implique ce gène dans le développement précoce de l'œil (Phillips et al., 2014). Conformément au phénotype clinique observé chez des patients atteints de microphthalmie, les vésicules optiques mutantes ont révélé un retard dans la rétino-génèse une perte des cellules bipolaires rétiniennes qui expriment *VXS2* à des stades ultérieurs.

De nombreuses mutations à l'origine de dystrophies rétiniennes sont spécifiquement localisées dans des gènes liés aux cils des photorécepteurs dont notamment le gène *CEP290*, le plus communément muté dans l'amaurose congénitale de Leber et peuvent être modélisées à l'aide d'organoïdes rétiniens (Parfitt et al., 2016). Les organoïdes dérivés des cellules de patients présentaient une ciliogénèse anormale. Des mutations dans le gène *RPGR* (Retinitis pigmentosa GTPase regulator ou RP3) et dans le gène *RP2* sont responsables respectivement de 70-90% et 10-20% des RPs liées à l'X (XLRP) menant

à une perte rapide de la vision chez les enfants de sexe masculin et les jeunes hommes (Breuer *et al.*, 2002). Megaw *et al.*, ont généré par la technologie des organoïdes rétiniens, des photorécepteurs à partir de cellules iPS de patients porteurs d'une mutation dans le gène *RPGR* afin de comprendre son rôle dans la survie et la maintenance des photorécepteurs mais aussi des mécanismes moléculaires entraînant la pathologie. Confirmant les résultats obtenus chez la souris, le gène *RPGR* impliqué dans le trafic de la rhodopsine, interagit et active la Gelsoline, protéine impliquée dans la dépolymérisation des fibres d'actine, directement impliquée dans la formation des cils. Une polymérisation accrue de l'actine, ainsi qu'une perte significative de photorécepteurs ont été observées dans les organoïdes mutants (Megaw *et al.*, 2017). Outre les gènes codant pour les protéines ciliaires, les mutations de deux gènes liés à l'intégrité structurelle de la rétine *RS1* (Huang *et al.*, 2019) et *CRB1* (Quinn *et al.*, 2019) ont été étudiées dans les organoïdes. Tandis que la majorité des gènes responsables de RPs 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* représentent 10% des formes autosomiques dominantes de RP (Rose *et al.*, 2017). Récemment, au sein de l'équipe, il a été possible de récapituler le phénotype de la maladie observé chez les patients en différenciant des cellules iPS humaines, issues de patients portant différentes mutations du gène *PRPF31*, en cellules de l'EPR et en organoïdes rétiniens pseudo-laminés. Les cellules de l'EPR ont présenté une désorganisation caractérisée par un manque d'adhérence et d'adhésion cellule-cellule associée à une atteinte fonctionnelle visualisée par une diminution de la phagocytose des segments externes des photorécepteurs. Au sein des organoïdes obtenus, une dégénérescence des photorécepteurs matures à bâtonnets puis à cônes a été mise en évidence (Rodrigues *et al.*, 2022). La modélisation de dystrophies rétiniennes à l'aide de l'outil des organoïdes rétiniens dérivés de cellules iPS de patients atteints de RP s'est grandement accélérée au cours ces dernières années (Tableau 7).

Pathologie	Gène	Mutation	Cellules d'origine	Méthode de reprogrammation	Type cellulaire différencié	Référence
Amaurose congénitale de Leber	<i>CEP290</i>	c.2991+1665 A > G	Fibroblastes	Episomal (OKSM / Lin28+ shRNAp53)	Organoïdes rétiniens	Parfitt et al., 2016
RP récessive	<i>TRNT1</i>	c127_129delGAA and c1252delA c1245-1253insA and c609 T > C	Fibroblastes	Virus de Sendai (OKSM)	Organoïdes rétiniens	Sharma et al., 2017
RP liée à l'X	<i>RPGR</i>	c1685_1686delAT c2234_2235delGA or c2403_2404delGA	Cellules urinaires	Lentivirus (OKSM) Episomal	Organoïdes rétiniens (avec isogéniques-CRISPR)	Deng et al., 2018
Amaurose congénitale de Leber	<i>AILP1</i>	63337250 A > G; (Cys89Arg)	Fibroblastes	Virus de Sendai (OKSM)	Organoïdes rétiniens	Lukovic et al., 2018 Lukovic et al., 2020
RP dominante	<i>PRPF31</i>	c1115-1125del11 c522-527+10del	Fibroblastes	Virus de Sendai (OKSM)	EPR/ Organoïdes rétiniens (isogéniques-CRISPR)	Buskin et al., 2018
RP récessive	<i>CRB1</i>	c.3122T>C (Met104Thr) homozygote 2,983G>T (Glu995*) / c1892A>G (Tyr631Cys) c.2843G>A (Cys948Tyr) / c3122 T>C (Met1014Thr)	Fibroblastes	Lentivirus (OKSM)	Organoïdes rétiniens	Quinn et al., 2019
Syndrome de Usher	<i>USH2A</i>	c8559-2A > G/c.9127_9129delTCC	Cellules urinaires	Virus de Sendai (OKSM)	Organoïdes rétiniens	Guo et al., 2019
Amaurose congénitale de Leber	<i>RPE65 (LCA)</i>	c.200T>G (p.L67R) and c.430T>C (p.Y144H)	Cellules urinaires	Episomal (OKS SV40LT / miR-302-367)	EPR/ Organoïdes rétiniens	Li et al., 2019
Rétinoschisis juvénile lié à l'X	<i>RS1</i>	488G>A (W163X) 625c>T (R209C)	Fibroblastes	Virus de Sendai (OKSM)	Organoïdes rétiniens (avec isogéniques-CRISPR)	Huang et al., 2019
RP récessive	<i>PDE6B</i>	c.694G>A (Glu232Lys)	Cellules sanguines (PBMCs)	Episomal (OKSM / Lin28+ shRNAp53 + miR-302-367)	Organoïdes rétiniens	Gao et al., 2020

RP dominante	<i>NRL</i>	c.223dupC (L75Pfs*19)	Fibroblastes	Virus de Sendai (OKSM)	Organoïdes rétiniens (Lentivirus WT)	Kallman et al., 2020
RP récessive	<i>CRB1</i>	1369C>T(p.R457X) & 2027C>T(p.T676M)	Fibroblastes	Lentivirus TET	Structure de type vésicule optique	Tang et al., 2020
RP récessive	<i>BBS10</i>	Homo 271dup (frameshift Stop) & Hetero (909_912del; 687del)	Fibroblastes	Rétrovirus (OKSM)	Structures de type organoïdes rétiniens	Barabino et al., 2020
RP récessive	<i>MKS (TMEM67)</i>	Hetero 233G > A; 1046T > C	Fibroblastes	Rétrovirus (OKSM)		Barabino et al., 2020
RP récessive	<i>ABCA4</i>	intron 36 (c.5196+1137G>A)	Fibroblastes	<i>Non précisé</i>	Organoïdes rétiniens	Khan et al., 2020
RP liée à l’X	<i>RP2</i>	358C>T (R120X) & CRISPR-KO: 371_378del (Lys124SerfsTer11)	Fibroblastes	Virus de Sendai (OKSM)	Organoïdes rétiniens (avec isogéniques-CRISPR)	Lane et al., 2020
Amaurose congénitale de Leber	<i>CRX (LCA)</i>	G264T (K88N) / 413delT (1138fs48)	Fibroblastes	Virus de Sendai (OKSM)	Organoïdes rétiniens	Kruczek et al., 2021
RP récessive	<i>NR2E3</i>	166 G > A (G56R)	Fibroblastes	Virus de Sendai (OKSM)	Organoïdes rétiniens	Diakatou et al., 2021
RP récessive	<i>CRB1</i>	heterozygous mutations (c.2555 T > C and c.3014A > T)	Fibroblastes	Episomal (OKSM)	Organoïdes rétiniens	Moon et al., 2021
Amaurose congénitale de Leber	<i>CRX</i>	CRXT155ins4/+ (c.464_465in-sGGCA; p.T155ins4) & CRXK88Q/+ (c.262A>C; p.K88Q)	Cellules sanguines (PBMCs)	Virus de Sendai (OKSM)	Organoïdes rétiniens	Chirco et al., 2021
RP liée à l’X	<i>RPGR</i>	c.1415 – 9A>G variant	Fibroblastes	Episomal (OKSM)	EPR/ Organoïdes rétiniens	Karam et al., 2022
RP dominante	<i>PRPF31</i>	Cys247X (c.709_734dup) & Tyr90CysfsX21 (c.269_273del)	Fibroblastes	Virus de Sendai (OKSM)	EPR et Organoïdes rétiniens (avec isogéniques-CRISPR)	Rodrigues et al., 2022

Tableau 7: Modèles de rétinopathies pigmentaires établis à partir de cellules iPS de patients.

c. La découverte de nouvelles molécules actives

La découverte de médicament est un processus long et coûteux avec à la fin de celui-ci un très fort taux d'attrition c'est-à-dire un faible nombre de nouvelles molécules candidates atteignant le marché. Les principales causes d'échec à l'issue des phases précliniques et cliniques sont principalement le manque d'efficacité, de sécurité et la toxicologie. Dans cette optique, le criblage à haut débit est donc une approche de découverte de nouvelles molécules qui a gagné en popularité ces dernières décennies du fait qu'elle permet une accélération de la découverte de nouvelles molécules par le test systématique de milliers de molécules en peu de temps dès les phases précoces de recherche et développement. Il existe différentes approches en matière de tests de criblage à haut débit, qui doivent être choisies en fonction des objectifs d'un sujet de recherche donné. La découverte de médicaments a reposé longtemps sur des approches basées sur des cibles moléculaires qui mesurent de la bioactivité de composés d'une chimiothèque sur une cible préalablement déterminée et validée, associée à la pathogénèse d'une maladie. Cette approche permet de mettre en évidence des molécules qui agissent bien sur la cible choisie à l'échelle moléculaire, même si son comportement sur cellule ou tissu n'est pas garanti semblable à celui trouvé sur la cible isolée. Il est donc nécessaire dans un second temps de caractériser l'effet de la molécule au niveau cellulaire. Le criblage phénotypique, quant à lui, ne nécessite pas forcément la compréhension préalable du mécanisme d'action moléculaire mais se concentre plutôt sur l'identification de composés capables d'interférer avec un processus biologique donné, en observant un phénotype lié à la perturbation que l'on veut susciter. Cette dernière approche a récemment surpassé celle basée sur les cibles (Swinney et Anthony, 2011).

L'identification de modèles *in vitro* est apparue alors comme un élément essentiel pour potentialiser la découverte de médicaments (Engle et Vincent, 2014). Les études précliniques reposent principalement sur des données animales par le recours de modèles animaux et des essais *in vitro* ayant recours à des modèles humanisés. Les principaux avantages des essais *in vitro* est d'une part de réduire le nombre d'animaux utilisés en préclinique et d'autre part la possibilité d'une approche à haut débit, qui permettrait d'éliminer le plus rapidement possible les composés thérapeutiques potentiels aux effets indésirables. Cependant, la plupart des études *in vitro* utilisent soient des cellules dérivées de cultures primaires à l'issue de plusieurs subcultures ou des lignées cellulaires immortalisées ou transformées à partir de cellules normales qui toutes deux présentent des inconvénients très importants. Les cellules dérivées de cultures primaires ne peuvent supporter qu'un nombre limité de passages avant leur sénescence limitant leur utilisation et contribuant alors à une diminution de la robustesse des essais en raison de la variabilité des cellules d'un lot à l'autre. Le développement des lignées cellulaires transformées pouvant être cultivées indéfiniment, a permis de résoudre le problème de la sénescence mais celles-ci présentent des aberrations génomiques et diffèrent considérablement selon le type de cellule ou tissu d'origine. Aussi, l'avènement de la technologie des CSPh et la possibilité de

modéliser *in vitro* un certain nombre de maladies à partir de celles-ci offrent de nouvelles opportunités pour la recherche ou la validation de nouvelles molécules thérapeutiques au cours du développement pharmaceutique mais aussi pour des études toxicologiques d'une molécule. Afin d'effectuer un criblage à haut débit sur un modèle pathologique dérivé de CSpH, il faut obtenir le modèle d'intérêt qui est le fruit d'une part: de la mise en place d'un protocole de différenciation robuste adapté des cellules souches pluripotentes en cellules d'intérêt que sont les cellules de la rétine et d'autre part d'une validation du modèle produit qui doit être représentatif de la maladie à modéliser. Ces étapes primordiales sont longues et indispensables et présentent des limites qu'il faut prendre en compte dans l'entreprise de la recherche de nouvelles molécules par l'utilisation de criblage à haut débit.

Le groupe de Masayo Takahashi a été le premier à évaluer le potentiel thérapeutiques de candidats médicaments sur des photorécepteurs dérivés de cellules iPS humaines issues de patients atteints de RP, due à une mutation dans le gène *RP9* (Jin *et al.*, 2011). Ils ont évalué les effets des vitamines antioxydantes α -tocophérol, acide ascorbique et β -carotène sur ce modèle cellulaire. Le traitement par l' α -tocophérol a permis une augmentation significative du nombre de cellules positives pour la rhodopsine. Dans la même optique, Yoshida *et al.*, ont recherché des agents neuroprotecteurs prévenant la dégénérescence de photorécepteurs porteurs d'une mutation dans le gène *RHO* dérivés de cellules iPS de patients (Yoshida *et al.*, 2014). Un traitement par des molécules susceptibles de modifier les voies liées au stress du réticulum endoplasmique a permis de sélectionner des inhibiteurs de la voie mTOR comme composés neuroprotecteurs (Yoshida *et al.*, 2014). Enfin, un autre exemple de preuve de concept de l'utilisation des cellules souches pluripotentes pour la découverte de médicaments a porté sur des cellules de l'EPR dérivées de cellules iPS de patients atteints de RP avec une mutation dans le récepteur à activité tyrosine kinase MER (myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase) (Ramsden *et al.*, 2017). Deux molécules capables de réexprimer des gènes porteurs d'une mutation non-sens (en anglais Translational Read through inducing drugs, TRIDs), G418 et PTC124 a permis de restaurer l'expression du gène *MERTK* et rétablir une phagocytose fonctionnelle (Ramsden *et al.*, 2017).

Objectifs de thèse

Les RPs sont des maladies héréditaires de la rétine, caractérisées par la mort des photorécepteurs, les neurones de la rétine qui captent la lumière. Cet ensemble de maladies dégénératives représente la principale cause de cécité d'origine héréditaire dans les pays industrialisés et sont considérées encore à nos jours comme incurables. Dans ce contexte, la reprogrammation des cellules somatiques en cellules souches induites à la pluripotence (iPS) offre un large panel d'applications en médecine régénérative, de la transplantation cellulaire à la modélisation des pathologies en passant par le criblage à haut débit. L'objectif de notre équipe est de développer à l'aide de la technologie des cellules souches humaines induites à la pluripotence des approches innovantes pour le développement de futures thérapies. Un protocole innovant de différenciation de cellules iPS en organoïdes rétiniens a été développé (Reichman *et al.*, 2014 , Reichman *et al.*, 2017). Composés initialement de cellules progénitrices de la rétine, ces organoïdes peuvent être maintenus en culture flottante dans un milieu proneural afin de générer tous les types cellulaires d'une rétine adulte humaine. Les précurseurs des photorécepteurs, qui représentent la population la plus appropriée pour le remplacement des photorécepteurs par des approches de transplantation (MacLaren *et al.*, 2006) ont pu être isolés à partir de ces organoïdes rétiniens (Gagliardi *et al.*, 2019). Cependant, le caractère post-mitotique des précurseurs de photorécepteurs limite leur production à grande échelle pour des approches de transplantation mais aussi pour leur utilisation dans des approches de criblage à haut débit pour la découverte de nouvelles molécules actives par. Dans ce contexte, les cellules progénitrices rétiniennes pourraient être utilisées comme source de cellules pour générer des précurseurs de photorécepteurs en grand nombre. Toutefois, bien que les études entreprises pour permettre l'amplification des progéniteurs rétiniens aient connu certains succès, elles mettent en évidence une autre limite importante pour de futures applications, à savoir une perte de leur propriété de multipotence indispensable pour la génération de cellules rétiniennes différenciées (Mansergh *et al.*, 2010, Czekaj *et al.*, 2012, Ringuette *et al.*, 2014, Cicero *et al.*, 2009, Gualdoni *et al.*, 2010).

Mon projet de thèse a ainsi pour objectif de générer, amplifier et cryopréserver des cellules progénitrices rétiniennes isolées à partir de cellules iPS humaines, tout en maintenant leur caractère multipotent indispensable à leur utilisation.

Mon projet de thèse s'organise autour de trois principaux objectifs :

1. Génération, amplification et cryopréservation de progéniteurs rétiens à partir de cellules iPS humaines:

Les RPCs ont été isolées à partir des organoïdes rétiens au jour 42 (J42) de différenciation. L'élaboration d'un milieu de culture nommé RPCM contenant 5 facteurs extrinsèques intervenant dans le développement rétien a été entreprise afin de permettre l'amplification des RPCs tout en maintenant leur caractère multipotent. Nous avons également évalué l'impact de la cryopréservation de ces RPCs sur leurs propriétés mitotiques et multipotentes.

2. Différenciation des progéniteurs rétiens en photorécepteurs (précurseurs et matures):

Il est établi que la détermination du devenir cellulaire des RPCs est régulée par une combinaison d'influences extrinsèques et intrinsèques comme précédemment explicité dans la deuxième partie de l'introduction. Nous avons ainsi cherché à valider un protocole permettant d'engager les RPCs dans la voie des photorécepteurs à bâtonnets, la population de photorécepteurs touchés initialement dans la RP. Le développement de milieux de culture spécifiques nous permettant dans un premier temps de différencier les RPCs en précurseurs des photorécepteurs et dans un second temps de les différencier en des photorécepteurs à bâtonnets a été entrepris. L'identification des conditions de culture les plus adaptées s'est appuyée sur l'utilisation d'une lignée de cellules iPS reportrice générée au sein de notre équipe exprimant la protéine fluorescente mCherry sous le contrôle du promoteur CRX (Gagliardi *et al.*, 2018), permettant d'évaluer l'engagement des RPCs vers le lignage des photorécepteurs.

3. Cryopréservation d'un d'intermédiaire cellulaire rétien d'intérêt : précurseurs de photorécepteurs :

Compte tenu de l'utilisation potentielle des précurseurs de photorécepteurs pour les approches criblage à haut débit de molécules à potentiel thérapeutique (mais également pour des approches futures de transplantation cellulaire), différentes méthodes de cryopréservation des cellules différenciées dérivées de RPCs ont été testées et évaluées sur la survie cellulaire avant et après cryopréservation.

Résultats

« L'information n'est pas la connaissance. La seule source de connaissances est l'expérience. »

Albert Einstein

Génération, amplification et cryopréservation de cellules progénitrices rétiniennes à partir de cellules iPS humaines

Une partie du défi que représente l'utilisation de tissus ou cellules dérivés de cellules iPS humaines à des fins de thérapie cellulaire ou criblage à haut débit de molécules à potentiel thérapeutiques est la nécessité de produire un grand nombre de cellules spécifiques et identiques. Pour répondre à ces besoins, nous proposons ici l'utilisation de RPCs (cellules progénitrices rétiniennes humaines) mitotiques et multipotentes isolées à partir d'organoïdes rétiniens dérivés de cellules iPS en se basant sur le protocole de notre équipe. Lors du développement rétinien, il a été démontré que les RPCs sont intrinsèquement multipotentes et capables de donner naissance à tous les types cellulaires rétiniens (Livesey et Cepko, 2001). Initialement isolées à partir de rétines fœtales humaines (Yang et al., 2002, O'Brien et al., 2003, Klassen et al., 2004, Li SY et al., 2009, Aftab et al., 2009, Baranov et al., 2014, Zhou et al., 2015, Semo et al., 2016, Liu Y et al., 2017), les RPCs peuvent être générées à partir de protocoles de différenciation de cellules iPS humaines (Lamba et al., 2006). Bien que les études entreprises pour permettre l'amplification des progéniteurs rétiniens aient connu certains succès, elles mettent en évidence une autre limite importante pour de futures applications qui est une perte de la multipotence de ces cellules (Mansergh et al., 2010, Czekaj et al., 2012, Ringuette et al., 2014, Cicero et al., 2009, Gualdoni et al., 2010) En effet, les RPCs perdent leur potentiel neurogénique (Wright et al., 2015) se limitant progressivement à un destin glial (Gamm et al., 2008).

Nous décrivons et explicitons dans l'article ci-après, intitulé « Bankable human iPSC-derived retinal progenitors: A new source of multipotent cells », une méthode spécifique utilisant un nouveau milieu dédié aux RPCs (RPCM) qui permet l'amplification de ces cellules dérivées de cellules iPS humaines tout en maintenant leur multipotence. Par analyse transcriptomique, nous avons démontré le maintien de la multipotence de RPCs décongelées et amplifiées (jusqu'à passage 4). En effet, après décongélation les RPCs ont pu se différencier en tous les types de cellules de la rétine neurale ainsi qu'en cellule de l'EPR en quelques semaines. Il a été possible d'établir des conditions de culture qui permettent de générer des cultures enrichies en précurseurs de photorécepteurs (jusqu'à 90% en deux semaines) sans étape de purification. Une analyse RNA-seq comparant les RPCs obtenues et les organoïdes rétiniens a permis d'identifier des gènes impliqués dans des maladies dégénératives de la rétine. Ainsi, cette lignée de RPCs dérivées de cellules iPS humaines pourraient constituer une nouvelle source de cellules rétiniennes pour des approches de criblage chechant à découvrir ou repositionner des « composés – médicaments » mais aussi pour de futures approches de thérapie cellulaire. A partir de cellules iPS de patients atteints de RP par exemple, ces cellules pourraient aussi être un modèle cellulaire avancé pour mieux comprendre les dystrophies rétiniennes.

Bankable Human iPSC-Derived Retinal Progenitors: A New Source of Multipotent Cells

Sandy Gozlan¹, Vivien Batoumeni¹, Tara Fournier¹, Céline Nanteau¹, Anais Potey¹, Marilou Clémençon¹, Gaël Orieux¹, Jose-Alain Sahel^{1,3,4,5}, Olivier Goureau¹, Jérôme E Roger², and Sacha Reichman¹

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

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

³ CHNO des Quinze-Vingts, INSERM-DGOS CIC 1423, F-75012 Paris, France

⁴ Fondation Ophthalmologique Adolphe de Rothschild, F-75019 Paris, France

⁵ Department of Ophthalmology, The University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA 15213, United States

Abstract (150 words)

Retinal progenitor cells (RPCs) are the source of all retinal cell types during retinogenesis. Until now, the isolation and expansion of RPCs has been at the expense of their multipotency. Here, for the first-time, we report simple methods and media for the generation, expansion, and cryopreservation of human induced pluripotent stem-cell derived-RPCs (hiRPCs). Thawed and passed hiRPCs maintained biochemical and transcriptional RPC phenotypes and their ability to differentiate into photoreceptor precursor, ganglion, horizontal, amacrine or retinal pigmented epithelial cells. Specific conditions allowed the generation of large cultures of

photoreceptor precursors enriched up to 90% within a few weeks and without a purification step. Combined RNA-seq analysis between hiRPCs and retinal organoids identified genes involved in developmental or degenerative retinal diseases. Thus, hiRPC lines could provide a new source of retinal cells for cell-based therapies or drug discovery and could be an advanced cellular tool to better understand retinal dystrophies.

Introduction

In mammals, neuroregenerative capacity is poor, including that of the human retina. Therefore, retinal dystrophies (RDs) that cause the definitive loss of neural cells typically result in permanent visual impairment. Preventing degeneration and rescuing the degenerated retina are major challenges for which stem cell-based therapies show promise^{1,2}. Many methods have emerged to generate human induced pluripotent stem-cell (hiPSC)-derived retinal cells and tissue, such as retinal organoids (ROs), for cell therapy, drug discovery^{3,4}, or to better understand inherited RDs by modeling the progression of degeneration. However, the selection of specific cells within ROs requires sorting, limiting the scale-up of production. Part of the challenge of using hiPSC derivatives in cell-based therapies is the production of a large number of specific and identical cells. Because new therapies are cell-intensive, the simple and efficient production of such cells is required. To meet these needs, we proposed the use of mitotic and multipotent retinal progenitor cells (RPCs) isolated from early ROs. Indeed, RPCs are the source for the generation of all retinal cell types during retinogenesis⁵. Initially isolated from human fetal retinas⁶, RPCs can be generated from differentiation protocols using human iPSCs⁷⁻¹¹. Although RPCs appear to be expandable, numerous studies have described the loss of their multipotency during culture⁶ or following multiple passages¹²⁻¹⁴. Here, we describe, for the first time, a specific method using a new RPC-dedicated medium (RPCM) that allows the amplification of hiPSC-derived RPCs (hiRPCs) while maintaining their multipotency. The RPCM-based culture environment contains five extrinsic factors (CHIR99021, PURMORPHAMIN, ATP, FGF2, and EGF) that act on

pathways involved in retinal development and allowed several passages of hiRPCs for the production of millions of cells from cryopreserved stocks. RNAseq analysis confirmed preserved multipotency, with a pre-neurogenic phenotype, of hiRPCs expanded in RPCM. From cryopreserved stocks, hiRPCs were able to differentiate into a broad range of early retinal cell types, such as retinal ganglion cells (RGCs), photoreceptor precursors, horizontal cells, and amacrine cells, as well as retinal pigmented epithelial cells (RPEs) within a few weeks. Moreover, we describe defined culture conditions that allow the generation of enriched cultures of photoreceptor precursors of up to 90% in two weeks without a purification step. Thus, we describe methods and new media to isolate, expand, and cryopreserve bankable hiRPCs as a powerful cellular tool. This multipotent cell line, as well as cell derivatives, could be used for developmental research, cell-based therapy, and drug discovery in the foreseeable future.

Materials and Methods

Human iPSC culture

All experiments were conducted using the human fluorescent reporter AAVS1::CrxP_H2BmCherry-hiPSC line, allowing the identification of photoreceptor lineage-committed cells by endogenous mCherry staining¹⁵. HiPSCs were cultured under feeder-free conditions on truncated recombinant human vitronectin rhVTN-N (STEMCELL Technologies)-coated dishes in mTeSRTM1 Medium (STEMCELL Technologies). Cells were routinely cultured in 6-cm² dishes at 37°C in a standard 5% CO₂/95% air incubator with a daily medium change. HiPSCs were passaged weekly, as previously described, using 2 mL enzyme-free gentle cell-dissociation reagent (STEMCELL Technologies) for 6 min at room temperature¹⁶.

Retinal organoid differentiation

RO generation was based on our previously established adherent hiPSC differentiation protocol^{7,16,17}. HiPSCs were expanded to 70 to 80% confluence in 6-cm diameter dishes as described above. At this time, defined as day 0 (D0), hiPSCs were cultured in chemically defined Essential 6 (E6) medium with 10 units/ml penicillin and 10 mg/ml streptomycin (Thermo Fisher Scientific). At D2, cells were switched

to E6N2 medium, composed of E6 medium, 1% N2 supplement, 10 units/ml penicillin, and 10 mg/ml streptomycin (Thermo Fisher Scientific). Media was changed every 2 to 3 days. After four weeks (W4), identified self-formed retinal organoids were isolated using a needle and cultured in six-well-plates (10-15 organoids per well) as floating structures in Proneural medium (ProNM) supplemented with 10 ng/ml animal-free recombinant human FGF2 (Peprotech, Neuilly sur Seine, France, www.peprotech.com) and half of the medium was changed every 2 to 3 days. ProNM is composed of chemically 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 mg/ml streptomycin. After one week, FGF2 was removed from the ProNM and half of the medium was changed every 2- to 3 days.

Isolation, expansion, and cryopreservation of hiRPCs

HiRPCs were isolated from six-week-old (W6) ROs. Before dissociation, the surrounding pigmented portion of the ROs was discarded under a stereomicroscope. Between 70 to 90 structures were washed twice in Ringer's solution (155 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 2 mM NaH₂PO₄, 10 mM HEPES, and 10 mM glucose) and enzymatically dissociated using two units of papain (Worthington, WOLS3126), previously activated in SAP solution (125 mM NaCl, 3.6 mM KCl, 1.18 mM MgCl₂, 22.6 mM NaHCO₃, 0.02 mM NaH₂PO₄, 0.028 mM Na₂HPO₄, 1.2 mM Na₂SO₄, 10 mM glucose; 0.54 mM Na₂EDTA), for 30 min at 37°C. ROs were dissociated by up and down pipetting in the presence of 1 µg/ml DNase (Sigma-Aldrich), preventing cell aggregation. After complete dissociation, the papain was inactivated with pre-warmed ProNM. Cells were centrifuged and resuspended in pre-warmed RPCM medium. RPCM is composed of E6 medium, 10 units/ml penicillin and 10 mg/ml streptomycin (Thermo Fisher Scientific), 3 µM CHIR99021 (Euromedex), 1 µM Purmorphamin (Euromedex), 10 ng/mL FGF2 (Peprotech), 10 ng/mL EGF (Peprotech), and 100 µM ATP (Sigma-Aldrich). Cells were plated at a density of 3 x 10⁵ cells/cm² onto T25-cm² dishes previously coated with Geltrex™ (Thermo Fisher Scientific). At this time, hiRPCs were designated as being at passage 0 (hiRPCp0). Cells were incubated at 37°C in a standard 5% CO₂/95% air incubator and the medium was changed every 2 to 3 days for one week. At

70 to 80% confluency, hiRPCp0 cultured in RPCM were dissociated using 2 mL TrypLE™ Express (Gibco) per T25-cm² for 8 min at 37°C and the reaction stopped by dilution with 8 mL pre-warmed RPCM. HiRPCs were centrifuged at 110 x g for 3 min and resuspended in prewarmed RPCM. Cells were seeded in Geltrex™ (Thermo Fisher Scientific) pre-coated T25-cm² plates at a density of 1.5 x 10⁵ cells/cm² and designated as hiRPCs at passage 1 (hiRPCp1). Cells were incubated at 37°C in a standard 5% CO₂/95% air incubator and the medium was changed every 2 to 3 days for one week. At 70 to 80% confluency, hiRPCp1 were dissociated using TrypLE™ Express (Gibco) and cryopreserved at 5 x 10⁶ cells/ml using Cryostor® cryopreservation medium (STEMCELL Technologies) in cryogenic tubes. Tubes were placed in an isopropanol-based freezing container at -80°C for a minimum of 4 h and kept in a -150°C freezer for long-term storage.

Differentiation of hiRPCs

All differentiation experiments were performed using hiRPCp3 from banked hiRPCp1. Thawed hiRPCp1 were seeded at 5 x 10⁴ cells/cm² (noted hiRPCp2) using Geltrex® (Thermo Fisher Scientific) precoated T25-cm² dishes or six-well plates. After one week under expansion conditions using RPCM, hiRPCp2 were passaged and experiments performed using one-week expanded hiRPCp3. Spontaneous differentiation was performed using a basal medium (BM) composed of E6 medium, 10 units/ml penicillin, and 10 mg/ml streptomycin (Thermo Fisher Scientific). Directed differentiation was performed using ProNM (i.e., retinal differentiation). Cell culture to promote photoreceptor precursors was performed using ProNM supplemented with the Notch Inhibitor DAPT at 10 µM from day 2 to day 7 of the first week of differentiation. For immunostaining and high-content image quantification at the end of differentiation, hiRPC-derived retinal cells were enzymatically dissociated using 0.24 units/cm² papain as previously described¹⁶. Cells were replated at 1.5 x 10⁵ cells/cm² in 24 well-plates containing glass coverslips or in 96-well plates with a glass bottom (Celvis) pre-coated with Poly-D-lysine (2 µg/cm², Merck) and laminin (1 µg/cm², Sigma-Aldrich). Cells were returned to the incubator at 37°C and 5% CO₂ for 24 h and then fixed with 4% PAF in PBS for 10 min.

RNA extraction and Taqman Assay

Total RNA was extracted using a Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol and RNA yields and quality assessed using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). cDNA was synthesized from 100 ng total RNA using the QuantiTect reverse transcription kit (Qiagen) following the manufacturer's recommendations. Synthesized cDNA was then diluted 1/20 in DNase-free water before performing real-time quantitative PCR (RT-qPCR). RT-qPCR analysis was performed using an Applied Biosystems real-time PCR device (7500 Fast System) with custom TaqMan® Array 96-Well Fast plates and TaqMan® Gene expression Master Mix (Life Technologies) following the manufacturer's instructions. All primers and MGB probes labeled with FAM for amplification were purchased from Life Technologies (**Supplemental Table 1**). Results were normalized against those obtained with 18S rRNA and the quantification of gene expression was based on the DeltaCt Method in three minimum independent biological experiments.

RNAseq analysis

RNA-seq libraries were constructed by Integragen Genomics® from 400 ng total RNA (RIN > 7) using NEBNext Ultra II Directional RNA (New England Biolabs) and paired-end sequencing of 100 base-pair fragments was performed on a Novaseq 6000 system (Illumina). Image analysis and base calling was performed using an Illumina Real Time Analysis (3.4.4) device with default parameters. Pass-filtered reads were mapped using STAR 2.7.3a¹⁸ and aligned to Ensembl genome assembly GRCh38 (release 98). This annotation includes cDNA, miRNA, long non-coding RNA, pseudogene, and gene predictions. For differential expression analysis, a count table of the gene features was obtained using FeatureCounts¹⁹. For gene level analysis, EdgeR was used for normalization, differential expression analysis, and to compute TPM (transcripts per million) values²⁰. Comprehensive gene-list analysis, enriched biological pathways, and gene annotation from differential expression were based on the Gene Ontology (GO) classification system using Metascape²¹. R packages were used for data mining, including GOplot for pathway data graphical representation²².

High-content Image analysis

For High-content quantitative analysis, images were acquired using an automated microscope (Arrayscan VTI HCS Reader, Thermo Fisher Scientific) of the screening facility. To count the photoreceptor precursors expressing mCherry (red) or immunofluorescence-stained cells, an image analysis workflow was created using HCS Studio Cell Analysis Software (Thermo Fisher Scientific) with the TargetActivation BioApplication. Image analysis included an image pre-processing step followed by a segmentation step, allowing classification of the pixels and objects based on fluorescence intensity thresholds.

Immunostaining of ROs, hiRPCs, and hiRPC-derived cells

RO sections or retinal cells were fixed with 4% PAF in PBS for 10 min before immunostaining. After washing with PBS, nonspecific binding sites were blocked for 1 h at room temperature with PBS containing 0.2% gelatin and 0.25% Triton X-100 (blocking buffer) and then overnight at 4°C with the primary antibody (**Supplemental Table 2**) diluted in blocking buffer. Samples were washed four times for 5 min in PBS with 0.1% Tween and then incubated for 1 h at room temperature with either AlexaFluor 488 or 647 secondary antibodies (Interchim) diluted at 1:600 in blocking buffer. Cells were washed two times for 5 min in PBS with 0.1% Tween and once for 5 min in PBS with 0.1% Tween and DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) at 1:1000. Samples were washed with PBS and mounted on slides for imaging. Fluorescence was captured using an Olympus FV1000 confocal microscope equipped with 405, 488, 543, and 633 nm lasers. Images were acquired using a 1.55 or 0.46 μm step size and corresponded to the projection of 20 to 40 optical sections.

Statistical analysis

Statistical analyses represent the mean of at least three independent experiments. Data were averaged and are expressed as means \pm SDs. Statistical analysis was performed using Prism 7 (GraphPad software) with appropriate multiple comparisons with the Kruskal–Wallis test. P values < 0.05 were considered statistically significant. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.005$.

Results

Generation of the human iPSC-derived retinal progenitor cell line

ROs were generated from the human fluorescent reporter AAVS1::CrxP_H2BmCherry-hiPSC line¹⁵ (see materials and methods) using our previously reported protocol^{16,17}. Thus, after four weeks (W4) of hiPSC differentiation, ROs were picked and cultured under floating-culture conditions until W6 (**Fig. 1a**). Human iPSC-derived RPCs were isolated from ROs at W6, which are composed of two major cell types organized in two layers (**Fig. 1b**). The internal layer contains PAX6⁺/VSX2⁻ cells, corresponding to RGCs, the first post-mitotic differentiated cell type^{7,16}. The external layer is composed of a cell population co-expressing PAX6⁺/VSX2⁺ and the mitotic marker KI67, representing RPCs (**Fig. 1b, Supplemental Fig. 1**). RT-qPCR analysis confirmed that the progenitors present in ROs at W6 still expressed the eye-field transcription factors (EFTFs) *RX*, *PAX6*, *VSX2*, *SIX6*, and *SOX2* while retaining the expression of the photoreceptor marker *CRX* at a basal level relative to ROs at W7 (**Fig. 1c**). Moreover, the absence of endogenous mCherry staining, illustrating the absence of cells committed towards the photoreceptor lineage, confirmed the undifferentiated state of the RPC layer at W6 (**Fig. 1b, Supplement Fig. 1**). Before RPC isolation, the pigmented portion of W6 ROs was removed to avoid any RPE contamination in the downstream hiRPC cultures (**Fig. 1a**). This cleaning step is not possible before W6 because of the small size of the ROs and the absence of the pigmented portion. After papain-based dissociation of cleaned ROs, seeded cells were designated as hiRPCp0 and cultured in a new specific RPC-dedicated medium (RPCM) that acts on multipotency and proliferation by the addition of the five extrinsic factors CHIR99021, PURMORPHAMIN, FGF2, EGF, and ATP in a growth factor-free basal medium (BM) used for pluripotent stem-cell cultures²³ (**Fig. 1a**). After one week in culture (W1), homogeneous and adherent hiRPCp0 still expressed *VSX2*, *PAX6*, and *KI67* but not *mCherry*, as observed in W6 ROs (**Fig. 1b and d**). RT-qPCR analysis confirmed EFTF expression and the positive selection of hiRPCs by the low expression of *CRX* (**Fig. 1e**). To bank retinal progenitors, hiRPCp0

were passed and expanded for one week in RPCM and hiRPCp1 were cryopreserved in stem cell-dedicated cryopreservation medium at 5×10^6 cells/ml (**Fig. 1a**). We investigated the possibility of passing thawed hiRPCs once a week to increase hiRPC production (**Fig. 1f**). One million thawed cells cultured in RPCM produced $4.6 \times 10^6 \pm 0.6$ hiRPCp2 in W1, 14.5×10^6 hiRPCp3 in W2, and $43.23 \times 10^6 \pm 2.96$ in W3 (**Fig. 1g**). The mean multiplication factor between hiRPCp2 and hiRPCp4, was 3.6 ± 0.9 (**Fig. 1g**). Under RPCM culture conditions, the expression of EFTFs by W1-expanded hiRPCs was stable after passaging (**Fig. 1h**) and immunostaining confirmed the homogenous co-expression of VSX2, PAX6, KI67, and RAX in all cells (**Fig. 1i, Supplemental Fig. 2**). In addition, as expected, mCherry staining, which identifies CRX expression, was at background levels (**Fig. 1i, Supplemental Fig. 2**). After thawing, hiRPCs cultured in RPCM grew as bright cell clusters (**Fig. 1i**) and this morphology was lost for the neural phenotype when the cells are cultured in BM (**Supplemental Fig. 3**). Proliferation of hiRPCs was up to 10-fold higher in RPCM than in BM (**Supplemental Fig. 3b**). Evidence for multipotency under RPCM culture conditions was shown by RT-qPCR, with enhanced expression of *RAX*, *PAX6*, *VSX2*, *SOX2*, and *SIX6* and the maintenance of *CCND1* expression, which sustains proliferation (**Supplemental Fig. 3d**). On the contrary, in BM, EFTF and *CCND1* expression decreased, allowing hiRPC differentiation, highlighted by the upregulation of photoreceptor (*CRX*) and retinal ganglion cell (*BRN3A*) markers (**Supplemental Fig. 3d, e**).

Whole transcriptome analysis of hiRPCs

We characterized the multipotency of the hiRPC line by comparing whole transcriptome sequencing (RNAseq analysis) of fresh hiRPCp0, thawed hiRPCp2, and passed hiRPCp3 and hiRPCp4 to W4 and W6 ROs. W4 ROs were mainly composed of RPCs and W6 ROs of both RPCs and RGCs (**Supplemental Fig. 1**). In total, 16,168 transcripts were detected (**Supplemental Table 3**) and those with a TPM expression value ≥ 10 were considered to be clearly expressed. This threshold was determined based on *CRX* expression in W4 ROs, when *CRX* was present at a very low level (2.8 TPM), whereas, in W6 ROs, *CRX* expression was higher, reflecting the progression of retinal differentiation (10.2 TPM) (**Fig. 1c, Supplemental Table 3**). Principal component analysis (PCA) showed four clusters based on the first

principal component (PC1), illustrating a different transcriptional landscape between W4 ROs, W6 ROs, hiRPCp0, and other hiRPC passages (**Fig. 2a**). PC2 analysis supported the phenotypic reversion of the RPC population, composed of hiRPC clusters, to a transcriptome very close to that of early W4 ROs (**Fig. 2a, bleu arrow**). Heatmap analysis of EFTF expression confirmed high and stable expression of early retinal differentiation factors, such as *PAX6*, *RAX*, *VSX2*, *SIX3*, *SIX6*, and *LHX2*, in each sample (**Fig. 2b, top panel**), as previously shown by RT-qPCR (**Fig. 1h**). We then focused on the expression of genes described to be involved in the multipotency or neurogenic property of retinal progenitors²⁴⁻²⁶ (**Fig. 2b**). As expected, the expression of multipotency markers tended to decrease in ROs between W4 and W6, whereas that of neurogenic genes increased, reflecting their early commitment to differentiation (**Fig. 2b, middle panel**). Nevertheless, the expression of these genes in RPCM-expanded hiRPCs was generally similar to the expression level observed in W4 ROs (**Fig. 2b**). This result is consistent with those of the PCA, confirming that the expanded RPC population corresponded to retinal progenitors at a similar "progenitor stage" as that found in W4 ROs. Remarkably, the expression of specific multipotency genes, such as *GJA1*, *PFN1*, *IGFBP5*, *ATP1A2*, and *FGF19*, increased under RPCM culture conditions, supporting the stemness characteristic of hiRPCs (**Fig. 2b**). The differential expression of selected multipotency genes (*GJA1*, *IGFBP5*, *ATP1A2*, *CCND2*, *BMP7*) and neurogenic genes (*BASP1*, *ATHO7*, *MAP1B*, *SPP1*, *FOXN4*, *GADD45A*) was confirmed by qRT-PCR (**Supplemental Fig. 4a, b**). To better decipher the differences between RPCs in early ROs and expanded hiRPCs, we first compared the transcriptome of W4 ROs to that of hiRPCp2 to identify genes expressed by both groups or specifically by only one (**Fig. 2c**). These two groups showed 84.4% (9,619, **Supplemental Table 4a**) of their expressed genes to be in common. Based on our filtering criteria, 10.1% (1,153, **Supplemental Table 4b**) and 5.5% (622, **Supplemental Table 4c**) were considered to be specifically expressed in W4 ROs and hiRPCp2, respectively. (**Fig. 2c**). Filtering of the differentially expressed genes (DEGs) between hiRPCp2 and W4 ROs with a fold change (FC) ≥ 2 or ≤ 2 , a false discovery rate (FDR) ≤ 0.05 , and minimum expression of 10 TPM led to the identification of 940 genes (**Supplemental Table 4d**). Pathway enrichment analysis of these DEGs and circular representation clearly showed the deregulation of

pathways related to cell-cycle activity (GO:0006260; GO:0044772; GO:0000793; R-HSA-1640170) and brain and eye development (GO:0007420; GO:0001654), with mostly upregulated genes, based on the calculated z-score. By contrast, the progression of W4 ROs toward hiRPCp2 occurred without promoting differentiation (GO:0070848; GO:0045664; GO:0007423; GO:0007423; GO:0048598; GO:0010001; R-HSA-9675108), with the expression of most of the genes downregulated (**Fig. 2d**, **Supplemental Table 4e**). This analysis supports reinforcement of the multipotent and proliferative phenotype of hiRPCs cultivated in RPCM. We then filtered the results based on a $FC \geq 2$ before Metascape analysis to focus the GO term enrichment on upregulated genes only in W4 ROs and hiRPCp2 (**Fig. 2d**). Thus, 325 genes were selected for hiRPCp2 (**Supplemental Table 4f**) and 788 for W4 ROs (**Supplemental Table 4g**), showing mainly variations in structural components of the cells.

hiRPCs as a tool for retinogenesis studies

The maintenance of multipotency of the hiRPC population from W6 ROs during selection-expansion in RPCM provides an innovative tool to trigger the expression of genes involved in the early stages of retinogenesis. We selected genes for which the expression differs ($FC \geq 2$) in ROs between W4 and W6 and returns to their initial levels (as in W4 ROs) in expanded hiRPCp2 (**Supplemental Fig. 4d**). Such an approach led to the identification of 617 restored genes, potentially representing actors involved in the maintenance of multipotency, as well as early neurogenesis (**Supplemental Table 5a**). To select genes potentially involved in the multipotency of RPCs, we ranked them by their expression ratio (R), representing fold-expression changes of genes between W4 and W6 ROs (**Supplemental Table 5b**). $R > 1$ and $R < 1$ identified genes for which the expression decreased or increased between W4 and W6 ROs, respectively. A heatmap representing genes with a ratio > 5 (**Fig. 2g**) confirmed the presence of genes already known to be multipotency makers, such as *GJA1*, *BMP7*, *IGFBP5*, and *CCND2*, validated by RT-qPCR (**Supplemental Fig. 4a**). From these data, we propose a short list of genes (*VAX1*, *ALDH1A3*, *CLDN1*, *DSP*, *RAB38*, *VAMP5*, *SMOC1*, *RAB29*, *ADAMTS9*, *ETNPPL*, *HAS2*, *ELK3*, *TAGLN*, *PRELP*, *CA2*, *KCNJ13*, *LAMB1*, *GAS2L1*, *ABCA4*, *MAMDC2*, and *CD74*) and one new transcript (AL035425.3) that could be considered as potential new markers of RPC multipotency (**Fig. 2g**, **Supplemental Table 5b**).

Interestingly, genes involved in microphthalmia (*VAX1*, *ALDH1A3*, *GJA1*, and *SMOC1*) and retinal dystrophies (*ADAMTS9*, *KCNJ13*, and *ABCA4*) were also selected (**Fig. 2g**). Reciprocally, the $R < 1$ transcript list contained genes involved in neurogenesis, such as *MAP1B*, *SPP1*, *FOXN4*, and *GADD45A*, validated by RT-qPCR (**Supplemental Fig. 4b**), and in the early differentiation of RPCs, such as *CRX*, *NEUROD1*, and *POU4F1* (**Supplemental Table 5b**).

Neuroretinal cell production from hiRPCs

The next step was to demonstrate that our newly generated hiRPCs are able to differentiate into the various retinal cell types. Thus, pro-neural medium was used, as described for RO maturation in floating culture¹⁷, to trigger retinal differentiation (**Fig. 1a**). Although hiRPC differentiation can be performed at different passages (**Supplemental Fig. 6**), we decided to use hiRPCp3 generated from thawed and expanded hiRPCp1 (**Fig. 3a**). After five weeks (W5) in culture, hiRPCs differentiated mainly into photoreceptor precursors, identified by endogenous mCherry staining ($71.4\% \pm 8.4$), with rod photoreceptor precursors co-expressing mCherry and NRL ($46.7\% \pm 0.9$) (**Fig. 3b, c**). Non-photoreceptor cells expressing PAX6 represented $26.6\% \pm 3.4$, corresponding to amacrine cells (PAX6/AP2, $25.7\% \pm 3.3$) and horizontal cells (PAX6/LHX1, 2.9 ± 0.9) (**Fig 3b, c**). RT-qPCR confirmed increased expression of these specific cell markers (*CRX*, *NRL*, *PAX6*, *AP2*, and *LHX1*) during culture from W1 to W5 (**Fig. 3d**). To accelerate and promote photoreceptor precursor generation, we cultured hiRPCs for three weeks in ProNM containing the NOTCH inhibitor DAPT, previously reported to promote photoreceptor differentiation within hiPSC-derived retinal organoids⁷ (**Fig. 3a**). Quantitative analysis showed mCherry⁺ photoreceptor precursors to represent $69.0\% \pm 6.0$ at W1, $87.2\% \pm 3.14$ at W2, and $75.5\% \pm 4.1$ at W3, whereas only $21.9\% \pm 1.2$, 43.9 ± 6.56 , and $52.0\% \pm 17.22$ of mCherry⁺ cells were observed in the absence of DAPT at the same corresponding time points (**Fig. 3f**). RT-qPCR analysis confirmed the upregulation of the photoreceptor marker CRX in cultures with DAPT at W1, W2, and W3 (**Fig. 3g**). Concerning the differentiation of hiRPCs into the RGC lineage, RT-qPCR analysis of BRN3A and BRN3B expression showed that ProNM does not clearly induce the generation of RGCs from hiRPCs. However, culturing hiRPCs in BM allowed transient expression of RGC markers at W1

relative to their culture in ProNM (**Fig. 3h**). Decreased BRN3A and BRN3B expression after W1 may reflect the loss of hiRPC-derived RGCs under these culture conditions (**Fig. 3h, Supplemental Fig. 5d**). Quantitative analysis of identified RGCs by immunostaining in BM at W1 showed $7.7\% \pm 3.5$ BRN3A⁺ cells among $78.1\% \pm 5.9$ of PAX6⁺ cells in the presence of $29.4\% \pm 3.6$ of mCherry⁺ photoreceptor precursors (**Fig. i, j, Supplemental Fig. 5**).

Retinal pigmented epithelial cell generation from hiRPCs

Based on the identification of the pre-neurogenic state of hiRPCs, we tested the ability of these new progenitors to differentiate into RPE cells. hiRPCs were submitted to spontaneous differentiation using BM for 12 weeks (W12) (**Fig. 4a**). Under these conditions, pigmented cells could be observed (**Fig. 4b**) and phase contrast imaging confirmed the RPE cell morphology (**Fig. 4c**). RT-qPCR analysis for specific RPE markers showed increased expression of *MITF*, *SERPINF1*, *VEGFA*, and *BEST1* from W1 to W12, confirming cell commitment towards the RPE lineage (**Fig. 4d**). To exclude the potential contamination of RPE cells in banked hiRPCs, we added FGF2, reported to be a factor necessary for the differentiation of retinal progenitors towards the neuroretinal lineage, at the expense of the RPE lineage, during retinogenesis²⁷. The presence of FGF2 completely prevented the appearance of RPE cells and markers (**Fig. 4b, d, e**). HiRPC-derived RPEs (hiRPEs) at W12 were passed (noted as hiRPEp0) and formed a confluent cell monolayer after one week that displayed the classical RPE morphology (**Fig. 4f**). Immunostaining targeting MITF and ZO-1 confirmed the identity of RPE cells, with regular tight junctions and without mCherry expression (**Fig. 4g**).

Discussion

In this study, we demonstrate, for the first time, that multipotent RPCs within hiPSC-derived ROs can be isolated, expanded, and cryo-preserved while maintaining their multipotency, illustrated by their ability to be differentiated into retinal cells after thawing. The multipotency of the hiRPCs was maintained by specific culture conditions using a new RPC-dedicated medium containing specific factors to mimic the environment of retinogenesis. During retinal development, RPCs have to maintain the proper balance between proliferation and differentiation to produce the full range of retinal cell types in sufficient numbers to generate a complete retina²⁸. It is well established that cell fate determination is controlled by a combination of extrinsic cues and intrinsic factors^{28–30}. Based on these data, various approaches, focusing mainly on extracellular signals, have been developed to isolate multipotent RPCs and amplify them. However, these processes failed to maintain multipotency in expanded RPCs^{12–14}. Based on the literature, we hypothesized that modulating specific signaling pathways, such as Wnt, Shh, EGF, and FGF signaling, could be sufficient to act on the intrinsic factors that control the proliferation and multipotency of RPCs. To recapitulate the environment of the developing tissue, we selected five extrinsic factors: the GSK3 inhibitor CHIR99021, mimicking WNT activation through beta-catenin accumulation in the cytoplasm and maintaining the human stem cell fate and expression of retinal progenitor markers^{31,32}; PURMORPHAMIN as an activator of the Shh pathway, sustaining RPC self-renewal and multiplication^{30,33–37} and reproducing Shh pathway activation by ganglion cells (RGCs) during retinogenesis; FGF2, the most highly used factor to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells and iPSCs in culture and shown to also potentiate the action of the Shh pathway and avoid RPE differentiation of progenitors^{38,39}; EGF, classically coupled to FGF2 in neural stem cell culture and promoting RPC proliferation at the expense of their differentiation⁴⁰; and ATP, which controls the cell cycle and RPC proliferation in the developing retina^{41–44}, mimicking RPE-release of ATP into the subretinal space⁴¹. Thus, we demonstrate that simultaneous activation of these specific pathways allows the selection and amplification of hiRPCs. Transcriptomic analysis (RT-qPCR and RNAseq) and immunofluorescence staining confirmed the high similarity

between RPCs within ROs and hiRPCs thawed and expanded until passage 4. The pro-neurogenic phenotype of hiRPCs was highlighted by transcriptomic analysis, as well as by the differentiation capacity of the hiRPCs. Interestingly, in addition to the ability to differentiate hiRPCs into RGCs, amacrine cells, horizontal cells, and photoreceptor precursors, they can also be differentiated into RPEs. This shows that RPCs within ROs still possess the intrinsic ability to regain the pre-neurogenic phenotype, depending on the extrinsic environment.

This valuable cell line was easy to use and produced millions of differentiated retinal cells in a short time under adherent conditions from a cryopreserved cell stock. Expanded hiRPCs can be directed to produce photoreceptor precursor-enriched cultures of up to 90% without a purification step, as required for drug discovery and cell therapy. Moreover, this transplantation-compatible cell population^{45–47} was produced under xeno-free conditions. Similarly, the ability to generate RGCs from hiRPCs may pave the way towards the future treatment of diseases that affect the optical nerve, such as glaucoma or diabetic retinopathy. In addition to being a substrate for the scaling up of the production of retinal cell types, hiRPCs appear to be a useful tool to study retinogenesis and associated diseases. Indeed, transcriptomic analysis comparing RO and hiRPC gene expression revealed potential new markers of multipotency, neurogenesis, and differentiation. Of note, specific transcriptomic analysis using gene expression filters selected genes involved in developmental retinal diseases, such as microphthalmia (VAX145, ALDH1A346, GJA147, SMOC148), and retinal dystrophies, such as age-related macular dystrophy (ADAMTS949–51), Leber congenital amaurosis (KCNJ1352,53), glaucoma (CA254), and Stargardt disease (ABCA455), supporting the use of this workflow to identify new genes that cause retinal diseases.

Overall, we used an innovative culture condition to generate a new human retinal multipotent cell line. This advanced cell line could become a gold standard cellular substrate to study retinogenesis, create disease models, and generate retinal cell libraries useful for cell therapy and drug discovery (**Fig. 5**).

Thus, hiRPCs and their cellular derivatives could convert hope to reality for the future accessibility of innovative treatments for millions of people suffering from degenerative retinal diseases.

Acknowledgments

We thank scientific platforms of the Institut de la Vision, S. Fouquet from the imaging facility, and Marie-Laure Niepon from the histology facility and A. Slembrouck-Brec for her help with cell cultures. We thank S. Picaud and A. Bayot for helpful discussions. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (RETINIT-iPS: ANR-19-CE18-0005), the Laboratoire d'Excellence LIFESENSES "SENSES FOR A LIFETIME" (LabEx LIFESENSES, ANR-10-LABX-65), the Institut Hospitalo-Universitaire FOrESIGHT "Enabling Vision Restoration" (IHU FOrESIGHT, ANR-18-IAHU-01), the institut CARNOT, the Fondation Voir et Entendre, the RETINA France Association and the foundation Valentin Haüy. S.G was supported by the Fondation de France.

Authors' contributions

S.G.: Conception and design, collection and/or assembly of the data, data analysis and interpretation, writing of the manuscript, and final approval of the manuscript. V.B., T.F, C.N., and A.P.: Collection and/or assembly of the data and data analysis and interpretation. M.C.: Collection and/or assembly of the data. G.O.: Data analysis and interpretation and final approval of the manuscript. J-A.S.: Administrative and financial support and final approval of the manuscript. O.G.: Provision of study material, data analysis and interpretation, and final approval of manuscript. J.E.R: Collection and/or assembly of the transcriptomic data, data analysis and interpretation, writing of the manuscript, and final approval of the manuscript.

S.R.: Financial support, conception and design, collection and/or assembly of the data, data analysis and interpretation, writing of the manuscript, and final approval of manuscript.

Disclosure of potential conflicts of interest

S.R., O.G., and J-A.S. are inventors on a patent on iPSC retinal differentiation (WO2014174492 and WO2018149985). S.R., O.G., and J-A.S. are inventors on a patent based on the work covered in this manuscript (WO2019170766).

References

1. Bell C.M., Zack D.J. & Berlinicke C.A. Human Organoids for the Study of Retinal Development and Disease. *Annual review of vision science* **6**, 91–114 (2020).
2. Uyama H., Mandai M. & Takahashi M. Stem-cell-based therapies for retinal degenerative diseases: Current challenges in the establishment of new treatment strategies. *Development, growth & differentiation* **63**, 59–71 (2021).
3. Alfonsetti M. *et al.* Looking for In Vitro Models for Retinal Diseases. *International journal of molecular sciences* **22**, (2021).
4. Afanasyeva T.A.V. *et al.* A look into retinal organoids: methods, analytical techniques, and applications. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* (2021) doi:10.1007/S00018-021-03917-4.
5. Cepko, C. Intrinsically different retinal progenitor cells produce specific types of progeny. *Nature reviews. Neuroscience* **15**, 615–627 (2014).
6. Kelley, M. W., Turner, J. K. & Reh, T. a. Regulation of proliferation and photoreceptor differentiation in fetal human retinal cell cultures. *Investigative ophthalmology & visual science* **36**, 1280–9 (1995).
7. Reichman, S. *et al.* From confluent human iPS cells to self-forming neural retina and retinal pigmented epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 8518–23 (2014).
8. 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).
9. Lamba, D. a, Karl, M. O., Ware, C. B. & Reh, T. a. Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 12769–74 (2006).
10. Nakano, T. *et al.* Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell stem cell* **10**, 771–85 (2012).
11. Zhong, X. *et al.* Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs. *Nature communications* **5**, 4047 (2014).

12. Mansergh, F. C. *et al.* Loss of photoreceptor potential from retinal progenitor cell cultures, despite improvements in survival. *Experimental eye research* **91**, 500–12 (2010).
13. Czekaj, M. *et al.* In vitro expanded stem cells from the developing retina fail to generate photoreceptors but differentiate into myelinating oligodendrocytes. *PLoS one* **7**, e41798 (2012).
14. Ringuette, R. *et al.* Combinatorial Hedgehog and Mitogen Signaling Promotes the In Vitro Expansion but Not Retinal Differentiation Potential of Retinal Progenitor Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **55**, 43 (2014).
15. 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).
16. Reichman, S. *et al.* Generation of Storable Retinal Organoids and Retinal Pigmented Epithelium from Adherent Human iPSCs in Xeno-Free and Feeder-Free Conditions. *STEM CELLS* **35**, 1176–1188 (2017).
17. Slembrouck-Brec, A., Nanteau, C., Sahel, J.-A., Goureau, O. & Reichman, S. Defined Xeno-free and Feeder-free Culture Conditions for the Generation of Human iPSC-derived Retinal Cell Models. *Journal of Visualized Experiments* (2018) doi:10.3791/57795.
18. Dobin A. *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics (Oxford, England)* **29**, 15–21 (2013).
19. Liao Y., Smyth G.K. & Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics (Oxford, England)* **30**, 923–930 (2014).
20. Chen, Y. *et al.* edgeR: differential analysis of sequence read count data User's Guide. *R package* 1–121 (2020).
21. Zhou Y. *et al.* Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nature communications* **10**, (2019).
22. Walter W., Sánchez-Cabo F. & Ricote M. GOplot: an R package for visually combining expression data with functional analysis. *Bioinformatics (Oxford, England)* **31**, 2912–2914 (2015).
23. Chen, G. *et al.* Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nature methods* **8**, 424–429 (2011).
24. Mao, X. *et al.* Single-Cell RNA Sequencing of hESC-Derived 3D Retinal Organoids Reveals Novel Genes Regulating RPC Commitment in Early Human Retinogenesis. *Stem Cell Reports* **13**, 747–760 (2019).
25. Trimarchi, J. M., Stadler, M. B. & Cepko, C. L. Individual retinal progenitor cells display extensive heterogeneity of gene expression. *PLoS one* **3**, e1588 (2008).
26. Clark, B. S. *et al.* Single-Cell RNA-Seq Analysis of Retinal Development Identifies NFI Factors as Regulating Mitotic Exit and Late-Born Cell Specification. *Neuron* **102**, 1111–1126.e5 (2019).
27. Fuhrmann, S. *Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle. Current Topics in Developmental Biology* vol. 93 (2010).
28. Levine, E. M. & Green, E. S. Cell-intrinsic regulators of proliferation in vertebrate retinal progenitors. *Seminars in cell & developmental biology* **15**, 63–74 (2004).
29. Marquardt, T. & Gruss, P. Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends in neurosciences* **25**, 32–8 (2002).

30. Agathocleous, M. & Harris, W. a. From progenitors to differentiated cells in the vertebrate retina. *Annual review of cell and developmental biology* **25**, 45–69 (2009).
31. Camp, J. K. Van, Beckers, S., Zegers, D. & Hul, W. Van. Wnt Signaling and the Control of Human Stem Cell Fate. 207–229 (2014) doi:10.1007/s12015-013-9486-8.
32. Meyers, J. R. *et al.* β -catenin / Wnt signaling controls progenitor fate in the developing and regenerating zebrafish retina β -catenin / Wnt signaling controls progenitor fate in the developing and regenerating zebrafish retina. (2012).
33. Amato M.A., Boy S. & Perron M. Hedgehog signaling in vertebrate eye development: a growing puzzle. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **61**, 899–910 (2004).
34. Wang, Y., Dakubo, G. D., Thurig, S., Mazerolle, C. J. & Wallace, V. a. Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog locally controls proliferation and the timing of RGC development in the embryonic mouse retina. *Development (Cambridge, England)* **132**, 5103–13 (2005).
35. Wallace, V. a. Proliferative and cell fate effects of Hedgehog signaling in the vertebrate retina. *Brain research* **1192**, 61–75 (2008).
36. Borday, C. *et al.* Antagonistic cross-regulation between Wnt and Hedgehog signalling pathways controls post-embryonic retinal proliferation. *Development (Cambridge, England)* **139**, 3499–509 (2012).
37. Wall, D. S. *et al.* Progenitor cell proliferation in the retina is dependent on Notch-independent Sonic hedgehog/Hes1 activity. *The Journal of cell biology* **184**, 101–12 (2009).
38. Spence, J. R. *et al.* The hedgehog pathway is a modulator of retina regeneration. *Development (Cambridge, England)* **131**, 4607–21 (2004).
39. Yang, X.-J. Roles of cell-extrinsic growth factors in vertebrate eye pattern formation and retinogenesis. *Seminars in cell & developmental biology* **15**, 91–103 (2004).
40. Ahmad, I., Das, A. V, James, J., Bhattacharya, S. & Zhao, X. Neural stem cells in the mammalian eye: types and regulation. *Seminars in cell & developmental biology* **15**, 53–62 (2004).
41. Pearson, R. a, Dale, N., Llaudet, E. & Mobbs, P. ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron* **46**, 731–44 (2005).
42. Sholl-Franco, A., Fragel-Madeira, L., Macama, A. D. C. C., Linden, R. & Ventura, A. L. M. ATP controls cell cycle and induces proliferation in the mouse developing retina. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* **28**, 63–73 (2010).
43. Almeida-pereira, L. De *et al.* Adenine Nucleotides Control Proliferation In Vivo of Rat Retinal Progenitors by P2Y 1 Receptor. *Molecular Neurobiology* (2016) doi:10.1007/s12035-016-0059-0.
44. Ornelas, I. M. & Ventura, A. L. M. Involvement of the PI3K/AKT pathway in ATP-induced proliferation of developing retinal cells in culture. *International Journal of Developmental Neuroscience* **28**, 503–511 (2010).
45. Lakowski, J. *et al.* Effective transplantation of photoreceptor precursor cells selected via cell surface antigen expression. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **29**, 1391–404 (2011).

46. Ferreira, T. S., Postel, K., Stutzki, H., Zeck, G. & Ader, M. Daylight Vision Repair by Cell Transplantation. 1–15 (2014) doi:10.1002/stem.1824.
47. Gagliardi, G., Ben M'Barek, K. & Goureau, O. Photoreceptor cell replacement in macular degeneration and retinitis pigmentosa: A pluripotent stem cell-based approach. *Progress in Retinal and Eye Research* (2019) doi:10.1016/j.preteyeres.2019.03.001.

Figures and legends

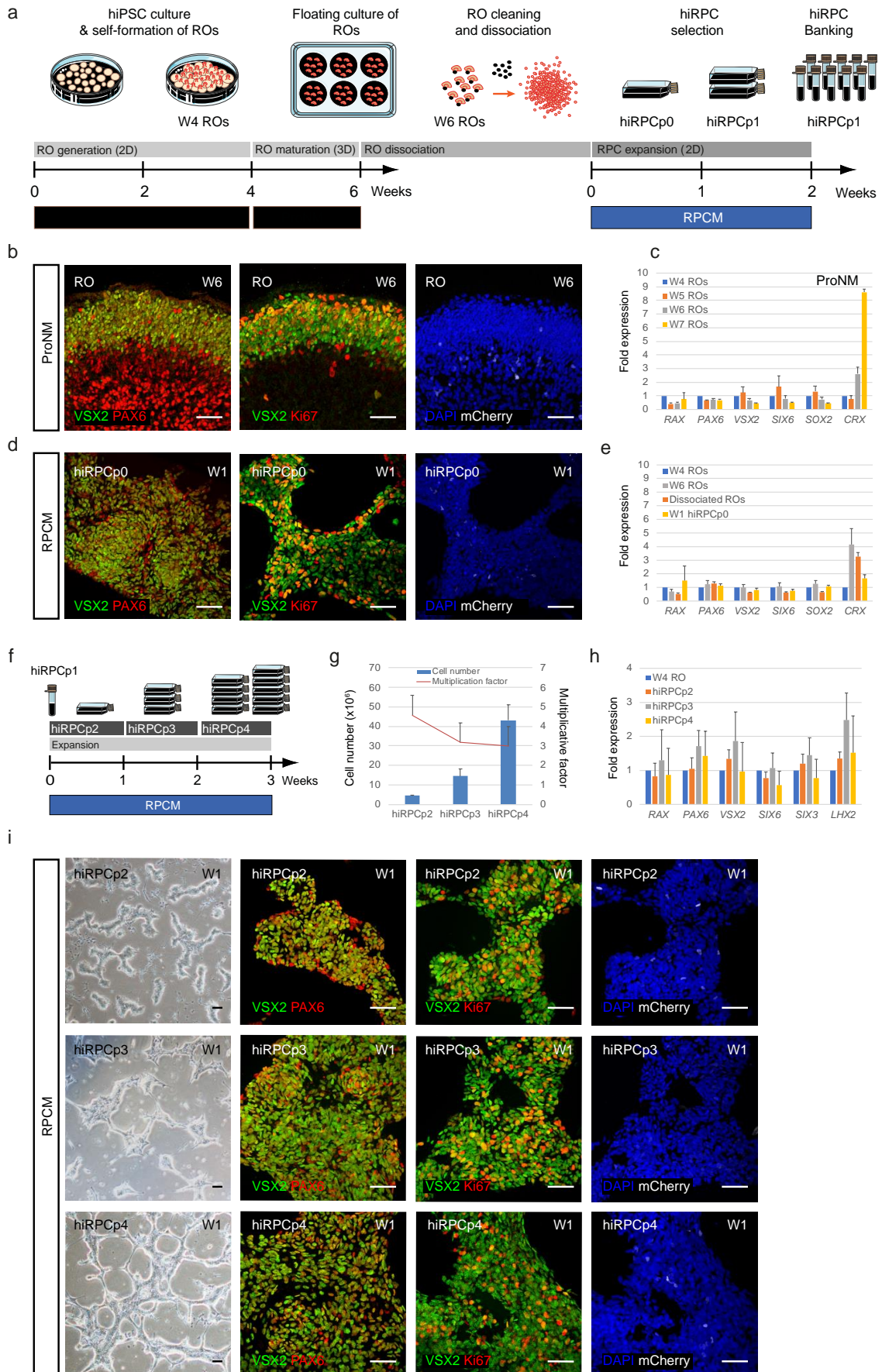


Fig. 1: Generation and characterization of a retinal progenitor cell line from iPSC-derived retinal organoids. **a**, Schematic diagram illustrating the protocol for the generation of RPCs from hiPSCs and cell banking. **b**, Immunofluorescence staining of cryosectioned ROs at W6 for VSX2, PAX6, Ki67, and endogenous mCherry staining. **c**, RT-qPCR analysis of eye-field transcription factors (EFTFs; *RAX*, *PAX6*, *VSX2*, *SIX6*), *SOX2*, and *CRX* in ROs between W4 and W7. Data are normalized to that of W4 ROs. **d**, Immunofluorescence staining of hiRPCp0 after one week of culture (W1) in RPCM for VSX2, PAX6, and Ki67 and endogenous mCherry staining. **e**, RT-qPCR analysis of EFTFs (*RAX*, *PAX6*, *VSX2*, *SIX6*), *SOX2*, and *CRX* in ROs at W4 and W6, dissociated ROs at day 1, and hiRPCp0 expanded for one week (W1) in RPCM. Data are normalized to that of W4 ROs. **f**, Schematic diagram illustrating hiRPC expansion in RPCM from cryopreserved hRPCp1 to hiRPCp4 in three weeks. **g**, Multiplication factor (red) and hiRPC number (bleu histograms) after successive passages. **h**, RT-qPCR analysis of EFTFs (*RAX*, *PAX6*, *VSX2*, *SIX6*, *SIX3*, *LHX2*) in W4 ROs and hiRPCp2 to hiRPCp4. Data are normalized to that of W4 ROs. **i**, hiRPC characterization after one week (W1) of culture in RPCM by phase-contrast and brightfield microscopy (left panels) and immunofluorescence staining of hiRPCp2, hiRPCp3, and hiRPCp4 for VSX2, PAX6, and Ki67 and endogenous expression of mCherry. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: **b, d, i**, 50 μ m.

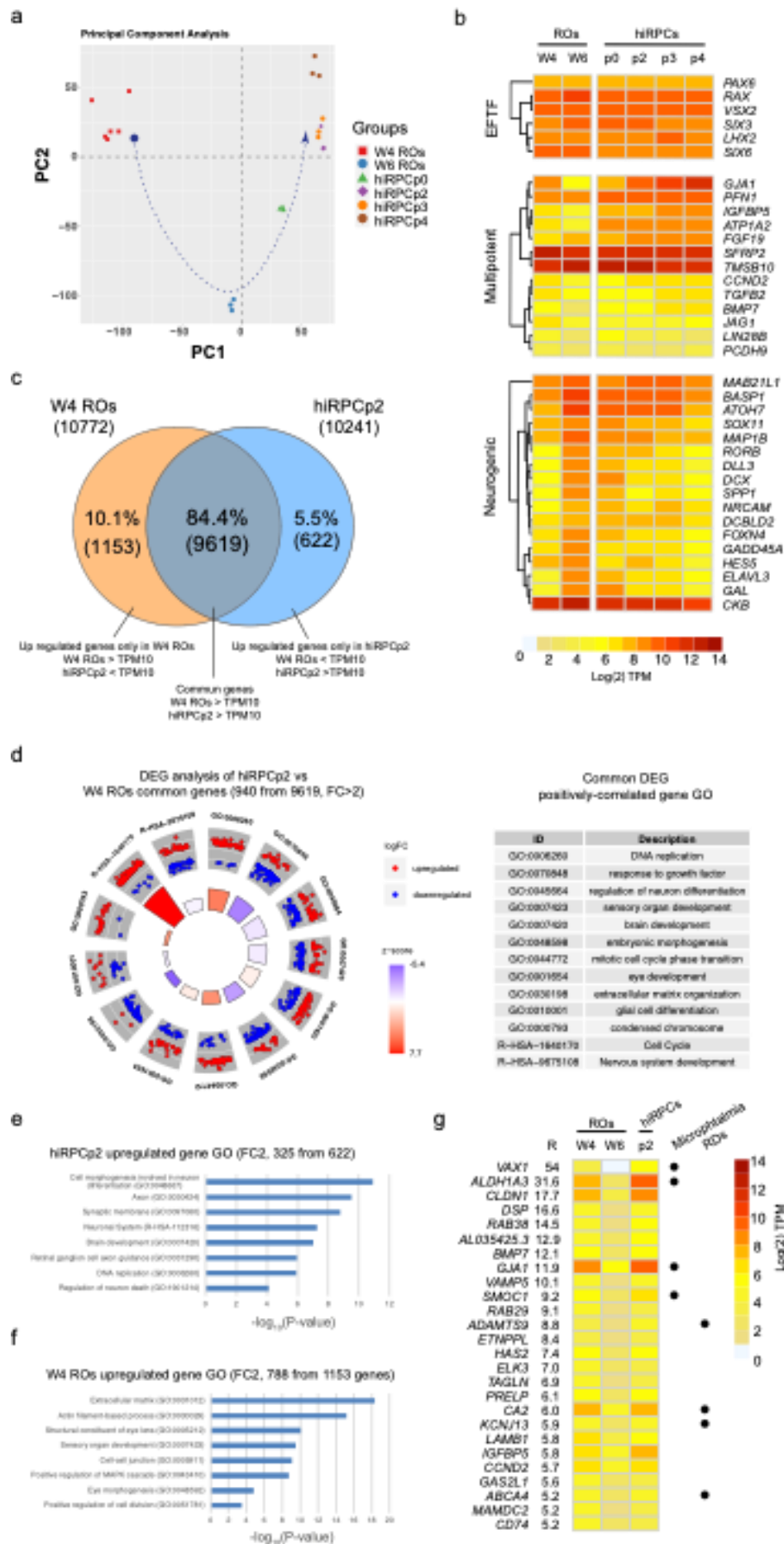


Fig. 2: Transcriptomic characterization of hiRPCs by RNAseq analysis. **a**, Principal component analysis (PCA) of W4 ROs, W6 ROs, hiRPCp0, and hiRPCp2-4. Each point represents one sample and biological replicates are shown in the same color. **b**, Hierarchical clustering of EFTFs and multipotent and neurogenic gene markers in W4 ROS, W6 ROS, hiRPCp0, and hiRPCp2-4. hiRPCs were expanded for one week in RPCM. **c**, Venn diagram of genes expressed in W4 ROs and hiRPCp2 with TPM ≥ 10 . **d**, Circular visualization (left panel) and Table of the over-represented GO pathways of interest (right panel) identified with Metascape using the DEGs between hiRPC2 and W4 ROs with a FC ≥ 2 , FDR ≤ 0.05 , and TPM ≥ 10 in both groups. Red dots (upregulated genes) and blue dots (downregulated genes) represent an overview of regulated genes in hiRPC2 relative to W4 ROs. Z-score bars indicate whether an entire biological process is more likely to be increased or decreased based on the genes within it. **e**, Gene ontology (GO) enrichment analysis for upregulated genes with fold change (FC) ≥ 2 in hiRPCp2. **f**, GO enrichment analysis for upregulated genes with FC ≥ 2 and FDR ≤ 0.05 in W4 ROs. **g**, Heatmap of genes with $R = (W4\ RO\ TPM) / (W6\ RO\ TPM) > 5$. Black dots indicate genes associated with microphthalmia or retinal dystrophies (RDs).

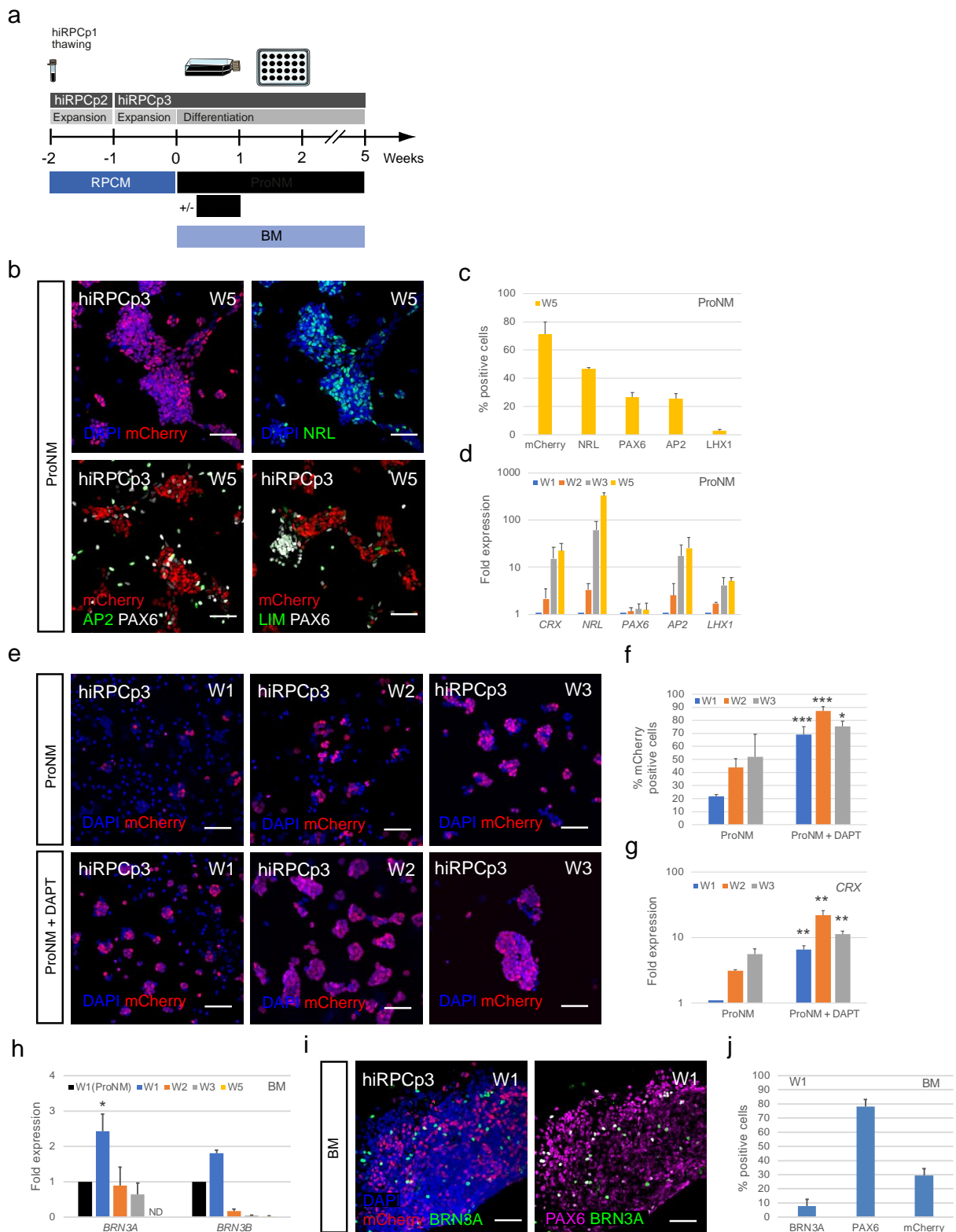


Fig. 3: Differentiation of hiRPCs into neuroretinal cells. **a**, Schematic diagram illustrating the differentiation protocol to generate early retinal cell types. **b**, Immunofluorescence staining and endogenous expression of differentiated hiRPCp3 after five weeks (W5) of culture in ProNM for mCherry (photoreceptor precursors), NRL (rod photoreceptor precursors), AP2 (amacrine cells), LIM

(horizontal cells), and PAX6 (amacrine and horizontal cells). **c**, High-content analysis of mCherry, NRL, AP2, and LHX1⁺ cells (%) in adherent cultures of hiRPCp3 differentiated in ProNM at W5. **d**, RT-qPCR analysis of neuroretinal markers (*CRX*, *NRL*, *AP2*, and *LHX1*) in hiRPCp3 differentiated in ProNM from W1 to W3 and at W5. Data were normalized to that of differentiated hiRPCp3 at W1. **e**, Endogenous expression of mCherry of hiRPCp3 differentiated in ProNM ± DAPT from W1 to W3. **f**, High-content analysis of mCherry⁺ cells (%) in adherent cultures of hiRPCp3 differentiated in ProNM ± DAPT from W1 to W3. **g**, RT-qPCR analysis of the photoreceptor precursor marker *CRX* in hiRPCp3 differentiated in ProNM ± DAPT from W1 to W3. Data were normalized to that of hiRPCp3 differentiated in ProNM at W1. **h-i**, RT-qPCR analysis of the retinal ganglion cell (RGC) markers *BRN3A* and *BRN3B* in hiRPCp3 differentiated in ProNM or BM from W1 to W3 and W5. Data were normalized to that of hiRPCp3 differentiated in ProNM at W1. **j**, Immunofluorescence staining of hiRPCp3 differentiated in BM at W1 for mCherry (photoreceptor precursors), *BRN3A* (RGCs), and PAX6. **k**, High-content analysis of mCherry (photoreceptor precursors), *BRN3A* (RGCs), and PAX6⁺ cells (%) in adherent cultures of hiRPCp3 differentiated in BM at W1. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: **b**, **e**, **j**, 50 μm. *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.005.

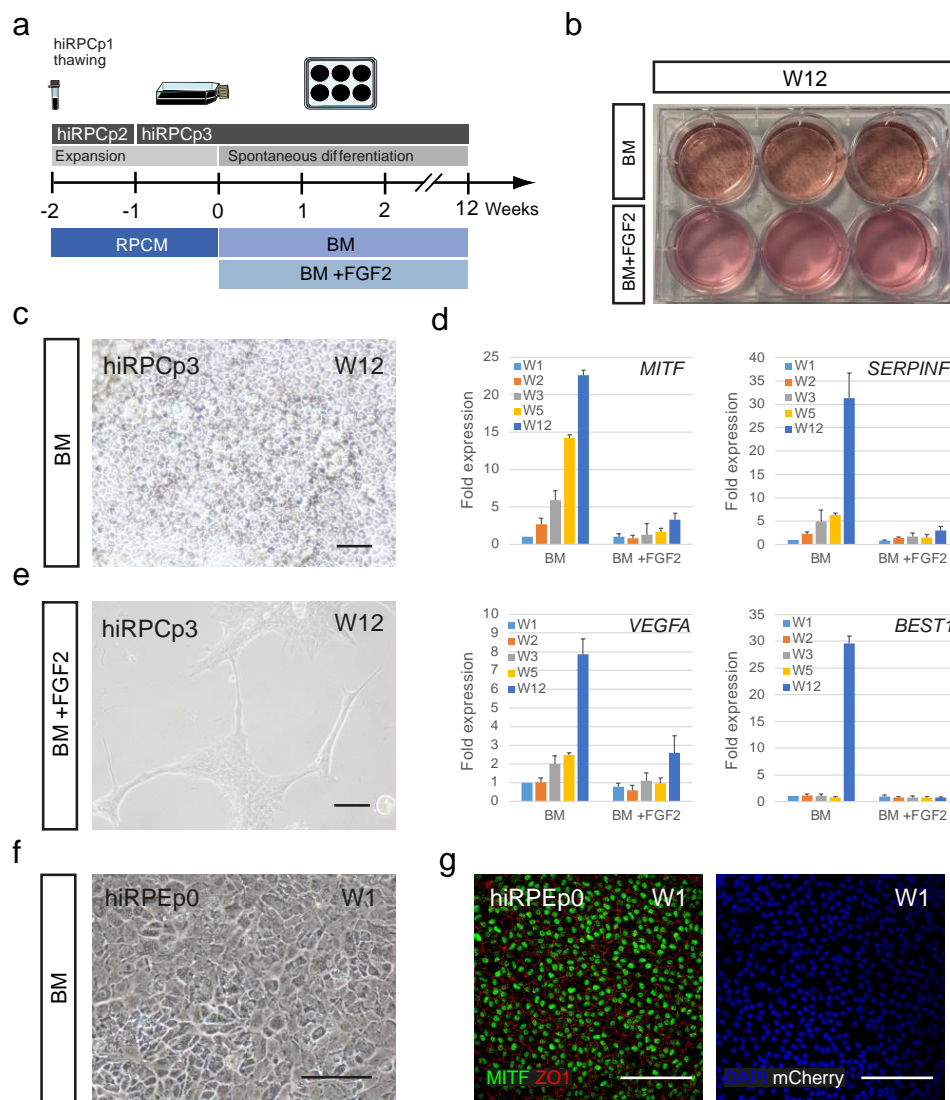


Fig. 4: RPE generated from human iPSC-derived RPCs. **a**, Schematic diagram illustrating the differentiation protocol of RPE generation from hiRPCp3. **b**, Photograph of a six-well plate of differentiated hiRPCp3 at W12 using BM ± FGF2. **c**, Phase-contrast image of hiRPCp3 cultured in BM at W12. **d**, RT-qPCR analysis of specific RPE markers in hiRPCp3 cultured in BM or BM + FGF2 from W1 to W3 and at W5 and W12. All expression was normalized to that of W1 hiRPCs cultured in BM. **e**, Phase-contrast image of hiRPCp3 at W12 cultured in BM + FGF2. **f**, Phase-contrast image of hiRPC-derived RPE at passage 0 (hiRPEp0) at W1. **g**, immunofluorescence staining of hiRPEp0 for MITF, ZO1, and endogenous mCherry staining. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: **c**, **e**, **g**, **h** 50 μ m.

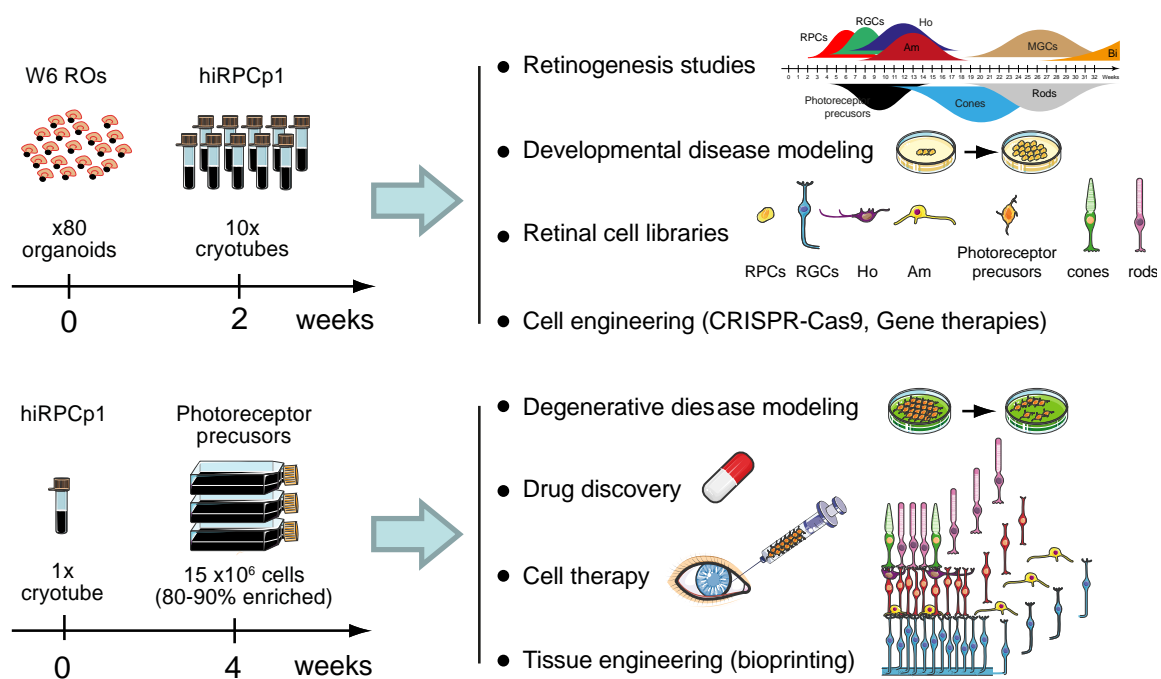
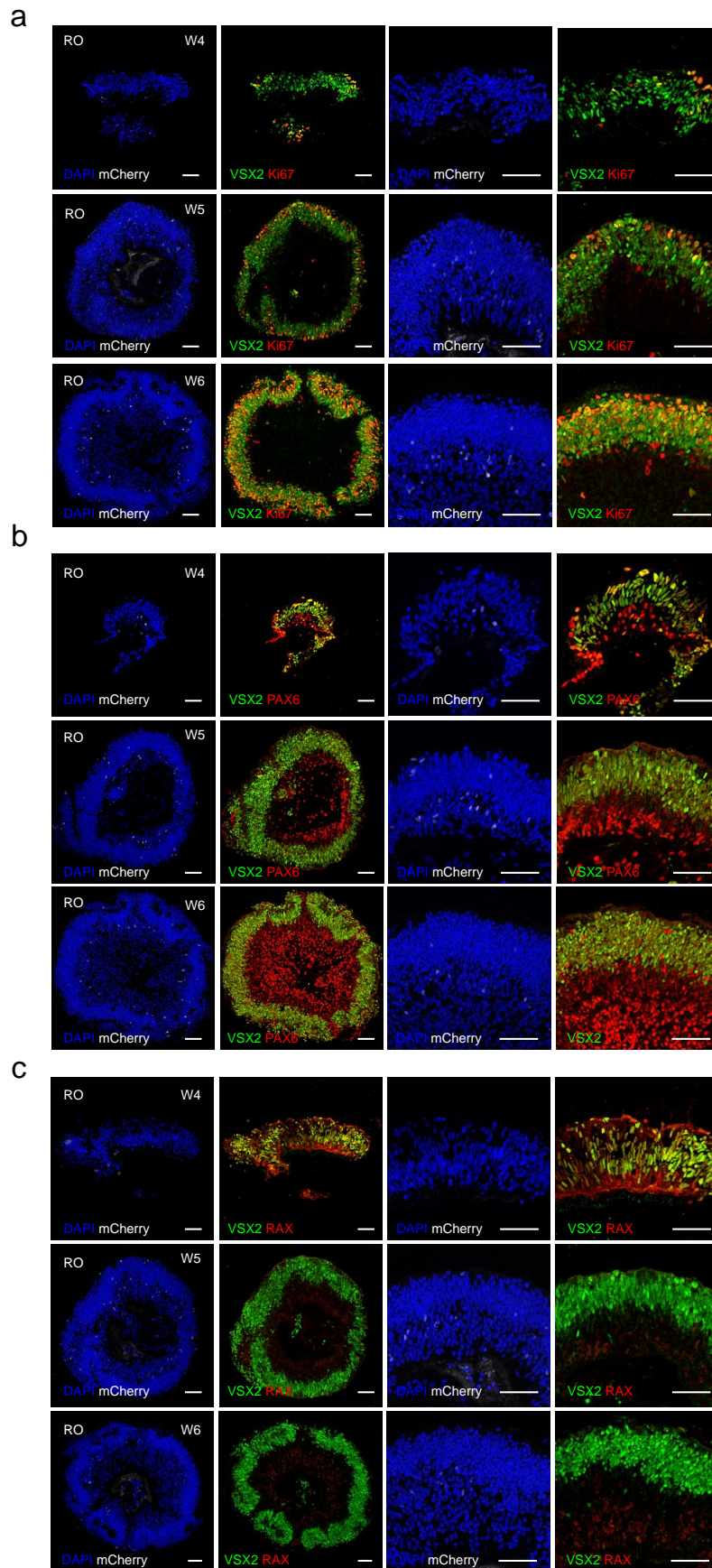
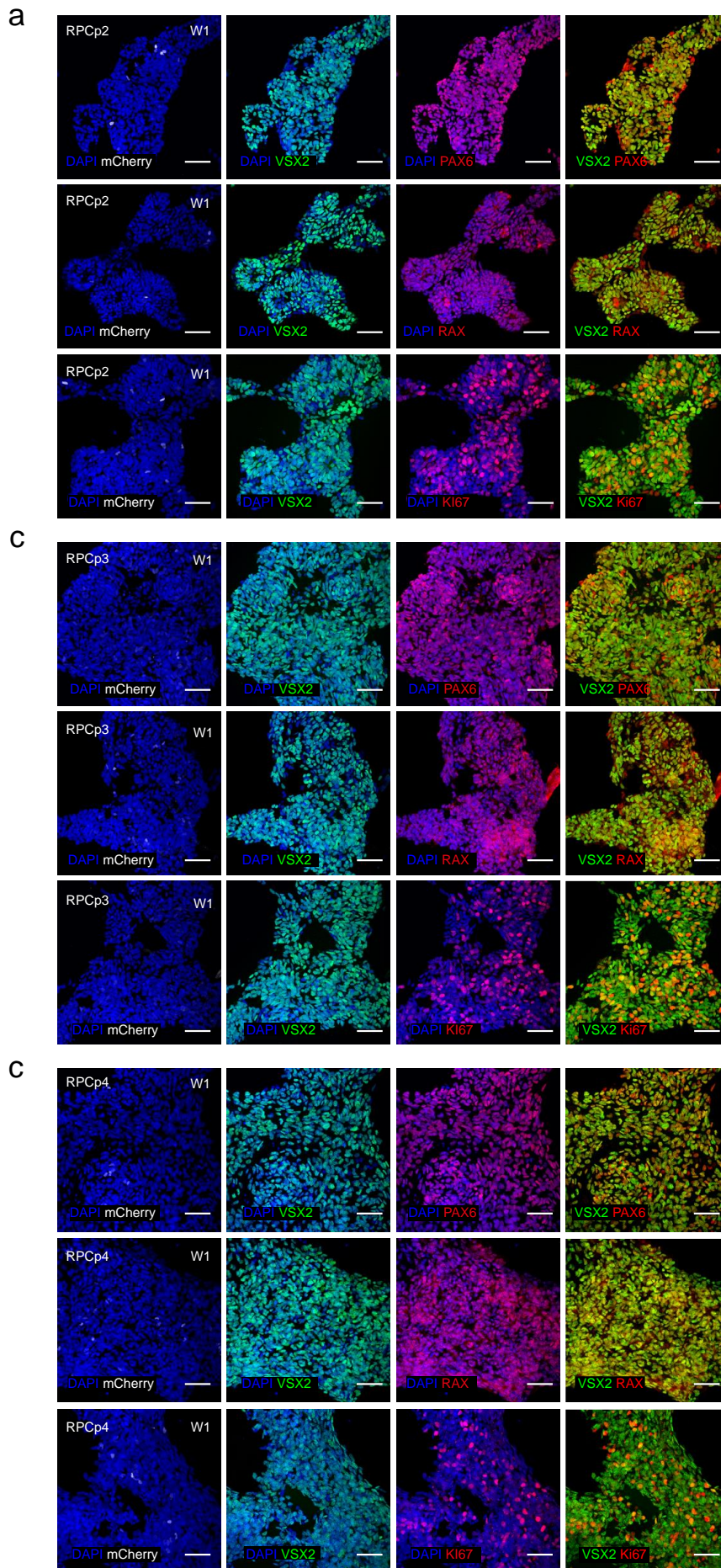


Fig. 5: Usefulness of hiRPCs and their cell derivatives. hiRPCs could be used for retinogenesis studies, developmental disease modeling, the generation of retinal cell libraries, and as cell substrates for cell engineering. Derived retinal cells from hiRPCs could be used for patient-based degenerative disease modeling, drug discovery, cell therapy, and tissue engineering.

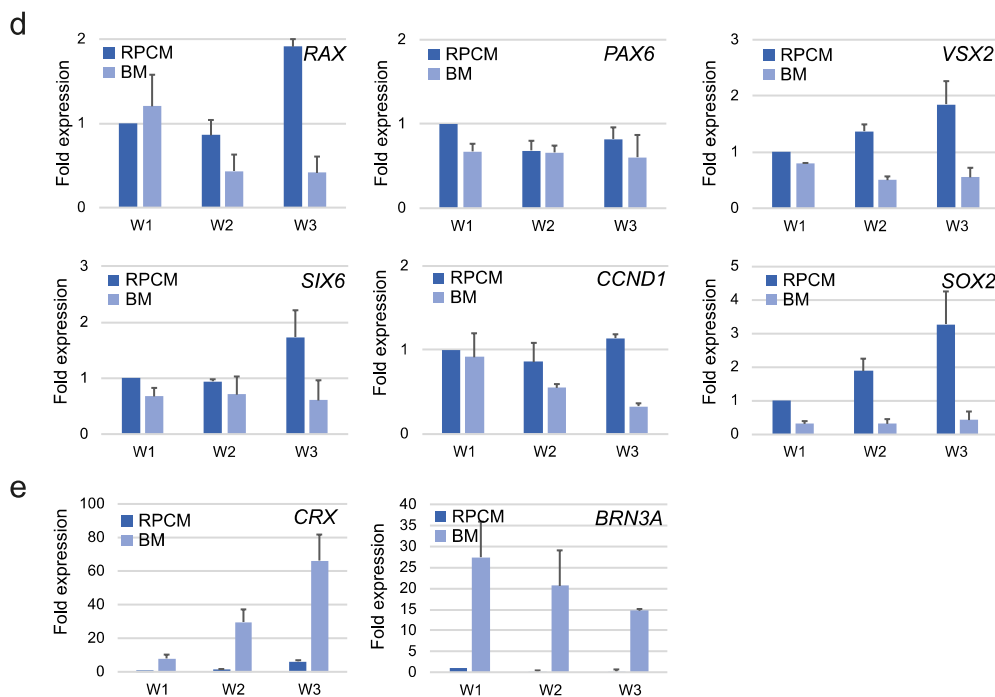
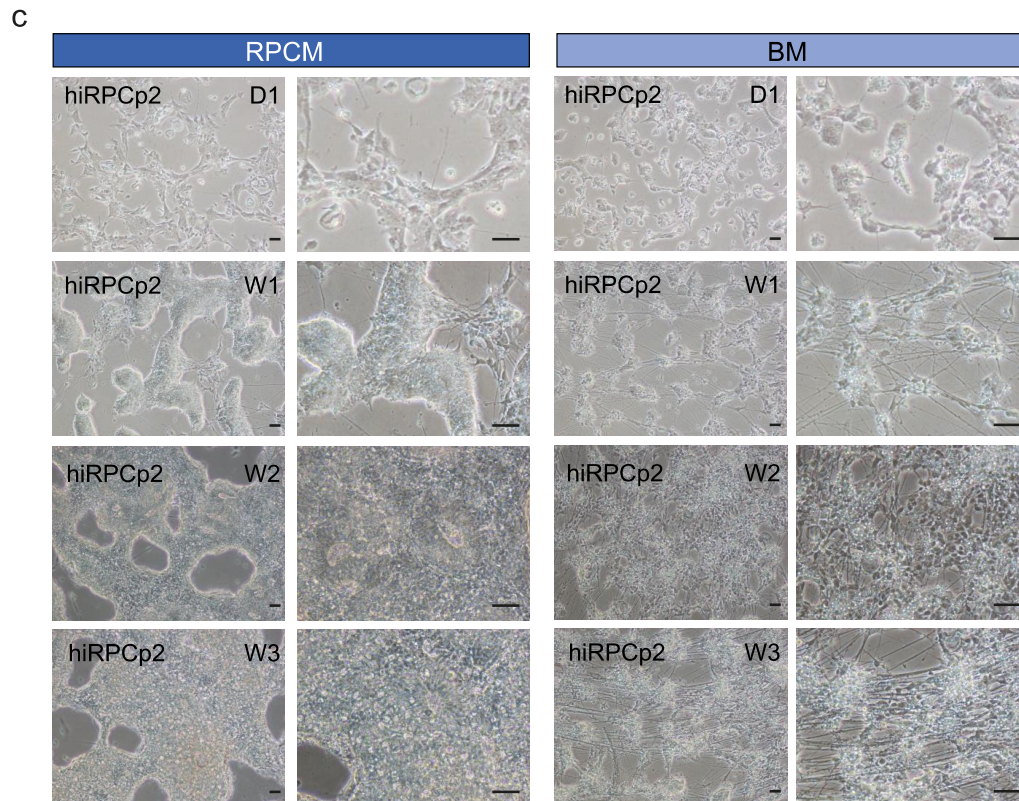
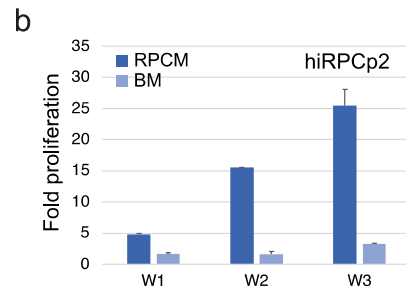
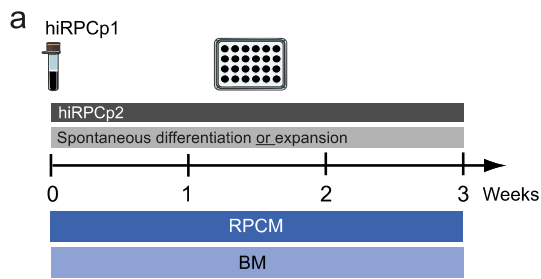
Supplemental Figures and legends



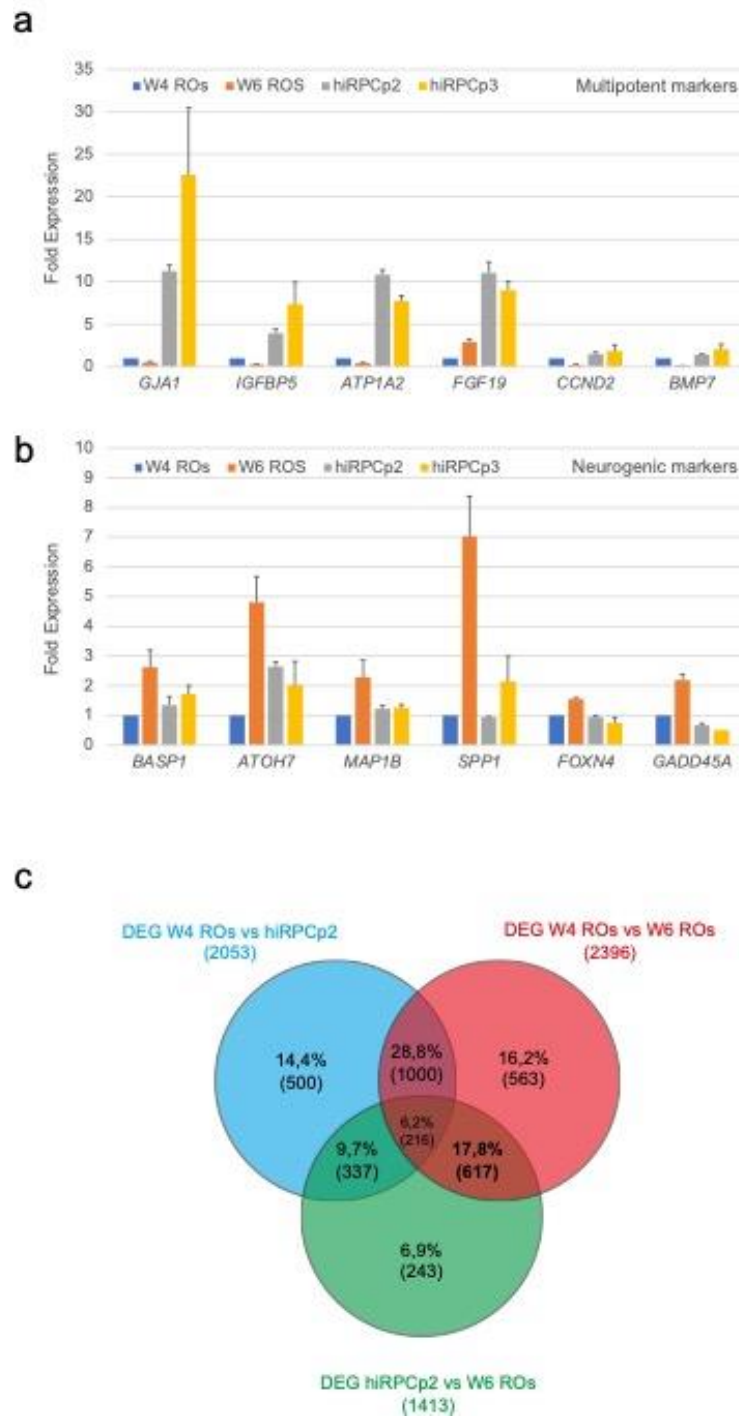
Supplemental Fig. 1: Characterization of RPC population in W4, W5, and W6 ROs. a, Immunofluorescence staining for VSX2 and Ki67 and mCherry fluorescence of cryosectioned W4, W5, and W6 ROs. **b,** Immunofluorescence staining for VSX2 and PAX6 and mCherry endogenous fluorescence of cryosectioned W4, W5, and W6 ROs. **c,** Immunofluorescence staining for VSX2 and RAX and endogenous mCherry fluorescence of cryosectioned W4, W5, and W6 ROs. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: **a, b, c,** 50 μm .



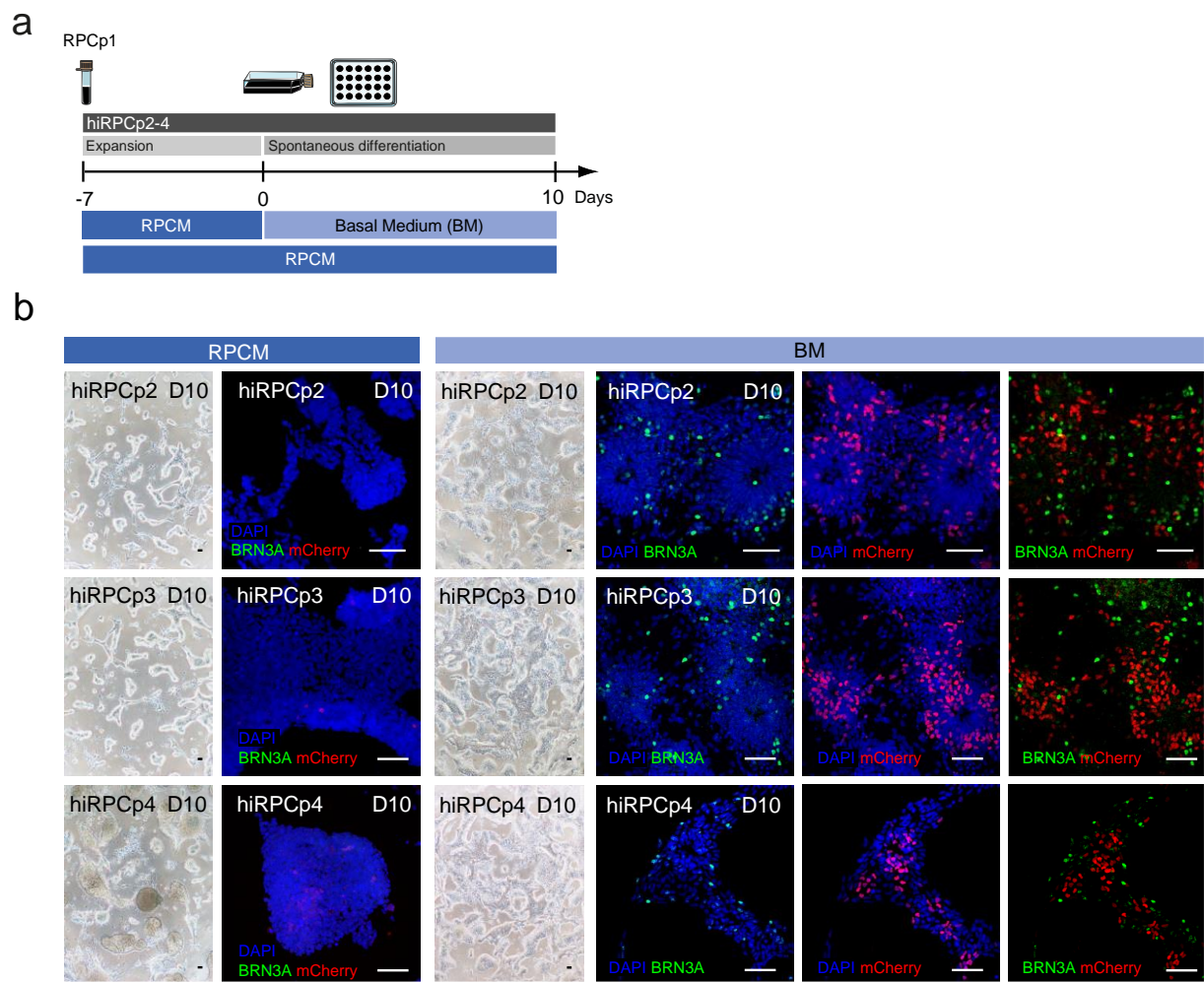
Supplemental Fig. 2: Characterization of thawed hiRPCs at different passages. **a**, Endogenous mCherry and immunofluorescence staining of RPCM-cultured hiRPCp2 at W1 post passage for VSX2, PAX6, RAX, and Ki67. **b**, Endogenous mCherry and immunofluorescence staining of RPCM-cultured hiRPCp3 at W1 post passage for VSX2, PAX6, RAX, and Ki67. **c**, Endogenous expression of mCherry and immunofluorescence staining of RPCM-cultured hiRPCp4 at W1 post passage for VSX2, PAX6, RAX, and Ki67. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: **a, b, c**, 50 μm .



Supplemental Fig. 3: Multipotency and proliferation analysis of hiRPCp2 cultured in RPCM or BM. a, Schematic diagram illustrating hiRPCp2 expansion in RPCM or BM for three weeks without passage from cryopreserved hRPCp1. **b,** Proliferation analysis of hiRPCp2 cultured in RPCM or BM after W1 , W2, and W3. **c,** Phase-contrast images of hiRPCp2 cultured in RPCM or BM at day 1 (D1), W1, W2, and W3. **d,** RT-qPCR analysis of EFTFs (*RAX*, *PAX6*, *VSX2*, *SIX6*) , *SOX2*, and *CCDN1* in hiRPCp2 cultured in RPCM or BM at W1 , W2, and W3. **e,** RT-qPCR analysis of specific photoreceptor (*CRX*) and RGC (*BRN3A*) markers. All data were normalized to expression of the gene in hiRPCp2 cultured in RPCM at W1 . Scale bar: **c**, 100 μ M.



Supplemental Fig. 4: RNAseq gene validation by RT-qPCR and Venn Diagram of DEGs of hiRPCp2 vs W4 ROs vs W6 ROs. a, RT-qPCR analysis of the multigenic gene markers *GJA1*, *IGFBP5*, *ATP1A2*, *FGF19*, *CCND2*, and *BMP7*. **b,** RT-qPCR analysis of the neurogenic gene markers *BASP1*, *ATOH7*, *MAP1B*, *SPP1*, *FOXN4*, and *GADD45A*. All data were normalized to the expression of the gene in W4 ROs, composed mainly of RPCs. **c,** This representation highlights 617 genes varying in expression between W4 and W6 ROs and between hiRPCp2 and W6 ROs, but not between W4 ROs and hiRPCp2.



Supplemental Fig. 5: Spontaneous differentiation of hiRPCp2-4 in BM. **a**, Schematic diagram illustrating hiRPCp2-4 from cryopreserved hRPCp1 cultured in RPCM or BM. **b**, Phase-contrast image and immunofluorescence staining for BRN3A (RGCs) and endogenous expression of mCherry in hiRPCp2 to hiRPCp4 after 10 days (D10) in BM or RPCM. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: **b**, 50 μ M.

Supplemental Tables

Supplemental Table 1: List of Taqman Gene Expression ID Assays used for qRT-PCR.

Gene Symbols	Assays IDs (Life technology)
<i>18S</i>	18S-Hs99999901_s1
<i>AP2</i>	TFAPA Hs01029413_m1
<i>ATOH7</i>	ATOH7-Hs00376955_s1
<i>BASP1</i>	BASP1-Hs00932356_s1
<i>BEST1</i>	BEST1-Hs00188249_m1
<i>BMP7</i>	BMP7-Hs00233476_m1
<i>BRN3A</i>	POU4F1-Hs00366711_m1
<i>BRN3B</i>	POU4F2-Hs00231820_m1
<i>CCND1</i>	CCND1-Hs00765553_m1
<i>CCND2</i>	CCND2 Hs00153380_m1
<i>CRX</i>	CRX-Hs00230899_m1
<i>FGF19</i>	FGF19 Hs00192780_m1
<i>FOXN4</i>	FOXN4-Hs01566111_m1
<i>GADD45A</i>	GADD45A-Hs00169255_m1
<i>GJA1</i>	GJA1- Hs00748445_s1
<i>IGFBP5</i>	<i>IGFBP5</i> Hs01052295_m1
<i>LHX2</i>	LHX2-Hs00180351_m1
<i>LIM1</i>	LHX1-Hs00232144_m1
<i>MAP1B</i>	MAP1B-Hs01067016_m1
<i>MERTK</i>	MERTK-Hs01031973_m1
<i>MITF</i>	MITF-Hs01117294_m1
<i>NRL</i>	NRL-Hs00172997_m1
<i>PAX6</i>	PAX6-Hs00240871_m1
<i>PDEF</i>	SERPINF1-Hs01106934_m1
<i>RAX</i>	RAX-Hs00429459_m1
<i>SIX3</i>	SIX3-Hs00193667_m1
<i>SIX6</i>	SIX6 Hs00201310_m1
<i>SOX2</i>	SOX2-Hs01053049_s1
<i>SSP1</i>	SSP1- Hs00959010

Supplemental Table 2: List of antibodies used for immunohistochemistry analysis.

Antigen	Species	Dilution	Source
<i>Primary antibodies</i>			
AP2	Mouse monoclonal	1/100	DSHB (3B5)
BRN3A	Mouse monoclonal	1/250	Millipore (MAB1585)
Ki67	Rabbit polyclonal	1/200	Millipore (AB15580)
LHX2	Goat polyclonal	1/100	Santa Cruz (SC19344)
LIM1 (LHX1)	Mouse monoclonal	1/20	DSHB(4F2-s)
MITF	Mouse monoclonal (clone C5/D5)	1/400	Sigma Aldrich (284M-94)
NRL	Goat polyclonal	1/400	BioTechne (AF2945)
PAX6	Rabbit polyclonal	1/2000	Millipore (AB2237)
PAX6	Mouse monoclonal	1/1000	DSHB (AB_528427)
RAX/RX	Rabbit polyclonal	1/50	Abcam (AB23340)
VSX2	Mouse monoclonal	1/200	Santa Cruz (SC365519)
VSX2/CHX10	Goat	1/2000	Santa Cruz (SC1960)
ZO-1	Rabbit polyclonal	1/250	Life technologies ; Invitrogen (61-73000)
<i>Secondary antibodies</i>			
Alexa fluor 488 anti-goat	Donkey	1/300	Jackson ImmunoResearch 715-545-147
Alexa fluor 488 anti-mouse	Donkey	1/300	Jackson ImmunoResearch 715-545-150
Alexa fluor 488 anti-rabbit	Donkey	1/300	Jackson ImmunoResearch 711-545-152
Alexa fluor 647 anti-mouse	Donkey	1/300	Jackson ImmunoResearch 715-605-150
Alexa fluor 647 anti-rabbit	Donkey	1/300	Jackson ImmunoResearch 711-605-152

Supplemental Table 3: Master file of RNAseq analysis of W4ROs, W6ROs, hiRPCp0 and hiRPCp2-4.

Supplemental Table 4: Filtered RNAseq analysis.

Supplemental Table 5: Restored gene lists.

Résultats supplémentaires

1. Différenciation de cellules progénitrices rétiniennes en photorécepteurs à bâtonnets

Dans les RPs, la population initialement touchée est celle des photorécepteurs à bâtonnets. A la perte des photorécepteurs à bâtonnets s'ensuit une dégénérescence secondaire des photorécepteurs à cônes, notamment expliquée par l'absence d'un facteur trophique RdCVF, secrété normalement par les photorécepteurs à bâtonnets, et qui est essentiel pour la survie et l'intégrité des photorécepteurs à cônes (Léveillard *et al.*, 2004). A des fins thérapeutiques, des cultures enrichies en photorécepteurs à bâtonnets issus de RPCs elles-mêmes dérivées de cellules iPS de patients atteints de RP pourraient être utilisées pour la découverte de nouvelles molécules à potentiel neuroprotecteur par des approches de criblage à haut débit. Nous avons démontré que les RPCs obtenues à partir d'organoides rétiniens, après isolation, amplification et décongélation se différencient en tous les types cellulaires de la rétine neurale incluant les photorécepteurs à bâtonnets. Cependant, du fait que les tests de criblages à haut débit nécessitent un grand nombre de cellules identiques, nous nous sommes tournés vers l'obtention de cultures enrichies en photorécepteurs à bâtonnets. Au cours de la rétino-génèse, les RPCs, sont sous l'influence de facteurs extrinsèques et intrinsèques définis par l'expression entre autres de facteurs de transcription spécifiques. La différenciation des RPCs en photorécepteurs à bâtonnets est gouvernée par un ensemble de gènes (Figure 29) dont les plus précoces sont ceux intervenant dans l'orientation des RPCs dans la voie des photorécepteurs: *OTX2* et *CRX* (Swaroop *et al.*, 2010). *OTX2* oriente les RPCs vers un destin de précurseurs de photorécepteurs et active l'expression de *CRX*. La combinaison de l'expression de ces deux facteurs est nécessaire et suffisante pour induire un destin de photorécepteurs (Henning *et al.*, 2008, Nishida *et al.*, 2003). Le facteur de transcription NRL (Neural Retina Leucine zipper) est un acteur clé dans le choix d'une RPC à devenir un photorécepteur à bâtonnet ou à cône. Il interagit avec *CRX*, conduisant alors à la formation des photorécepteurs à bâtonnets (Akimoto *et al.*, 2006, Mears *et al.*, 2001) par l'activation de gènes dont le principal étant le gène codant pour le récepteur nucléaire NR2E3 (orphan nuclear receptor) (Mears *et al.*, 2001) exprimé dans les précurseurs des photorécepteurs à bâtonnets (Oh *et al.*, 2008). Le complexe NRL-NR2E3 réprime l'expression des gènes spécifiques des photorécepteurs à cônes et active ceux spécifiques aux photorécepteurs à bâtonnets dont celui de la *RHODOPSINE* (Chen *et al.*, 2005, Cheng *et al.*, 2006, Peng *et al.* 2005). Le récepteur nucléaire orphelin ROR β (retinoïd-related orphan nuclear receptor β), joue également un rôle dans la spécification des bâtonnets en aval de *CRX* et *OTX2* ainsi qu'en amont de *NRL* et de *NR2E3* (Jia *et al.*, 2009).

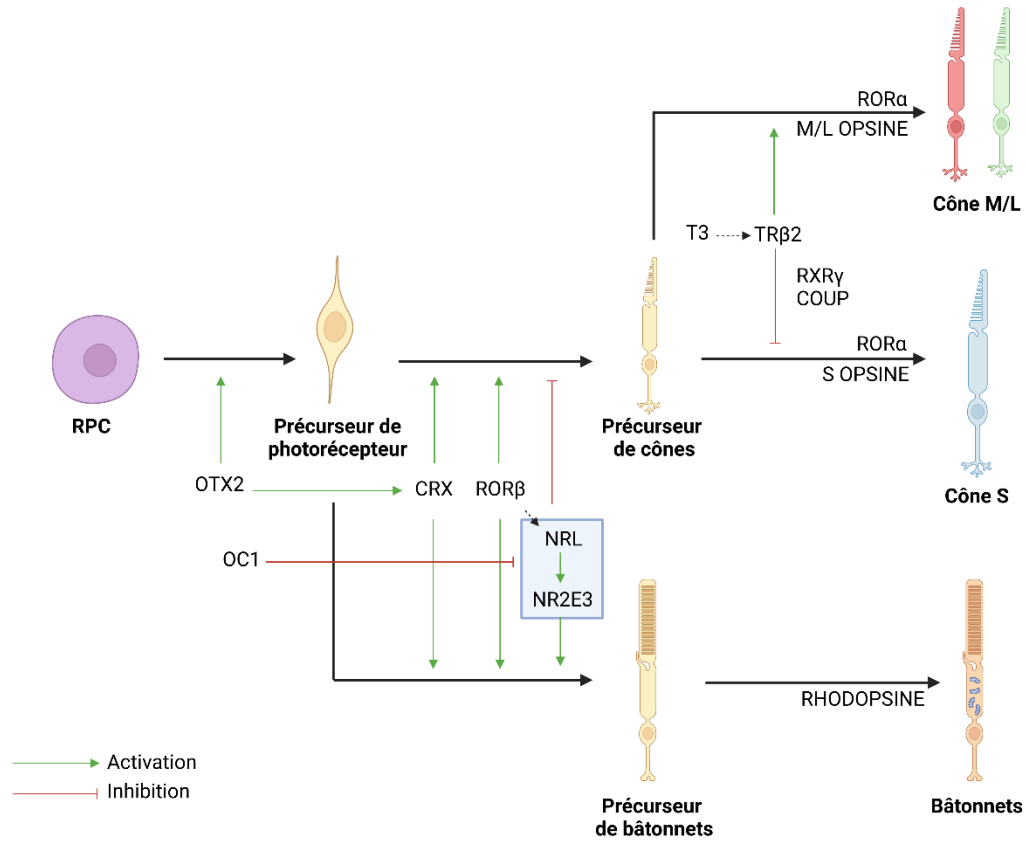


Figure 29: Facteurs impliqués dans la spécification des photorécepteurs à cônes et à bâtonnets.
Adapté Swaroop *et al.*, 2010.

Concernant les facteurs extrinsèques influençant le devenir des RPCs (cf. partie II de l'introduction), nous avons testé des conditions de culture comprenant divers facteurs décrits comme pouvant influencer favorablement la différenciation des RPCs en précurseurs de photorécepteurs et en photorécepteurs à bâtonnets (Tableau 8) tels que l'activine, l'acide rétinoïque, la taurine, et le FGF2. L'acide rétinoïque a été décrit comme un facteurs clé in vitro et in vivo dans la différenciation des photorécepteurs à bâtonnets et ce dans divers modèles animaux (Kelley et al., 1999, Kelley et al., 1994, Hyatt et al., 1996, Prabhudesai et al., 2005). Celui-ci régulerait notamment l'expression du gène *NRL* (Khanna et al., 2006). La taurine a été décrite comme critique pour la survie des photorécepteurs à bâtonnets (Lombardini JB, 1991) et stimulerait l'expression du gène de la *rhodopsine* (Altshuler et al., 1993). Concernant l'activine, des effets opposés ont été reportés selon le modèle étudié. Chez le rat, l'activine augmenterait le nombre de photorécepteurs à bâtonnets (Davis 1997 et 1999), tandis que chez le poulet elle inhiberait l'expression de la rhodopsine (Belecky-Adams et al., 1999, Bradford et al., 2005). Sur des lignées cellulaires de rétinoblastome humain (Y79), a été démontré que l'activine induisait l'expression de *NRL* (Kanno et al., 2009). Enfin, le FGF2 a été décrit comme inducteur de la différenciation des photorécepteurs à bâtonnets (Hicks and Courtois, 1992).

	Milieu de culture	Composition
AMPLIFICATION	RPCM	Essential 6™, 3 µM CHIR99021 + 1 µM Purmorphamine + 10 ng/mL FGF2 + 10 ng/mL EGF + 100 µM ATP
DIFFÉRENCIATION des RPCs vers la voie des photorécepteurs à bâtonnets	ProNM (= condition contrôle)	DMEM F-12, 1% de MEM non-essentielle d'acides aminés, 1% supplément B27, 10 unités/ml de pénicilline et de 10 µg/ml de streptomycine
	Condition ProNM+D	Milieu ProNM + 1 µM DAPT
	Condition ProNM+A	Milieu ProNM + 1 µM DAPT + Activine
	Condition ProNM +RATF	Milieu ProNM + 100 nM Taurine + 1 µM DAPT + 500 nM Acide rétinoïque + 10 ng/mL FGF2

Tableau 8: Composition des différents milieux de culture utilisés pour l'amplification et la différenciation des RPCs.

Toutes les expériences ont été réalisées à partir de RPCs cryopréservées au passage 1 (RPCp1) dérivées de la lignée de cellules iPS reportrice où le transgène fluorescent mCherry a été couplé avec un motif histone (permettant son adressage au noyau) sous le contrôle du promoteur murin du gène *Crx* spécifique du lignage des photorécepteurs (AAVS1::CrxP-H2BmCherry) afin de suivre la différenciation des RPCs en photorécepteurs (Gagliardi *et al.*, 2018).

Après décongélation, les RPCs au passage 2 ont été amplifiées en milieu RPCM pendant 7 jours. Les cellules ont été ensuite passées et remises en culture dans le milieu RPCM durant 7 jours à nouveau. A l'issue de cela, les différentes conditions de culture distinctes ont été testées afin de différencier ces RPCs en photorécepteurs à bâtonnets (Figure 30). Le milieu proneural (ProNM) a été utilisé comme condition contrôle. Ce milieu, contrairement au milieu RPCM, ne contient pas les molécules permettant de maintenir les cellules dans un état multipotent et conduit à une différenciation spontanée des RPCs. Dans les conditions ProNM+D, ProNM + A et ProNM +RATF, les cellules étaient traitées durant 5 jours (J2 à J7 de différenciation) avec un inhibiteur de la voie Notch, le DAPT. Dans les conditions ProNM + A et ProNM +RATF, des facteurs (respectivement Activine et Acide rétinoïque + Taurine + FGF2) ont été ajoutés au milieu de culture. Après deux semaines d'amplification dans le milieu RPCM, ces 4 conditions de culture ont été appliquées durant 3 semaines de culture permettant la différenciation des RPCs. Au terme de chaque semaine, des analyses automatisées à haut contenu (HCS) des cellules mCherry-positives (représentant la population des photorécepteurs exprimant CRX), des expériences d'immunofluorescence pour identifier le marquage endogène mcherry et l'analyse de l'expression de gènes spécifiques des photorécepteurs par qRT-PCR ont été effectuées afin d'évaluer d'une part le nombre de photorécepteurs et d'autre part la différenciation des RPCs pour chaque condition.

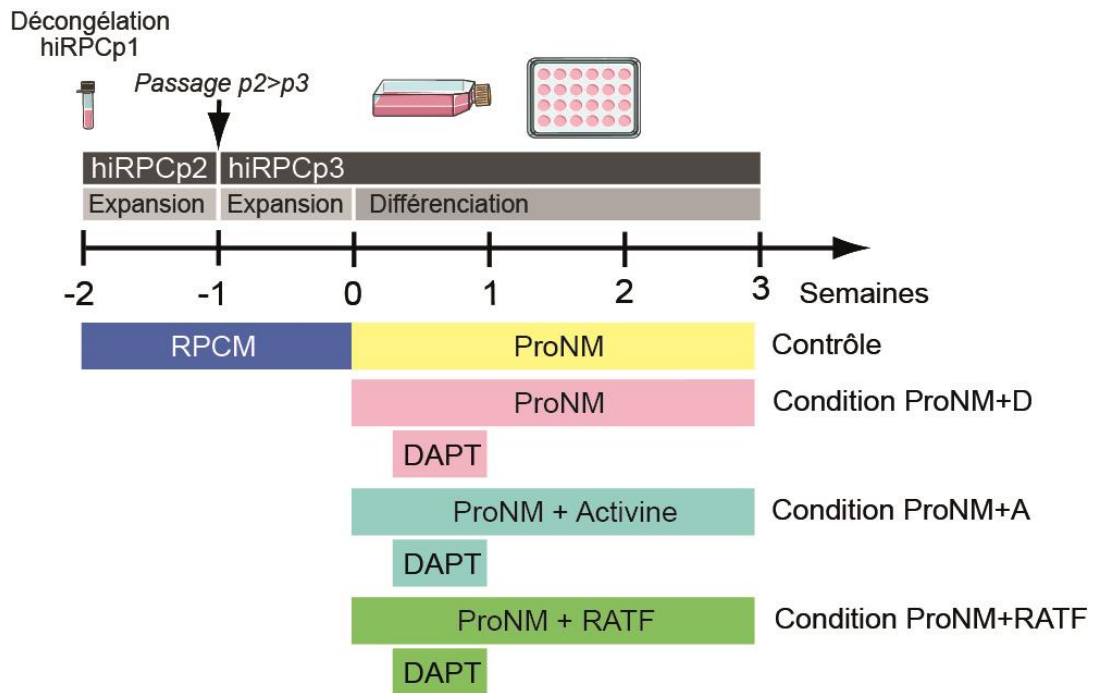


Figure 30: Illustration schématique des protocoles de culture pour différencier les RPCs.

La morphologie des cellules était suivie au terme de chaque semaine avant la dissociation (Figure 31). Des prolongements cellulaires similaires à des extensions neuritiques sont remarquables pour chacune des conditions dès la première semaine de différenciation.

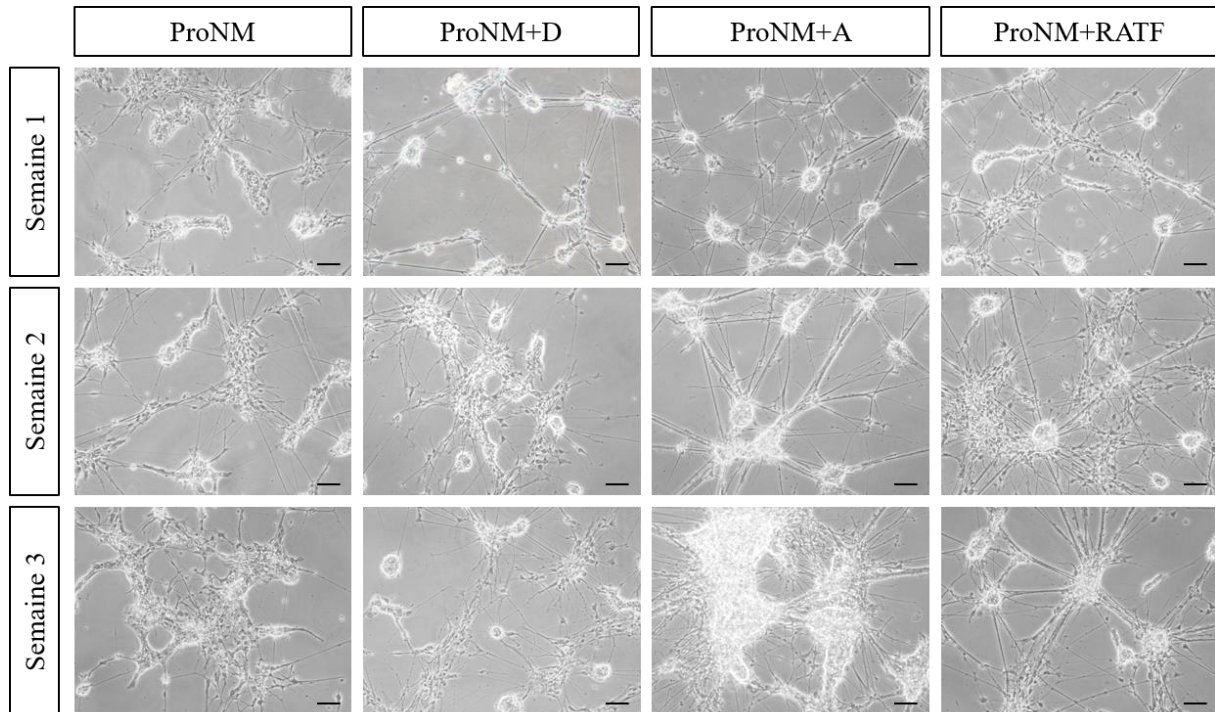


Figure 31 : Morphologie des cellules différenciées à partir de RPCs dans les différentes conditions de culture. Imagerie par microscopie en fond clair après 1, 2 ou 3 semaines de culture. Echelle = 50 µm.

Au terme de chaque semaine et pour chaque condition, les cellules ont été dissociées par digestion enzymatique (papaine) et réensemencées sur des lamelles de verres afin de procéder à des expériences d'immunofluorescence pour identifier les cellules mCherry (Figure 32-A). Il a été possible par la suite, par une analyse automatisée à haut contenu (HCS), de quantifier ces cellules mCherry-positives. Dans la condition contrôle, le pourcentage de cellules mCherry/CRX-positives ne cesse d'augmenter au cours des semaines de différenciation passant de 21,86 % \pm 1,21 (semaine 1) à 52,02 % \pm 17,22 (semaine 3) (Figure 32-B). Le nombre de cellules mCherry-positives est maximal à la deuxième semaine avec pour la condition ProNM + D, 87,18 % \pm 3,14; la condition ProNM + A, 75,01 % \pm 2,47 et la condition ProNM +RATF, 79,86 % \pm 1,43 (Figure 32-B). En appliquant la condition ProNM + D sur 2 semaines, le nombre de cellules exprimant CRX (mCherry-positives) a pu être multiplié par 4 comparativement à la première semaine de différenciation dans la condition contrôle.

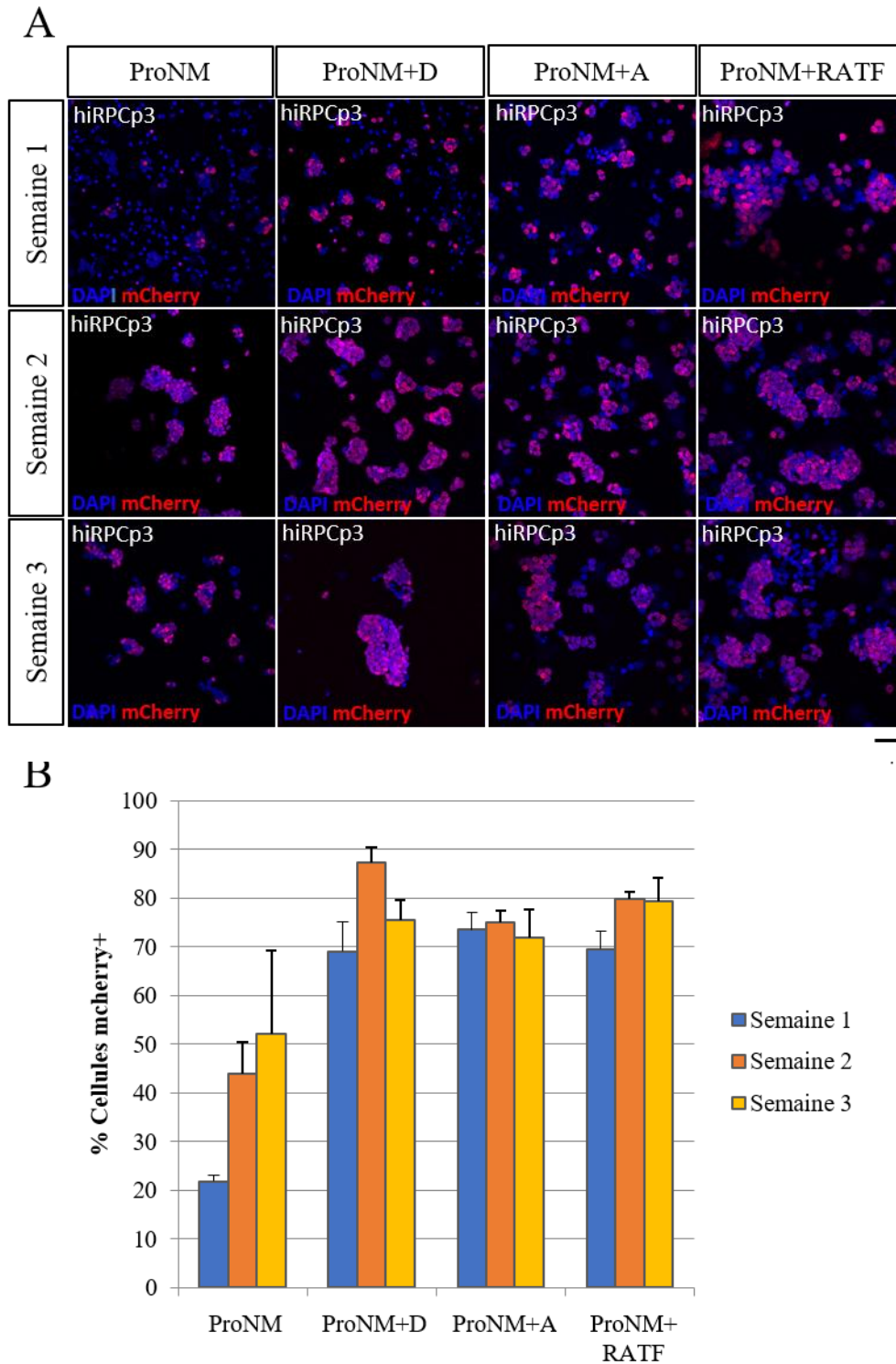


Figure 32: Analyse de la différenciation des RPCs en photorécepteurs (cellules mCherry-positives) à l'issue de chaque dissociation. A) Immunofluorescence pour le marqueur endogène mCherry dans les cellules différenciées à partir de RPCs dans les différentes conditions de culture après 1, 2 et 3 semaines. B) Quantification des cellules mCherry-positives par l'analyse automatisée à haut contenu (HCS). Echelle = 50 μ m.

Nous avons étudié par RT-qPCR l'expression des marqueurs *CRX*, *NRL* (spécifique des précurseurs de photorécepteurs à bâtonnets) et *ARR3* qui code pour l'arrestine des photorécepteurs à cônes (Figure 33 A-C). Nous pouvons observer une augmentation de l'expression des trois marqueurs au cours des trois semaines pour les 4 conditions. Néanmoins, la condition qui a permis la plus forte expression de ces gènes a été la condition ProNM +RATF: en 3 semaines, le marqueur *CRX* augmente de 20 fois (Figure 33-A), le marqueur *ARR3* de 29 fois (Figure 33-B) et enfin le marqueur *NRL* de 73 fois (Figure 33-C).

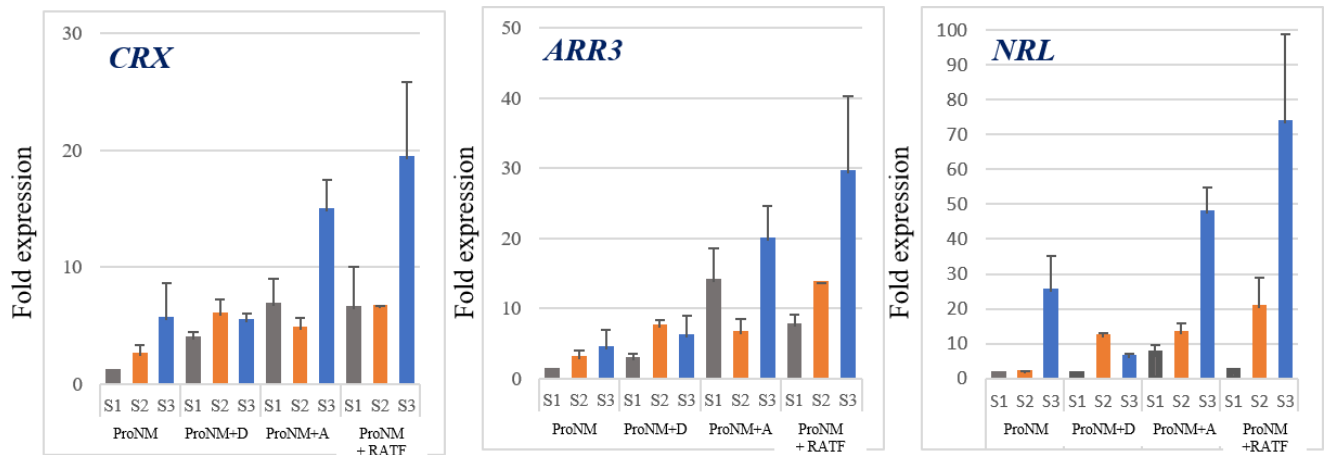


Figure 33 : Analyse par RT-qPCR de l'expression relative des facteurs de transcription spécifique du lignage des photorécepteurs dans les RPCs différenciées . A) *CRX* B) *ARR3* et C) *NRL* au cours de la semaine 1 (S1), semaine 2 (S2) et semaine 3 (S3) pour chaque condition de différenciation. Les résultats sont normalisés par rapport à la condition contrôle de la 1ère semaine.

Par les expériences d'immunofluorescence nous pouvons noter l'absence de cellules exprimant le marqueur des photorécepteurs à cônes (*ARR3*) dans toute condition et temps de différenciation confondus (Figure 34). Cependant, quelques cellules ont exprimé le marqueur précoce des photorécepteurs à bâtonnets (*NRL*) notamment au cours de la semaine 3 de différenciation dans les 4 conditions (Figure 34) confirmant l'engagement des précurseurs de photorécepteurs dans la voie des photorécepteurs à bâtonnets.

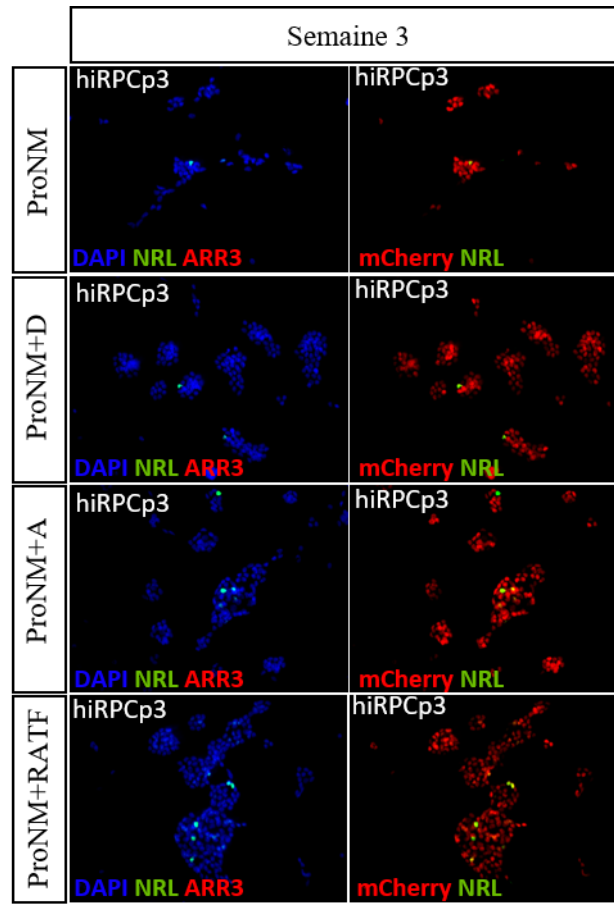


Figure 34: Analyse de la différenciation des RPCs en photorécepteurs par immunofluorescence. Identification des cellules mCherry-positives (correspondant aux photorécepteurs exprimant *CRX*) et exprimant les marqueurs *ARR3*, *NRL* après 3 semaines de différenciation dans les différentes conditions de culture. Echelle = 50 μ m.

2. Cryopréservation de précurseurs de photorécepteurs

Le développement de méthodes de cryopréservation adaptées aux précurseurs de photorécepteurs à plusieurs utilités. Leur cryopréservation permettrait dans un premier temps une facilitation de possibles de tests de criblages à haut débit. Dans un second temps, à des fins potentielles d'applications cliniques dans le cadre de transplantations cellulaires, elle permettrait de rendre indépendantes les étapes de production du produit de thérapie cellulaire et de transplantation. Les expériences ont été réalisées à partir de RPCs cryopréservées au passage 1 (RPCp1) dérivées de la lignée hiPSC-5F (Figure 35). Après décongélation, les RPCs au passage 2 ont été amplifiées en milieu RPCM pendant 7 jours. A l'issue de cela, a été appliquée la condition de culture nous ayant donnée le pourcentage maximal de cellules mCherry-positive (voir Partie résultats différenciation) c'est-à-dire: milieu proneural (ProNM) et DAPT durant 5 jours (J2 à J7 de différenciation). Au bout de 2 semaines de différenciation, les cellules ont été dissociées selon 4 techniques différentes afin d'évaluer celle qui permettrait la meilleure cryopréservation.

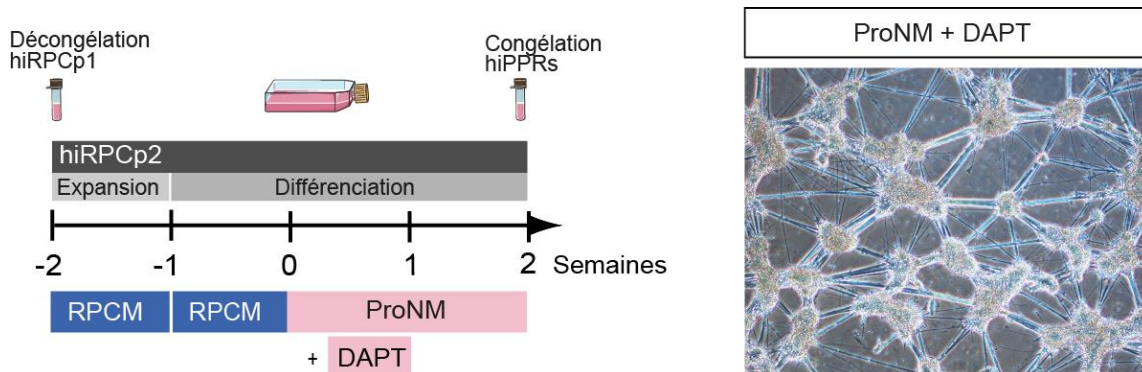


Figure 35: Obtention de cultures enrichies en précurseurs de photorécepteurs. A) Protocole de différenciation des RPCs en photorécepteurs. B) Morphologie des RPCs après 2 semaines de différenciation par microscopie en fond clair. Échelle = 50 µm.

Au bout de 2 semaines de différenciation, les cellules ont été dissociées de quatre manière différentes: i) par dissociation mécanique à l'aide d'un grattoir; ii) par dissociation non-enzymatique avec le Gentle Cell Dissociation Reagent (produit utilisé pour le passage des cellules iPS); iii) par dissociation enzymatique avec la trypsine (TrypLE express, Gibco): une enzyme recombinante sans composants d'origine animale utilisée pour dissocier un large éventail de cellules de mammifère adhérentes et iv) par dissociation enzymatique "plus douce" à l'aide de la papaïne (Huettnner *et al.*, 1986). A l'issue de chaque dissociation, le taux de survie cellulaire a été évalué à l'aide d'un compteur automatique (Countess® Automated Cell Counter). Le meilleur taux de survie était de 86% par dissociation à l'aide

de la papaïne suivie par la dissociation à l'aide du Gentle avec 30% de survie et enfin par la dissociation mécanique et celle réalisée à l'aide de la Tryple Express avec 23% de taux de survie. Une partie des cellules dissociées ont été cryoconservées dans le milieu de cryoconservation CryoStor®CS10 Freeze Medium utilisé pour la cryopréservation des cellules iPS au sein de l'équipe. Une autre partie des cellules ont été réensemencées sur des lamelles de verres afin de procéder à des expériences d'immunofluorescence pour les marqueurs CRX et Caspase-3 (cleaved CASP-3) (Figure 36-B) afin d'évaluer la mort cellulaire. Nous avons pu observer que la dissociation avec la papaïne présentait seulement quelques cellules positives pour le marqueur Caspase-3 cleaved comparativement aux trois autres méthodes (Figure 36-B) illustrant ainsi l'écart des taux de survie trouvés entre les quatre techniques.

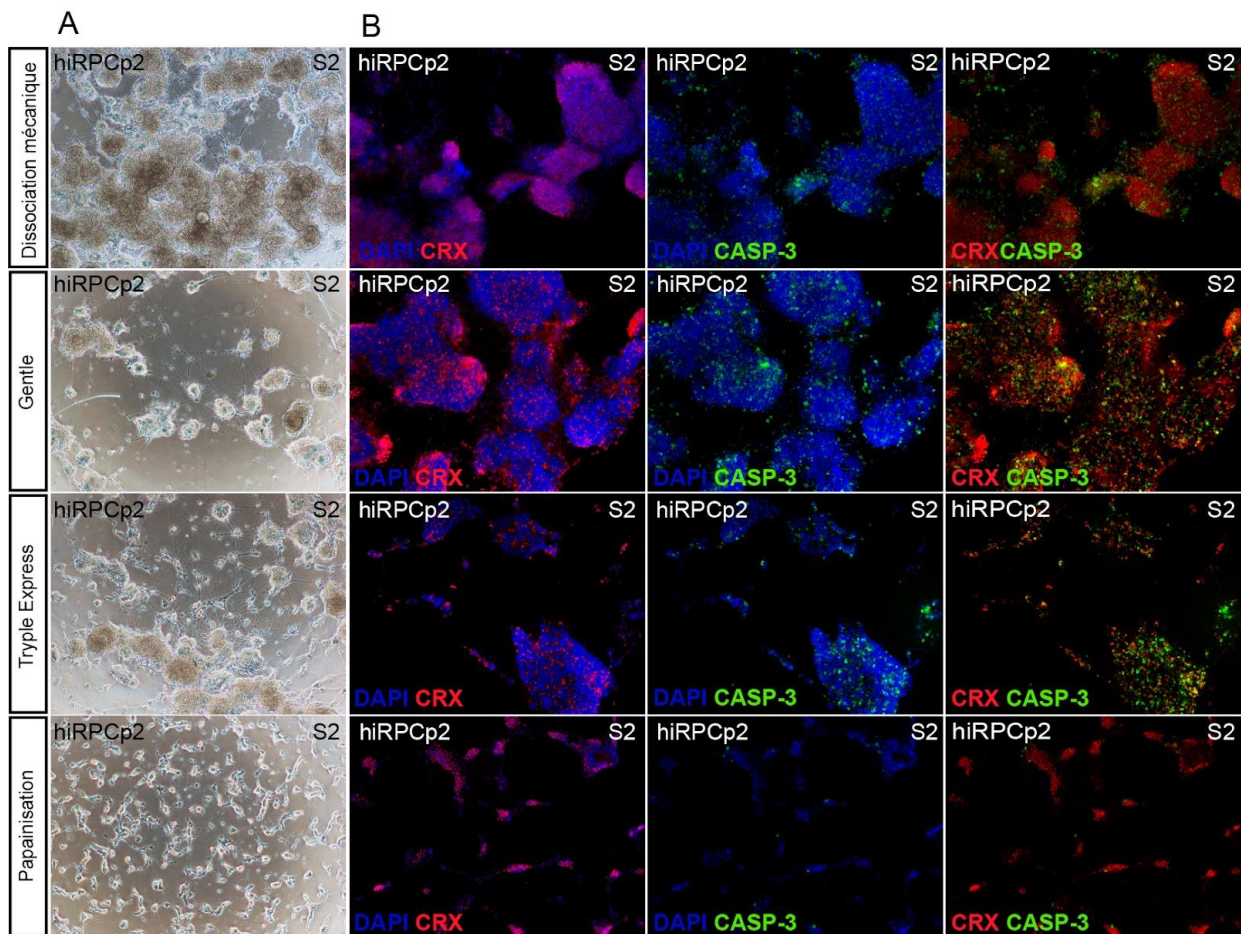


Figure 36: Caractérisation des RPCs différenciées après chaque technique de dissociation.

A) par microscopie en fond clair et B) par immunofluorescence pour les marqueurs CRX et Caspase 3-cleaved. Échelle = 50 µm.

Les cellules cryopréservées à l'issue de chaque technique de dissociation ont été décongelées et le taux de survie cellulaire a été évalué de la même manière qu'après dissociation. Le meilleur taux de survie était de 50% par dissociation à l'aide de la papaïne suivie par la dissociation par Tryple Express avec 24% de taux de survie puis 7% par le Gentle et 3% par la dissociation mécanique. Les cellules ont été ensuite réensemencées sur des lamelles de verres afin de procéder à des expériences d'immunofluorescence pour les marqueurs CRX et Caspase-3 comme précédemment 24 heures après réensemencement du fait que l'apoptose induite par la cryopréservation se produit 12h à 24h après la décongélation (Baust *et al.*, 2001). Après décongélation, la dissociation avec la papaïne présente très peu de cellules marquées positives pour le marqueur apoptotique caspase-3 contrairement aux autres conditions de dissociation (Figure 37).

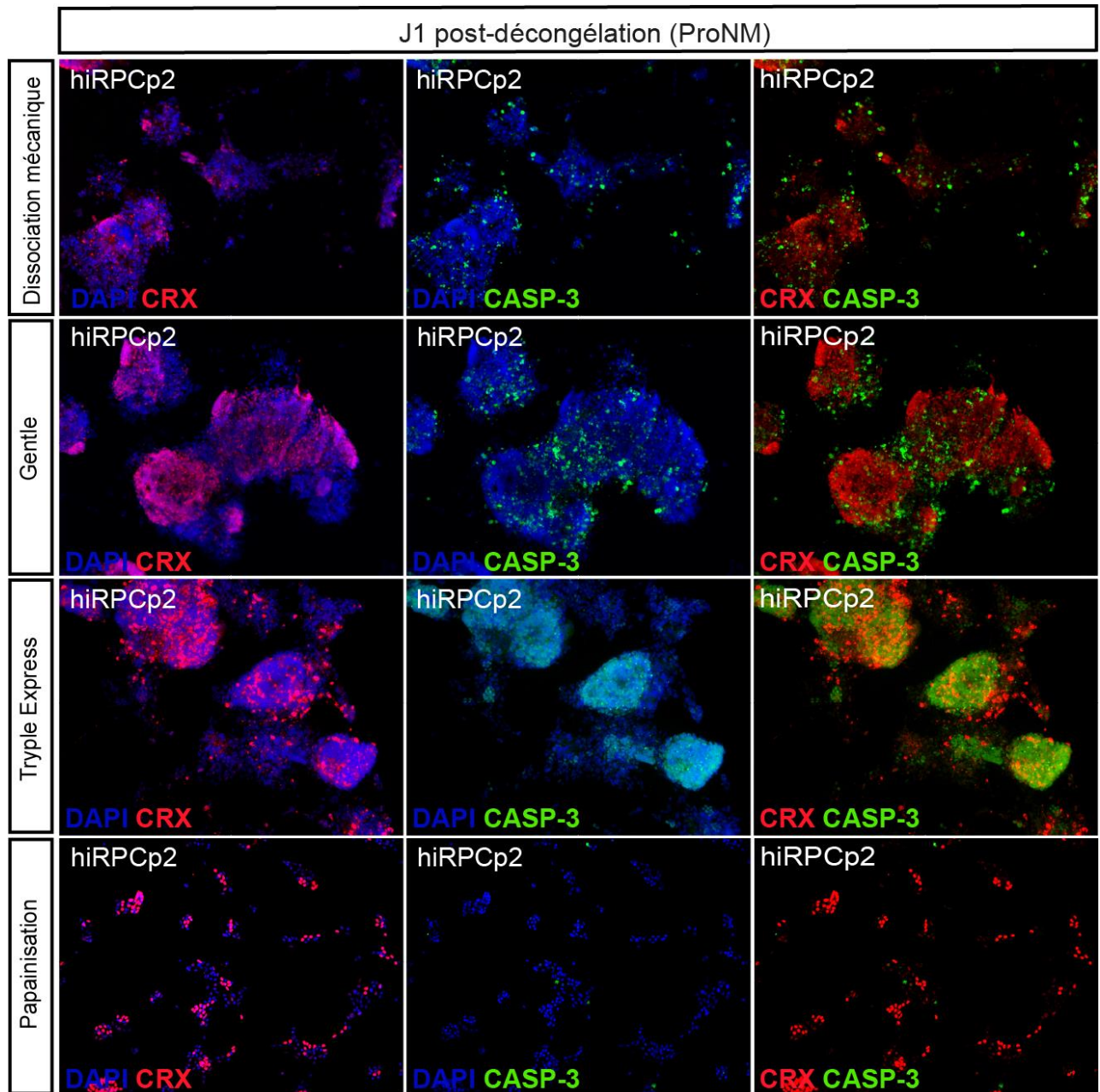


Figure 37: Caractérisation des RPCs différenciées après décongélation à l'issue de différentes techniques de dissociation par immunofluorescence pour les marqueurs CRX et Caspase 3-cleaved. Echelle = 50 μ m.

Une autre expérience concernant la cryopréservation de cultures enrichies en précurseurs de photorécepteurs a été réalisée sur des RPCs issues de la lignée de cellules iPS reportrice pour le lignage des photorécepteurs (AAVS1::CrxP-H2BmCherry) afin de pouvoir procéder à une analyse de cytométrie en flux. Après décongélation, les RPCs au passage 2 ont été amplifiées en milieu RPCM pendant 7 jours. A l'issue de cela, a été appliquée la condition de culture nous ayant donnée le pourcentage maximal de cellules mCherry-positives (voir Partie résultats différenciation), à savoir le milieu proneural (ProNM) avec du DAPT durant 5 jours (J2 à J7 de différenciation). Au bout de 2 semaines de différenciation, les cellules ont été dissociées avec la papaïne, qui a été selon nos résultats précédents, la meilleure condition de dissociation pour la cryopréservation de ces cultures. Une partie des cellules dissociées ont été réensemencées sur des lamelles de verres afin de quantifier les cellules mCherry-positives par une analyse automatisée à haut contenu (HCS) et une autre partie cryopréservées.

Après décongélation le nombre de cellules mCherry-positives par analyse à haut contenu et cytométrie de flux. Avant cryopréservation, le nombre de cellules mCherry-positives évaluées par analyse à haut contenu s'élevait à $80,76 \% \pm 14,84$ contre $86,98 \% \pm 3,24$ après décongélation (Figure 38-A). Il est à noter que la quantification ne permettait pas de distinguer les cellules mCherry-positives vivantes des cellules mCherry-positives mortes distinguables au marquage DAPI par des noyaux pycnotiques plus petits. Afin d'obtenir le nombre de cellules mCherry-positives vivantes à la suite de la décongélation, les cellules décongelées ont été analysées par cytométrie de flux: au moins 10 000 événements ont été analysés en utilisant le cytomètre analyseur Celesta Sorp (BD Biosciences). Le nombre de cellules positives au sein de la population sélectionnée a été analysé à l'aide du logiciel FACSDiva™ 9.0 (BD. Biosciences). Les RPCs non différenciées (une semaine d'amplification dans du milieu RPCM après décongélation) ont été utilisées comme témoins. Après décongélation, l'analyse par FACS a montré 44,5% de survie (Figure 38-B).

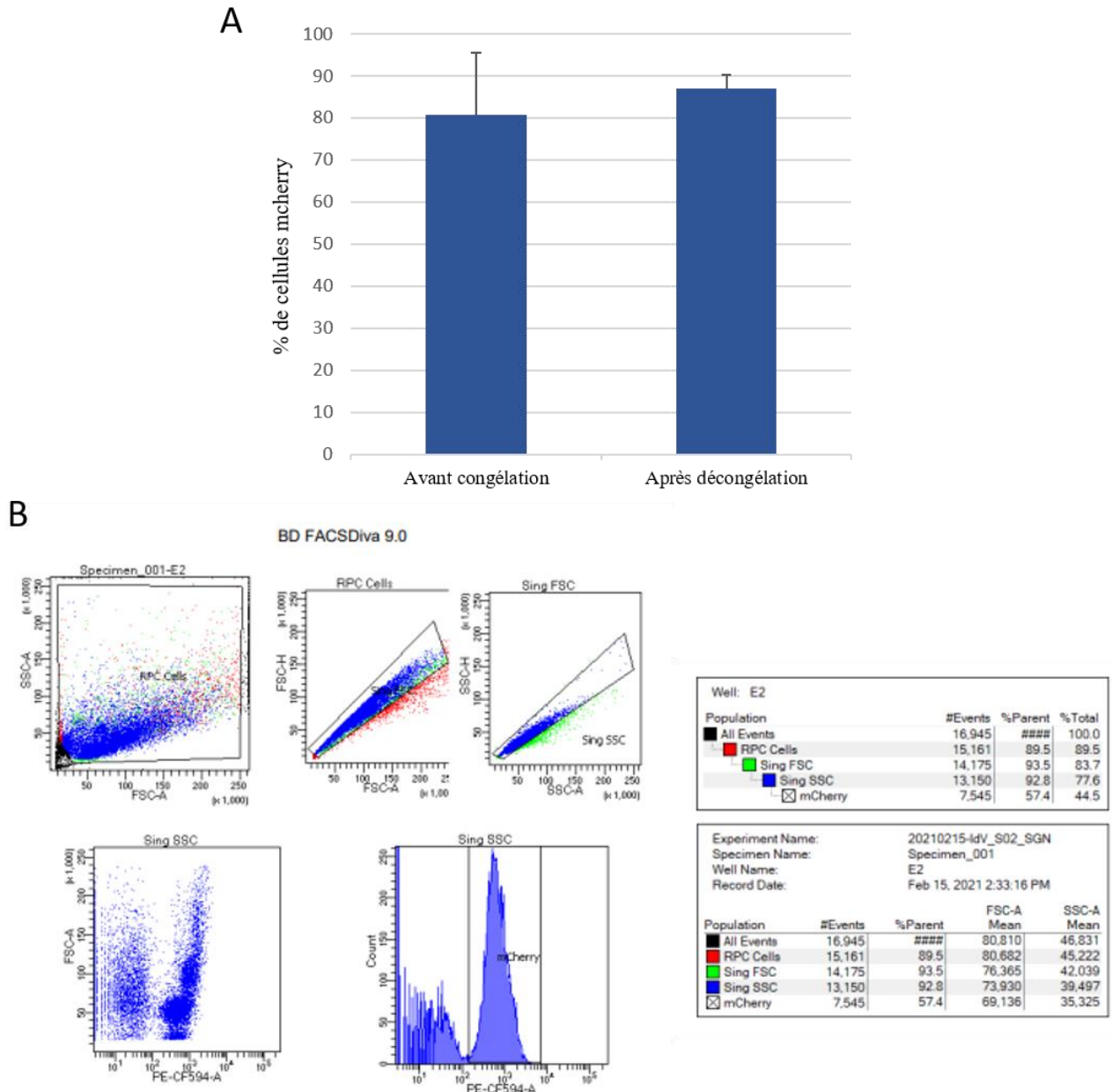


Figure 38 : Effet de la cryopréservation sur des cultures enrichies en précurseurs de photorécepteurs. A) Quantification des cellules mCherry-positives par l'analyse automatisée à haut contenu (HCS) avant cryopréservation (à gauche du graphique) et après décongélation (à droite du graphique) B) Analyse de la cryopréservation de précurseurs de photorécepteurs par cytométrie de flux après décongélation.

Discussion

« Le but de l'argumentation ou de la discussion, ne devrait pas être la victoire, mais le progrès. »

Joseph Joubert

Génération, amplification et cryopréservation de progéniteurs rétiniens à partir de cellules iPS humaines

A nos jours, peu importe la source d'origine, aucune méthode n'a permis d'obtenir une population enrichie en cellules progénitrices rétiniennes précoces tout en maintenant leur potentiel multipotent (Mansergh *et al.*, 2010, Czekaj *et al.*, 2012, Ringuette *et al.*, 2014, Cicero *et al.*, 2009, Gualdoni *et al.*, 2010). En effet, au cours de leur culture, les RPCs perdent leur potentiel neurogénique (Wright *et al.*, 2015) se limitant progressivement à un destin glial (Gamm *et al.*, 2008). Une amélioration de ces protocoles était une condition préalable à l'utilisation de ces cellules dans des applications thérapeutiques à des fins de remplacement cellulaire à grande échelle ou de découverte de nouvelles molécules actives par des tests de criblage à haut débit. Dans cette optique, nous avons mis au point un protocole permettant l'isolement, l'amplification et la cryopréservation de RPCs isolées à partir d'organoides rétiniens dérivés de cellules iPS humaines tout en conservant leur multipotence. La maintenance de la multipotence illustrée par leur capacité à se différencier en cellules rétiniennes après décongélation et passages successifs a été permise notamment par le recours à des conditions de culture spécifiques et notamment un milieu dédié à l'amplification des RPCs.

Au cours de la rétino-génèse, les RPCs doivent maintenir un équilibre approprié entre la prolifération et la différenciation afin de générer tous les types de cellules neuro-rétiniennes en nombre suffisant pour obtenir une rétine complète (Levine et Green., 2004). Il est établi que la détermination du destin cellulaire est contrôlée par une combinaison de facteurs extrinsèques et facteurs intrinsèques (Levine et Green., 2004, Marquardt *et al.*, 2002, Agathocleous *et al.*, 2009). De ce fait, nous avons émis l'hypothèse que la modulation de voies de signalisation spécifiques, telles que les voies de signalisation Wnt, Shh, EGF et FGF, pourraient être suffisantes pour agir sur les facteurs intrinsèques qui contrôlent la prolifération et la multipotence des RPCs. Ainsi, nous avons mis au point un milieu de culture pour les RPCs contenant cinq facteurs extrinsèques qui permettent de récapituler l'environnement du tissu au cours du développement: le CHIR99021, la purmorphamine, le FGF2, l'EGF et l'ATP. L'inhibiteur de GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3), le CHIR99021, mime l'activation de la voie Wnt par l'accumulation de β -caténine dans le cytoplasme et maintient le destin des cellules souches humaines et l'expression des marqueurs des progéniteurs rétiniens (Camp *et al.*, 2014, Meyers *et al.*, 2012). La purmorphamine, activateur de la voie Shh, soutient l'auto-renouvellement et la multiplication des RPCs (Amato *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2005, Wallace *et al.*, 2008) et reproduit l'activation de la voie Shh par les cellules ganglionnaires pendant la rétino-génèse. Le FGF2 est le facteur le plus utilisé pour maintenir la pluripotence des cellules ES et cellules iPS humaines en culture et pour lequel il a été démontré qu'il potentialise également l'action de la voie Shh et évite la différenciation des RPCs en cellules de l'EPR (Spence *et al.*, 2004). L'EGF, classiquement couplé au FGF2 dans la culture des cellules souches

neurales, favorise la prolifération des RPCs au détriment de leur différenciation (Ahmad *et al.*, 2004). Enfin l'ATP contrôle le cycle cellulaire et la prolifération des RPCs dans la rétine en développement (Pearson *et al.*, 2005, Sholl-Franco *et al.*, 2010, Almeida-Pereira *et al.*, 2017, Ornelas et Ventura, 2010), et mime la libération d'ATP par les cellules de l'EPR dans l'espace sous-rétinien (Pearson *et al.*, 2005). Nous démontrons au cours de cette étude que l'activation simultanée de ces voies spécifiques permet la sélection et l'amplification de RPCs à partir d'organoides rétiniens dérivés de cellules iPS humaines. L'analyse transcriptomique (RT-qPCR et RNAseq) a pu confirmer la forte similitude entre les RPCs présentes au sein des organoïdes rétiniens à J42 et les RPCs décongelées et amplifiées jusqu'au passage 4.

Les RPCs de la cupule optique en développement sont capables de donner naissance à tous les types cellulaires de la rétine neurale (Young 1985, Turner *et al.*, 1990, Turner et Cepko, 1987). Cependant, nous avons pu démontrer que les RPCs que nous avons produites, selon les conditions de culture adoptées, sont capables à la fois de se différencier en cellules de la rétine neurale mais également en cellules de l'EPR. La question que nous pouvons nous poser est: quelle est vraiment la nature de nos cellules produites? Pour répondre à cette question, il est nécessaire de se recentrer sur la rétino-génèse (Figure 39). Après l'évagination des vésicules optiques, les cellules qui les composent expriment MITF et PAX6 et donnent naissance à l'ensemble des types cellulaires de la rétine (Chow et Lang, 2001, Bharti *et al.*, 2008). L'une des étapes les plus importantes de la rétino-génèse chez les vertébrés est la décision de se différencier soit en cellules de l'EPR soit en cellules de la rétine neurale. Cette décision est prise un peu plus tardivement par l'expression différentielle du facteur de transcription VSX2 (Horsford *et al.*, 2005, Rowan *et al.*, 2004) dans la cupule optique. Les cellules de la couche interne de la cupule optique expriment VSX2 qui réprime alors MITF en réponse aux facteurs de la famille des FGFs sécrétés par l'ectoderme de surface. Celles-ci, que l'on connaît sous le nom de RPCs donneront par la suite tous les types cellulaires de la rétine neurale. Inversement, les cellules de la couche externe de la cupule optique restent MITF positives et VSX2 négatives et se différencient par la suite en cellules de l'EPR (Bora *et al.*, 1998, Nguyen *et al.*, 2000, Fuhmann *et al.*, 2000, Horsford *et al.*, 2005, Bharti *et al.*, 2006). Il est intéressant de noter également que pendant une période de temps encore indéterminée, la rétine neurale reste compétente pour se différencier en cellules de l'EPR et inversement (Sridhar *et al.*, 2013, Fujimura *et al.*, 2009, Westenskow *et al.*, 2009).

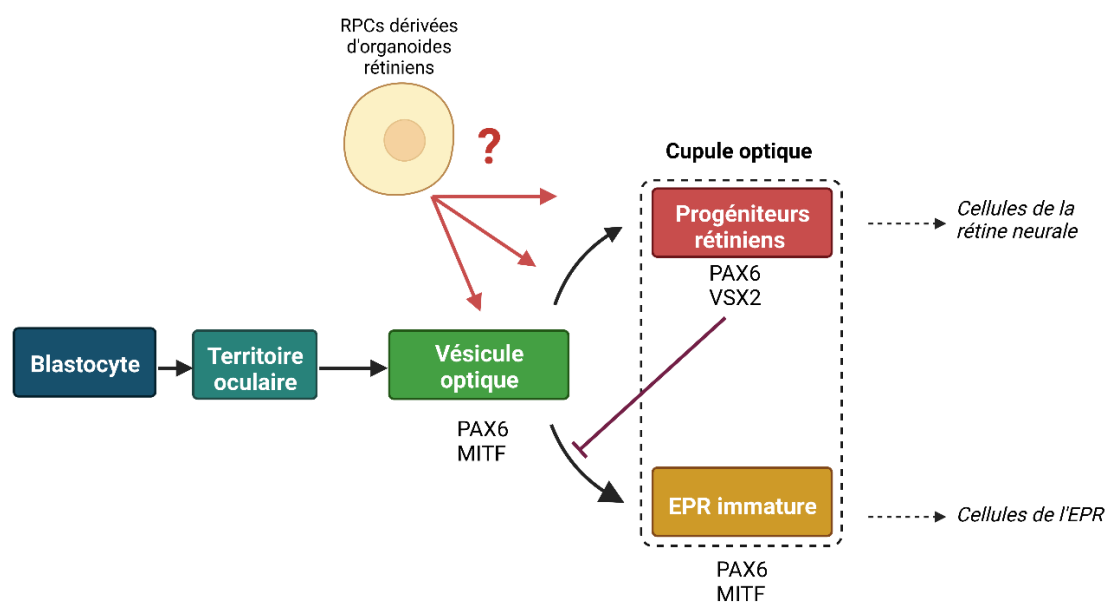


Figure 39: Engagement des cellules progénitrices vers un destin de cellules neuro-rétiniennes ou de l'EPR.

Au vu de ces éléments et du fait que nos RPCs puissent se différencier en cellules de l'EPR et cellules de la rétine neurale, l'hypothèse formulée est que les RPCs obtenues seraient non pas des cellules correspondant à au stade de la cupule optique mais plus en amont au stade de vésicule optique. Nous nous sommes intéressés à l'analyse transcriptomique de celles-ci. Nous avons pu observer que l'expression d'un ensemble de facteurs dit neurogéniques était inhibée après passages successifs et amplification des RPCs, retournait à leur niveau d'expression initiale (organoïdes à J28) comparativement à leur expression dans les organoïdes à J42, conférant alors aux RPCs un phénotype préneurogénique. Nos RPCs pourraient être alors à un stade intermédiaire entre les cellules correspondant aux cellules composant la vésicule optique et celles composant la cupule optique.

Nous pouvons envisager comme stratégie qui permettrait le rendement de la production de ces cellules progénitrices rétiniennes celle de leur culture en bioréacteurs. En effet, les bioréacteurs représentent une plateforme prometteuse pour la fabrication à grande échelle de RPCs. La culture en bioréacteurs de divers types cellulaires a déjà été entreprise notamment pour les cellules souches neurales et a démontré des taux d'amplification cellulaire beaucoup plus importants comparativement à des cultures dites statiques (Baghbaderani *et al.*, 2008, Baghbaderani *et al.*, 2011). Les procédés d'expansion des cellules progénitrices rétiniennes sont nécessaires à leur utilisation thérapeutique, et doivent tenir compte à la fois des paramètres biochimiques mais aussi de ceux physico-chimiques appliqués. De ce fait, le recours à des bioréacteurs pour la culture de cellules souches qu'elles soient à l'état pluripotent ou progéniteur nécessite plusieurs prérequis auxquels la culture de nos cellules progénitrices rétiniennes répond incluant des milieux de culture chimiquement définis, sans produits dérivés d'animaux et évidemment exempts de pathogènes. Concernant les paramètres physico-chimiques, perçus et intégrés par les cellules, ils peuvent conduire à une modification de la réponse cellulaire. La culture en bioréacteurs permettrait, à long terme, de pouvoir suivre en ligne et contrôler ces paramètres biochimiques et physico-chimiques.

L'obtention et la cryopréservation de RPCs humaines offrent de multiples possibilités quant à des futures applications incluant la transplantation cellulaire, la modélisation pathologique, l'étude et la compréhension des maladies mais également la découverte de médicaments par des tests de criblage à haut débit.

Applications potentielles des RPCs à des fins de transplantation cellulaire

Les propriétés spécifiques des progéniteurs réiniens incluant leurs capacités de prolifération et différenciation font de ces cellules un excellent candidat pour la médecine régénérative. En effet, des RPCs dérivées de tissu fœtal ont déjà fait l'objet d'études précliniques et cliniques dans le traitement de RPs. Cependant, diverses limites persistent incluant principalement les faibles quantités de cellules isolées de chaque donneur qui ne peuvent être amplifiées de manière assez suffisante pour caractériser et évaluer les profils de sécurité et d'efficacité des cellules dans une utilisation clinique mais aussi pour un traitement d'un nombre important d'individus (Ballios et al., 2015). Dans cette optique, la communauté scientifique s'est tournée vers diverses solutions: la mise au point de protocoles visant à améliorer l'amplification de ces progéniteurs, l'isolation de RPCs issues d'autres sources comme les cellules souches pluripotentes mais encore la possibilité d'immortaliser des lignées de RPCs humaines (Hasan et al., 2010). Hormis la perte de multipotence au cours de la culture de RPCs, une autre limite concernant les progéniteurs réiniens d'origine fœtale est notamment l'âge du donneur qui détermine la capacité de prolifération des RPCs en culture, les donneurs les plus jeunes étant préférables, en particulier les prématurés. Bien qu'il soit possible d'obtenir des dons plus précoces en cas de mort fœtale intra-utérine, ces cas sont susceptibles de donner de moins bons résultats du fait d'un intervalle post-mortem souvent long et une mauvaise conservation des tissus isolés. Nous proposons ici une nouvelle source de RPCs d'origine humaine qui peut surpasser les limites actuelles par d'une part, la possibilité qu'elles soient cryopréservables et d'autre part, par leur capacité de prolifération tout en maintenant leur potentiel multipotent qui aboutirait à l'obtention de quantités suffisantes de cellules pour leur utilisation en médecine régénérative.

Dans le cadre de transplantations, l'efficacité de celles-ci reposant sur notamment la différenciation, l'intégration et la survie des cellules greffées, est un critère essentiel. Des études s'appuyant sur les résultats de del Cerro, Turner et Blair ont suggéré que les microagrégats (c'est-à-dire les grappes de cellules) de RPCs humaines d'origine fœtale et les feuilletts réiniens offraient une meilleure survie que des cellules dissociées (Seiler et al., 2012) après transplantation, probablement en raison d'un meilleur soutien structurel et d'un maintien des contacts cellule-cellule. Aussi, le recours à l'ingénierie tissulaire consistant à la conception de systèmes de matrice à base de polymères biocompatibles appelés «scaffolds ou échafaudages» offre de nouvelles perspectives quant à la survie et différenciation du greffon après transplantation (Tucker et al., 2010, Tao et al., 2007, Belgio et al., 2021). Nous pouvons citer comme exemple les travaux de Neeley et al., qui ont transplanté chez des souris des RPCs fœtales de souris combinées à un scaffold fin et poreux en polyglycérol-sebacate. Il a été observé un survie à long terme des RPCs après transplantation et l'expression de marqueurs matures de photorécepteurs dont celui de la Rhodopsine (Neeley et al., 2008, Redenti et al., 2009). Cependant, des complications importantes ont été reportées incluant une inflammation, une fibrose, un rejet du greffon et certains cas

ont conduit à un décollement de la rétine en raison de l'épaisseur du scaffold (Lavik *et al.*, 2005 ; Tomita *et al.*, 2005 ; Warfvinge *et al.*, 2005).

Enfin, le critère limitant de la transplantation à des fins d'applications chez l'homme est celui de la sécurité. Bien que des études cliniques portant sur la transplantation RPCs ont été entreprises et sont encore en cours, certaines ont été récemment stoppées du fait de complications liées notamment à la procédure chirurgicale et une efficacité jugée comme très limitée. Il est légitime de se demander également si la transplantation de cellules mitotiques ne fait pas défaut en termes de sécurité: des cellules qui se multiplient, pouvant aboutir à une prolifération cellulaire non contrôlée et donc à la formation de tumeurs.

Aussi, nous pouvons proposer non pas l'utilisation des RPCs à des fins de transplantation cellulaire, mais celles des précurseurs de photorécepteurs post-mitotiques dérivés des RPCs. En effet, la population des précurseurs des photorécepteurs s'est avérée la plus prometteuse pour la transplantation cellulaire de par leur capacité à s'intégrer, se différencier en photorécepteurs et établir des connexions synaptiques, améliorant ainsi la fonction visuelle (MacLaren *et al.*, 2006). Depuis, avec des succès certains dans le cas de transplantation de précurseurs de photorécepteurs et ce, même dans des cas de dégénérescence avancée (Singh *et al.*, 2013), les précurseurs de photorécepteurs sont devenus le meilleur candidat pour la transplantation cellulaire dans les dystrophies rétiennes affectant les photorécepteurs (Bartsch *et al.*, 2008, Pearson *et al.*, 2012, Lakowski *et al.*, 2011, Eberle *et al.*, 2011). Malgré des améliorations constantes dans les protocoles de différenciation des CSPh en cellules rétiennes, la mise au point de cultures enrichies en précurseurs de photorécepteurs nécessite dans la majorité des cas à nos jours un tri cellulaire préalable. En effet, à des fins d'applications cliniques, un point clé concerne la pureté du produit de thérapie cellulaire (PTC): il est nécessaire d'obtenir une population la plus homogène possible de précurseurs de photorécepteurs et d'éliminer toute population résiduelle d'autres cellules et surtout les cellules mitotiques indifférenciées. Il est cependant à noter qu'un PTC totalement homogène n'est pas nécessairement une condition requise par les agences réglementaires (FDA, EMA) au lancement d'un essai clinique (Singh *et al.*, 2020). Celles-ci permettent aux investigateurs de fixer leurs propres critères de pureté. Néanmoins, un produit hautement enrichi (>80%) en précurseurs de photorécepteurs conditionne par la suite la sécurité du produit. Dans le cadre de transplantations de cellules rétiennes et de précurseurs de photorécepteurs plus particulièrement, une limitation de celles-ci est le faible nombre de cellules à s'intégrer *in vivo*. Diverses études ont montré que l'enrichissement du PTC en cellules rétiennes d'intérêt permettait d'augmenter de manière significative le nombre de photorécepteurs intégrés à la rétine de l'hôte (Barber *et al.*, 2013, Lakowski *et al.*, 2011, MacLaren *et al.*, 2006, Pearson *et al.*, 2012). La stratégie de tri cellulaire la plus longtemps utilisée a été de marquer génétiquement les cellules d'intérêt. Bien qu'intéressante, celle-ci n'est pas compatible pour un transfert vers la clinique. Ainsi, l'identification de marqueurs de surface cellulaire caractéristiques des précurseurs de photorécepteurs en vue de leur sélection a été nécessaire pour l'isolement et la

purification de la population cellulaire d'intérêt par des méthodes telles que le FACS (tri cellulaire activé par fluorescence) ou le MACS (tri cellulaire magnétique). La sélection basée sur la protéine CD73 (ecto-5'-nucléotidase) a été tout aussi efficace avec l'approche FACS que MACS, conduisant à un enrichissement significatif de la population de précurseurs de photorécepteurs avec les deux méthodes (Gagliardi *et al.*, 2019, Gagliardi *et al.*, 2018, Lakowski *et al.*, 2018). Lawoski *et al.*, ont également isolé les précurseurs des photorécepteurs en utilisant le marqueur CD73 en combinaison avec un autre marqueur de surface cellulaire, le CD24 (ou nectadrine) (Lakowski *et al.*, 2011, Eberle *et al.*, 2011). Peu après, Santos Ferreira *et al.*, ont démontré que le ciblage seul de l'antigène CD73 était suffisant pour enrichir efficacement une population homogène de précurseurs de bâtonnets à partir d'organoides rétiniens dérivés de cellules ES de souris (Santos-Ferreira *et al.*, 2016). Notre équipe a rapporté pour la première fois que la protéine CD73 était spécifiquement exprimée dans les précurseurs de photorécepteurs CRX-/RECOVERIN-positifs dérivés de cellules iPS humaines (Reichman *et al.*, 2014) ce qui a été confirmé par la suite dans la rétine humaine fœtale et adulte *in vivo* (Lakowski *et al.*, 2015, Lakowski *et al.*, 2018). Bien que les approches de tri cellulaire par MACs sont déjà utilisées dans des essais cliniques de progéniteurs cardiaques dérivés de cellules ES humaines dans le traitement d'insuffisance cardiaque (Menasché *et al.*, 2015, Menasché *et al.*, 2018) sans qu'il n'y ait eu d'impact néfaste ou d'effets secondaires à long terme dus aux microbilles à la surface des cellules triées (Handgretinger *et al.*, 1998) ; il serait préférable d'obtenir des cultures enrichies en cellules d'intérêt en se passant d'étape de tri cellulaire. Au vu de tous ces éléments, la possibilité de générer des grandes quantités de cultures enrichies à 90% de précurseurs de photorécepteurs à partir de RPCs sans étape préalable de tri offre une nouvelle source de cellules à des fins de transplantation cellulaire.

Applications potentielles des RPCs à des fins d'étude des dystrophies rétiniennes

Les RPCs obtenues, hormis leur utilisation en médecine régénérative, peuvent être un outil utile pour étudier la rétino-génèse et les maladies associées. En effet, l'analyse transcriptomique comparant l'expression génétique des organoïdes rétiniens et des RPCs a révélé de nouveaux marqueurs potentiels de la multipotence, de la neuro-génèse et de la différenciation. A noter que l'analyse transcriptomique spécifique utilisant des filtres d'expression génique a permis de sélectionner des gènes impliqués dans les maladies neuro-développementales, telles que la microphthalmie (*VAX1*, *ALDH1A3*, *GJA1*, *SMO1*), et les dystrophies rétiniennes, comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge (*ADAMTS*), l'amaurose congénitale de Leber (*KCNJ13*), le glaucome (*CA2*) et la maladie de Stargardt (*ABCA4*). Nous pouvons utiliser ces cellules afin d'identifier de nouveaux gènes responsables de maladies rétiniennes.

Une autre application de ces cellules pourrait être la modélisation pathologique. Dans cette optique, nous avons généré des RPCs issues d'une lignée de cellules iPS d'un patient atteint de RP porteur de la mutation c.1040C>T (*p.P347L*) dans le gène *RHODOPSINE* connue comme étant la mutation la plus commune des RPs autosomiques dominantes en Europe (Audo et al., 2010). Au sein de l'équipe, la modélisation de la RP liée à cette mutation a été possible à l'aide d'organoïdes rétiniens dérivés des cellules iPS du patient. Une dégénérescence des photorécepteurs matures, avec dans un premier temps la perte photorécepteurs à des bâtonnets, suivie par celle photorécepteurs à cônes a été mise en évidence, récapitulant le phénotype pathologique observé chez les patients. Nous aimerions après caractérisation complète des RPCs générées à partir de ces cellules iPS (*RHO P347L*), les différencier en photorécepteurs et voir s'il est possible d'observer le même type dégénérescence de photorécepteurs en 2D. Dans ce cas, des tests de criblages à haut débit pourraient être entrepris pour la découverte de nouvelles molécules neuroprotectrices permettant de prévenir la dégénérescence de ces photorécepteurs

Applications potentielles des RPCs à des fins de découverte de nouvelles molécules actives à potentiel thérapeutique

Les approches de découverte de molécules par criblage à haut débit (HTS) demandent certains prérequis. Dans un premier temps il est nécessaire de rappeler que la miniaturisation des essais de criblage à haut débit est l'étape clé dans ces approches. En effet, pour effectuer une analyse HTS, les composés cibles sont repartis dans des plaques multipuits de dimensions standardisées de 12, 24, 48, 96, 192, 384 ou 1536 puits contenant les cultures cellulaires d'intérêt. De par le grand nombre de composés des chimiothèques testés au cours des essais mais aussi la nécessité de répéter les tests afin d'éviter des faux positifs, de grandes quantités de cellules d'intérêt sont nécessaires.

Bien que les cultures en 2D de cellules rétiniennes soient les plus adaptées pour l'automatisation et la miniaturisation des tests de criblage à haut débit, celles-ci ne parviennent pas à récapituler le microenvironnement cellulaire, en particulier les interactions cellule-cellule ainsi que cellule-matrice extracellulaire, ce qui limite la portée de la modélisation des maladies. Ainsi, la communauté scientifique s'est tournée vers l'utilisation de la technologie des organoïdes rétiniens pour la découverte de nouvelles molécules par des criblages HTS (Aasen et Vergara, 2020 ; Dorgau et al., 2022). Ces derniers présentent l'avantage de récapituler plus fidèlement certains aspects de l'architecture et de la composition cellulaire de la rétine humaine et offrent la possibilité d'une meilleure modélisation des dystrophies rétiniennes, et par suite logique une meilleure évaluation de possibles composés à potentiel thérapeutique. Cependant, si les criblages sur organoïdes offrent un certain nombre d'avantages par rapport à ceux sur cultures 2D, ils s'accompagnent également d'un certain nombre de mises en garde. En effet, il existe une variabilité dans l'auto-organisation des organoïdes lors de leur culture; cette variabilité nécessite alors l'utilisation de nombreux organoïdes individuels pour confirmer que les phénotypes pathologiques observés ne sont pas une simple conséquence de celle-ci. Il faut également prendre en

compte la structure 3D des organoïdes et les contraintes des effets de diffusion qui se manifestent avec l'augmentation de la taille des organoïdes. Ainsi, deux des plus grands défis concernant l'utilisation des organoïdes rétiniens pour des essais HTS sont la visualisation de ces structures 3D à l'aide de systèmes d'imagerie automatisés et la mise en place d'essais robustes pour l'analyse de l'effet des composés testés (Vergara *et al.*, 2017, Langhans *et al.*, 2018). Pour répondre à ce besoin, Vergara *et al.*, ont mis au point une plateforme de criblage qui permet la quantification précise de l'expression de la fluorescence dans des organoïdes rétiniens générés à partir de cellules iPS humaines rapportrices (Vergara *et al.*, 2017). Ils ont pu établir les paramètres optimaux pour la détection du signal des rapporteurs fluorescents et conçu des méthodes pour compenser la variabilité de la taille des organoïdes.

Si les modèles 2D ou 3D de dystrophies rétiniennes pour les tests de criblage HTS apportent tous deux des avantages et des inconvénients, quelle serait la place des RPCs générées dans la découverte de nouvelles molécules? L'obtention de photorécepteurs matures au sein des organoïdes nécessitant des temps longs de culture (J150-200) et donc des coûts non négligeables, les RPCs issues de lignée de cellules iPS de patients pourraient, à mon sens, servir d'outil préliminaire dans les tests de criblage HTS permettant de faire une première sélection de composés prometteurs, dits composés « hits », par des tests adaptés choisis préalablement. Ces composés « hits » pourraient être testés sur des organoïdes rétiniens issus des mêmes cellules iPS de patient par la suite pour leur validation. Il existe différentes approches en matière de tests de criblage à haut débit: alors que la découverte de médicaments sur cible isolée mesure la bioactivité des composés d'une chimiothèque sur une cible déterminée et validée; le criblage phénotypique compare plusieurs composés pour trouver celui qui donne le phénotype souhaité (Frank An *et Tolliday*, 2010). Le criblage phénotypique, plus adapté ici du fait d'une absence de cible précise, permet de sélectionner des molécules capables d'interférer avec un processus biologique donné, en observant un phénotype lié à la perturbation que l'on veut susciter. Dans ces cas, les étapes complémentaires consisteront à identifier la cible moléculaire de la substance active. Souvent pour les criblages phénotypiques, des analyses multiparamétriques en association avec des techniques de microscopie automatisées, susceptibles d'acquérir des images de cellules en microplaques sont mises en oeuvre. Il s'agit de technique à haut contenu informatif. Les résultats peuvent être analysés directement ou bien à l'aide de logiciels de reconnaissance de formes capables de repérer des phénotypes d'intérêt.

Différenciation des cellules progénitrices rétiniennes en photorécepteurs à bâtonnets

Toute application potentielle de cellules neurorétiniennes obtenues à partir de CSPh incluant la transplantation cellulaire, la modélisation pathologique ou encore la découverte de nouvelles molécules actives sur un modèle pathologique nécessite la mise en place d'un protocole de différenciation robuste adapté des CSPh en cellules d'intérêt. Jusqu'à présent, les cellules souches pluripotentes ont été utilisées pour générer plusieurs types cellulaires impliqués dans les maladies dégénératives de la rétine, incluant les cellules progénitrices de la rétine mais aussi les cellules de l'EPR les cellules ganglionnaires et les photorécepteurs à bâtonnets et à cônes. Malgré ces succès, les protocoles de différenciation conduisant à l'obtention de photorécepteurs sont relativement longs, coûteux et très dépendants de la lignée de CSPh utilisée et de son « statut épigénétique », qui peut évoluer au fil du temps en culture (Nishino et al., 2011, Hu et al., 2010, Baker et al., 2007, He et al., 2012). De par l'utilisation de conditions spécifiques appliquées aux cultures des RPCs isolées à partir d'organoïdes rétiniens incluant l'inhibiteur de la voie Notch, il nous a été possible d'obtenir des cultures enrichies en précurseurs de photorécepteurs à 90% en deux semaines sans la nécessité d'une étape de tri, et ce en réduisant le recours à des facteurs exogènes et sérum. Cependant, la principale difficulté réside non pas dans l'orientation des cellules progénitrices rétiniennes dans la voie de différenciation des photorécepteurs, mais dans leur maturation en photorécepteurs présentant les caractères morphologiques et fonctionnels spécifiques. Afin de permettre cette différenciation terminale, de nombreux groupes ont cherché à récapituler *in vitro* les étapes clés de la rétino-génèse. Cependant, contrairement à la différenciation des cellules de l'EPR principalement induite par des facteurs extrinsèques tels que les signaux Wnt et Activine sécrétés par le mésenchyme péri-oculaire (Fuhrmann et al., 2010) et donc facilement reproductibles *in vitro*, la différenciation des cellules de la rétine neurale dépend de mécanismes plus complexes impliquant les actions de facteurs extrinsèques et intrinsèques auxquelles s'ajoute la composante stochastique rendant la possibilité de reproduire *in vitro* la différenciation des RPCs en photorécepteurs plus compliquée. Néanmoins, des études ont été menées afin d'identifier des molécules permettant de favoriser *in vitro* la différenciation des RPCs en photorécepteurs à bâtonnets même si leur implication de la différenciation *in vivo* au cours du développement embryonnaire reste ambiguë (Kelly et al., 1999, Kelly et al., 1994, Hyat et al., 1996, Prabhudesai et al., 2005, Khanna et al., 2006, Lombardini JB 1991, Altshuler et al., 1993, Davis 1997 et 1999, Belecky-Adams et al., 1999, Bradford et al., 2005, Kanno et al., 2009, Hicks and Courtois, 1992).

En se basant sur la littérature et les molécules identifiées, nous avons testé des conditions de culture parmi lesquelles une condition de culture définie par l'utilisation du milieu ProNeural, du DAPT, de l'acide rétinoïque, de la taurine et du FGF2 a permis en 3 semaines une induction de 20 fois du gène *CRX* spécifique des précurseurs des photorécepteurs et de 73 fois du gène *NRL* spécifique des photorécepteurs à bâtonnets précurseurs et matures comparativement à la condition contrôle (milieu proneural uniquement). Bien que l'analyse transcriptomique par RT-qPCR met en évidence un engagement certain des RPCs vers la voie des photorécepteurs à bâtonnets, seules quelques cellules ont été marquées positives au marqueur *NRL*. Il est à noter que ces expériences ont été réalisées uniquement sur 3 semaines de différenciation et l'observation de marqueurs plus matures nécessiterait des temps de différenciation plus longs. En effet, nous avons pu détecter, au cours d'autres expériences menées, seulement après 7 semaines de différenciation l'expression du gène *RHODHOPSIN* spécifique des photorécepteurs à bâtonnets matures. Il serait alors intéressant de tester la condition de culture ProNeural, DAPT, acide rétinoïque, taurine et FGF2 sur au moins 7 semaines de différenciation pour voir si l'addition de ces molécules permettrait d'accélérer la différenciation des précurseurs des photorécepteurs en photorécepteurs à bâtonnets, et/ou d'augmenter le nombre de photorécepteurs à bâtonnets matures. Toutefois, certaines limites sont à prendre en compte pour l'établissement de cultures de cellules adhérentes (2D) à long terme. En effet, les cellules par souci de perte d'adhérence sur le verre, sont cultivées à long terme sur des supports à fond plastique nécessitant alors pour les analyses par immunofluorescence la dissociation des cellules préalablement différenciées et leur réensemencement sur des lamelles de verre. Bien que nous utilisions comme technique de dissociation le traitement enzymatique à la papaïne qui permet d'obtenir une dissociation complète (à l'unicellulaire) sans causer de dommages cellulaires importants, il est possible que la dissociation de cellules aussi différenciées et notamment de photorécepteurs induise une perte de leur morphologie cellulaire avec l'absence de segments externes (caractéristiques de photorécepteurs fonctionnellement matures).

Différentes perspectives sont envisageables pour la suite de ce projet, dans le but d'obtenir des cultures enrichies en photorécepteurs matures. Un certain nombre d'études ont suggéré que l'utilisation de bioréacteurs pour la culture en 3D d'une variété d'organoides dérivés de CSPh améliore la différenciation de ces derniers en permettant une meilleure diffusion de facteurs extrinsèques et nutriments (Cameron *et al.*, 2006, Gerecht-Nir *et al.*, 2004, Kelava *et al.*, 2016, Kempf *et al.*, 2014, Lock *et al.*, 2009, Niebruegge *et al.*, 2009, Qian *et al.*, 2016, Yirme *et al.*, 2008). Comme précédemment évoqué dans la partie 1 de cette discussion, le recours à une culture en bioréacteurs pourrait améliorer l'amplification des RPCs, mais celle-ci pourrait aussi être utile si ce n'est nécessaire pour la différenciation des RPCs en photorécepteurs. Di Stefano *et al.*, ont pu démontrer une croissance accrue et une accélération de la différenciation d'organoides rétiniens lorsque cultivés en bioréacteurs mais ne mettent pas en évidence une maturation améliorée des cellules photoréceptrices (DiStefano *et al.*, 2017). Ovando-Roche *et al.*; ont démontré que l'utilisation de bioréacteurs pour la culture d'organoides

rétiniens permettait une meilleure lamination des organoïdes rétiniens et ont pu également observer un nombre accru de photorécepteurs dotés de cils et de structures naissantes de type segments externe à un stade précoce de leur culture en bioréacteurs (16^{ème} semaine) (Ovando et al., 2018).

Une autre piste à explorer est la mise en place de co-cultures de RPCs ou précurseurs de photorécepteurs avec des cellules de l'EPR. Les cellules de l'EPR secrètent de nombreux facteurs croissance qui sont importants pour la formation des segments externes des photorécepteurs *in vivo* (Ebrahimi et al., 2014, Nasonkin et al., 2013) et leur bon fonctionnement (Jablonski et al., 2000). De par la relation anatomique et physiologiques entre l'EPR et la rétine neurale et en particulier les photorécepteurs, la sélection des cellules de l'EPR comme candidat pour l'induction de la différenciation des cellules photoréceptrices est donc légitime. Akthar et al., ont co-cultivé des organoïdes rétiniens dérivés de cellules iPS humaines avec des monocouches de cellules primaires de l'EPR de souris par contact direct et indirect (ajout aux organoïdes toutes les 24h du milieu de culture des cellules de l'EPR) afin d'évaluer l'éventuel effet des cellules de l'EPR sur la différenciation des organoïdes. En l'absence de contact entre les deux types cellulaires, aucun changement dans l'expression de différents marqueurs de photorécepteurs n'a été détecté. Cependant, lorsque cultivés par contact direct, les cellules de l'EPR ont augmenté, après 5 semaines de culture, l'expression de la *RECOVERIN* et après 5 mois de culture, l'accélération de l'expression des gènes de la *RHODOSPINE* et de l'*OPSINE R/G*. Ils ont pu démontrer alors qu'un contact direct des cellules de l'EPR et des organoïdes était nécessaire pour permettre une différenciation accélérée des photorécepteurs. Cependant les mécanismes sous-jacents d'interaction intercellulaire à l'origine de la différence des résultats pour contact direct versus indirect n'ont pas été étudiés (Akhtar et al., 2019). Plus récemment, Singh et al., ont co-cultivé des RPCs dérivées de CSPh et des cellules de l'EPR dérivées de CSPh ou de fœtus pendant 9 mois. Bien que l'analyse des expériences de Western Blot immunoblots aient révélé une augmentation de l'expression de l'*OPSINE R/G* et de la *RHODOPSINE* ; les expériences d'immunofluorescence n'ont pas permis d'observer des cellules photoréceptrices avec des segments internes et externes des photorécepteurs. De manière intéressante, cette co-culture a permis une maturation des cellules de l'EPR avec une augmentation de la résistance transépithéliale et de l'expression des gènes spécifique de l'EPR mature (Singh et al., 2020).

Aussi, afin de continuer les efforts menés dans l'amélioration des protocoles de différenciation par la mise en évidence de facteurs extrinsèques permettant de moduler le devenir des progéniteurs, il est nécessaire d'établir de nouvelles stratégies afin d'identifier de futurs facteurs clés dans leur différenciation même si le rôle de ces derniers dans le développement embryonnaire n'est pas encore établi. Dans cette optique, Maruotti et al., a identifié la chetomin comme un inducteur de la différenciation des cellules de l'EPR par criblage moléculaire (Maruotti et al., 2015). A l'institut de la Vision, des criblages à haut débit sont réalisés sur des modèles pathologiques en vue de découvrir de

nouveaux composés thérapeutiques. Aussi, il pourrait être envisageable de mettre à profit cette technologie pour l'optimisation des protocoles de différenciation rétinienne en ciblant certains lignages spécifiques (cellules ganglionnaires, photorécepteurs, ..).

Au cours de mon doctorat, nous nous sommes focalisés sur la différenciation des RPCs en photorécepteurs précurseurs et matures, mais nous avons néanmoins démontré la multipotence des RPCs et leur différenciation en tous les types cellulaires de la rétine neurale. Nous pourrions ainsi, envisager l'obtention de cellules enrichies en un autre type cellulaire comme les cellules ganglionnaires par l'utilisation de molécules impliquées dans leur spécification et la prendre en compte pour de futures thérapies pour le traitement de neuropathies optiques touchant cette population précise tel que le glaucome.

Cryopréservation de précurseurs de photorécepteurs

Pour l'utilisation de précurseurs de photorécepteurs dérivant de CSPh dans des applications cliniques chez l'homme, certains points sont à prendre en compte. Hormis le besoin que toutes les étapes de production de la cellule rétinienne (de la source même au produit final) nécessitent d'être réalisées en conformité avec les bonnes pratiques de fabrication (en anglais GMP pour *Good Manufacturing Practices*) tout en minimisant d'éventuelles variations en termes de pureté et de qualité des cellules produites; il est nécessaire d'inclure des étapes de stockage par cryopréservation des produits cellulaires d'intérêt. En effet, le développement de méthodes de cryopréservation adaptées aux précurseurs de photorécepteurs permettrait de séparer les étapes de production du produit de thérapie cellulaire (PTC) et l'acte de transplantation. Aussi, la création de banques de PTCs offrirait la possibilité de générer, caractériser et valider (contrôles qualités) en une seule fois un lot important de cellules, qui pourraient être ensuite divisées et stockées sous forme de dose administrable réduisant alors fortement les coûts de production du PTC compatibles avec une application clinique est très importante.

Au sein de l'équipe, deux approches de cryopréservation de précurseurs de photorécepteurs ont été appréhendées. La première consiste à cryopréserver des organoïdes rétiniens entiers à des stades de développement où le marqueur CD73 est bien exprimé et que son expression par les précurseurs de photorécepteurs est préservée après décongélation pour procéder à une stratégie d'isolement par MACS. La seconde stratégie consiste à congeler les cellules-CD73-positives après tri par MACS ([Gagliardi et al., 2018](#)). La première stratégie s'est avérée plus prometteuse en termes de préservation de la viabilité cellulaire après décongélation. Bien que prometteuses, ces stratégies d'isolation ne permettent pas une production constante en termes de quantité et qualité des cellules en adéquation avec les besoins pour une application clinique. Les marqueurs (anticorps fluorescents ou des nanoparticules magnétiques) peuvent être considérés comme des contaminants pouvant interférer avec la prolifération et la différenciation cellulaire ([Menachery et al., 2017](#), [Chapman et al., 2013](#)).

Dans ce contexte, nous nous sommes focalisés sur la cryopréservation de précurseurs de photorécepteurs dérivés de RPCs. La dissociation de culture enrichies en précurseurs de photorécepteurs par la papaïne nous a permis d'obtenir le meilleur taux de survie cellulaire soit 86% avant cryopréservation et 50% après décongélation et l'analyse par cytométrie de flux a montré 44,5% de cellules CRX+ vivantes. Bien qu'il nous ait été possible de cryopréserver des cultures enrichies à plus de 90% en précurseurs de photorécepteurs sans tri préalable, une optimisation de leur cryopréservation est à prendre en compte en vue d'améliorer la survie cellulaire après décongélation. Nous avons pu noter, que la technique de dissociation utilisée en amont de la cryopréservation a une grande influence au vue des différents taux de survie obtenus. De ce fait, afin d'optimiser le taux de survie cellulaire avant cryopréservation, il serait nécessaire dans une configuration optimale de se passer de dissociation

cellulaire. Nous pourrions alors envisager la culture des précurseurs de photorécepteurs en bioréacteurs permettant de prévenir une mort cellulaire due à la dissociation enzymatique par papaine des organoïdes.

De futures optimisations concernent également l'étape même de cryopréservation. L'objectif de la cryopréservation est l'arrêt du métabolisme cellulaire de manière réversible tout en préservant l'intégrité des membranes. Les techniques diffèrent notamment selon l'utilisation de cryoprotectants et leur nature mais également la cinétique de cryopréservation. Du fait d'une cryopréservation réussie des RPCs isolées, nous avons utilisé les mêmes paramètres cryopréservation des précurseurs de photorécepteurs : utilisant d'un milieu de cryopréservation composé du cryoprotectants DMSO (10%) et une vitesse de refroidissement à 1°C/min qui permet de réduire les dommages causées à la membrane cellulaire par la formation de cristaux de glace (Pegg 2007). Le DMSO est le cryoprotectant le plus utilisé pour la congélation de cellules souches pluripotentes. Malgré cela, le DMSO est connu pour ses effets cytotoxiques. Celui-ci fait partie des cryoprotecteurs pénétrants, qui contrairement aux cryoprotecteurs non pénétrants, ont la capacité de traverser la membrane cellulaire. Afin de diminuer les risques de toxicité associés aux cryoprotecteurs pénétrants (dont la génotoxicité ou choc osmotique trop important) et assure une protection intra- et extra- cellulaire, des cryoprotecteurs non pénétrants, tels que le tréhalose (Milosevic et al., 2009, Ntai et al., 2018) ou des polymères à haut poids moléculaire (dextran, acide hyaluronique) sont souvent utilisés en combinaison. Il serait alors intéressant de tester pour la cryopréservation des précurseurs des photorécepteurs, différents milieux de cryopréservations composés de divers cryoprotecteurs pénétrants et/ou non pénétrants. La toxicité chimique est une préoccupation importante lorsque les cryoprotecteurs se trouvent à une concentration élevée (Fahy 1986). Nous pourrions envisager de tester dans un premier temps des milieux de cryopréservation avec des pourcentages de DMSO moins importants (inférieur à 10%). D'autres paramètres pourraient avoir un impact sur l'efficacité de la cryopréservation-décongélation des cultures enrichies en précurseurs de photorécepteurs et seraient alors intéressants d'étudier comprenant le nombre de cellules congelées, la densité cellulaire et la vitesse de cryopréservation et décongélation des cellules. Enfin, il serait nécessaire à des fins d'applications cliniques, d'évaluer l'effet de la cryopréservation sur la capacité des précurseurs de photorécepteurs à se différencier en photorécepteurs matures (bâtonnets et cônes) après décongélation.

Liste bibliographique

A.

Aasen, D. M. & Vergara, M. N. New Drug Discovery Paradigms for Retinal Diseases: A Focus on Retinal Organoids. *J Ocul Pharmacol Ther* **36**, 18–24 (2020).

Aasen, T. *et al.* Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* **26**, 1276–1284 (2008).

Achberger, K. *et al.* 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 (2019).

Aftab, U. *et al.* Growth kinetics and transplantation of human retinal progenitor cells. *Exp Eye Res* **89**, 301–310 (2009).

Agathocleous, M. & Harris, W. A. From progenitors to differentiated cells in the vertebrate retina. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**, 45–69 (2009).

Agathocleous, M. & Harris, W. A. From progenitors to differentiated cells in the vertebrate retina. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**, 45–69 (2009).

Agathocleous, M., Locker, M., Harris, W. A. & Perron, M. A general role of hedgehog in the regulation of proliferation. *Cell Cycle* **6**, 156–159 (2007).

Ahmad, I., Tang, L. & Pham, H. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun* **270**, 517–521 (2000).

Ahmad, I., Das, A. V., James, J., Bhattacharya, S. & Zhao, X. Neural stem cells in the mammalian eye: types and regulation. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 53–62 (2004).

Akimoto, M. *et al.* Targeting of GFP to newborn rods by Nrl promoter and temporal expression profiling of flow-sorted photoreceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 3890–3895 (2006).

Allen, P. J. Retinal prostheses: Where to from here? *Clin Exp Ophthalmol* **49**, 418–429 (2021).

Alper, J. Geron gets green light for human trial of ES cell-derived product. *Nat Biotechnol* **27**, 213–214 (2009).

Altshuler, D., Lo Turco, J. J., Rush, J. & Cepko, C. Taurine promotes the differentiation of a vertebrate retinal cell type in vitro. *Development* **119**, 1317–1328 (1993).

Amato, M. A., Boy, S. & Perron, M. Hedgehog signaling in vertebrate eye development: a growing puzzle. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 899–910 (2004).

Amirpour, N. *et al.* Differentiation of human embryonic stem cell-derived retinal progenitors into retinal cells by Sonic hedgehog and/or retinal pigmented epithelium and transplantation into the subretinal space of sodium iodate-injected rabbits. *Stem Cells Dev* **21**, 42–53 (2012).

An, W. F. & Tolliday, N. Cell-based assays for high-throughput screening. *Mol Biotechnol* **45**, 180–186 (2010).

Anasagasti, A., Irigoyen, C., Barandika, O., López de Munain, A. & Ruiz-Ederra, J. Current mutation discovery approaches in Retinitis Pigmentosa. *Vision Res* **75**, 117–129 (2012).

Arno, G. *et al.* Mutations in REEP6 Cause Autosomal-Recessive Retinitis Pigmentosa. *Am J Hum Genet* **99**, 1305–1315 (2016).

Athanasiou, D. *et al.* The cell stress machinery and retinal degeneration. *FEBS Letters* **587**, 2008–2017 (2013).

Audo, I. *et al.* Spectrum of rhodopsin mutations in French autosomal dominant rod-cone dystrophy patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**, 3687–3700 (2010).

B.

Baghbaderani, B. A., Behie, L. A., Mukhida, K., Hong, M. & Mendez, I. New bioengineering insights into human neural precursor cell expansion in culture. *Biotechnol Prog* **27**, 776–787 (2011).

Baghbaderani, B. A. *et al.* Expansion of human neural precursor cells in large-scale bioreactors for the treatment of neurodegenerative disorders. *Biotechnol Prog* **24**, 859–870 (2008).

Bailey, T. J. *et al.* Regulation of vertebrate eye development by Rx genes. *Int J Dev Biol* **48**, 761–770 (2004).

Baker, D. E. C. *et al.* Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nat Biotechnol* **25**, 207–215 (2007).

Ballios, B. G. *et al.* A Hyaluronan-Based Injectable Hydrogel Improves the Survival and Integration of Stem Cell Progeny following Transplantation. *Stem Cell Reports* **4**, 1031–1045 (2015).

Barabino, A. *et al.* Deregulation of Neuro-Developmental Genes and Primary Cilium Cytoskeleton Anomalies in iPSC Retinal Sheets from Human Syndromic Ciliopathies. *Stem Cell Reports* **14**, 357–373 (2020).

Baranov, P. Y., Tucker, B. A. & Young, M. J. Low-oxygen culture conditions extend the multipotent properties of human retinal progenitor cells. *Tissue Eng Part A* **20**, 1465–1475 (2014).

Barber, A. C. *et al.* Repair of the degenerate retina by photoreceptor transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 354–359 (2013).

Barnea-Cramer, A. O. *et al.* Function of human pluripotent stem cell-derived photoreceptor progenitors in blind mice. *Sci Rep* **6**, 29784 (2016).

- Bartsch, U. *et al.* Retinal cells integrate into the outer nuclear layer and differentiate into mature photoreceptors after subretinal transplantation into adult mice. *Exp Eye Res* **86**, 691–700 (2008).
- Bassett, E. A. & Wallace, V. A. Cell fate determination in the vertebrate retina. *Trends Neurosci* **35**, 565–573 (2012).
- Baust, J. M., Vogel, M. J., Van Buskirk, R. & Baust, J. G. A molecular basis of cryopreservation failure and its modulation to improve cell survival. *Cell Transplant* **10**, 561–571 (2001).
- Belecky-Adams, T. L., Scheurer, D. & Adler, R. Activin family members in the developing chick retina: expression patterns, protein distribution, and in vitro effects. *Dev Biol* **210**, 107–123 (1999).
- Belgio, B., Salvetti, A. P., Mantero, S. & Boschetti, F. The Evolution of Fabrication Methods in Human Retina Regeneration. *Applied Sciences* **11**, 4102 (2021).
- Belliveau, M. J. & Cepko, C. L. Extrinsic and intrinsic factors control the genesis of amacrine and cone cells in the rat retina. *Development* **126**, 555–566 (1999).
- Belliveau, M. J., Young, T. L. & Cepko, C. L. Late retinal progenitor cells show intrinsic limitations in the production of cell types and the kinetics of opsin synthesis. *J Neurosci* **20**, 2247–2254 (2000).
- Belloni, E. *et al.* Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat Genet* **14**, 353–356 (1996).
- Ben M'Barek, K. & Monville, C. Cell Therapy for Retinal Dystrophies: From Cell Suspension Formulation to Complex Retinal Tissue Bioengineering. *Stem Cells Int* **2019**, 4568979 (2019).
- Ben-Yehudah, A., Malcov, M., Frumkin, T. & Ben-Yosef, D. Mutated human embryonic stem cells for the study of human genetic disorders. *Methods Mol Biol* **873**, 179–207 (2012).
- Berger, W., Kloeckener-Gruissem, B. & Neidhardt, J. The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Prog Retin Eye Res* **29**, 335–375 (2010).
- Besharse, J. C., Hollyfield, J. G. & Rayborn, M. E. Photoreceptor outer segments: accelerated membrane renewal in rods after exposure to light. *Science* **196**, 536–538 (1977).
- Bharti, K., Liu, W., Csermely, T., Bertuzzi, S. & Arnheiter, H. Alternative promoter use in eye development: complex role and regulation of the transcription factor MITF. *Development* **135**, 1169–1178 (2008).
- Bharti, K., Nguyen, M.-T. T., Skuntz, S., Bertuzzi, S. & Arnheiter, H. The other pigment cell: specification and development of the pigmented epithelium of the vertebrate eye. *Pigment Cell Res* **19**, 380–394 (2006).
- Bhattacharya, S. *et al.* Involvement of Ath3 in CNTF-mediated differentiation of the late retinal progenitors. *Mol Cell Neurosci* **27**, 32–43 (2004).

- Bock, C. *et al.* Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell* **144**, 439–452 (2011).
- Boije, H., MacDonald, R. B. & Harris, W. A. Reconciling competence and transcriptional hierarchies with stochasticity in retinal lineages. *Current Opinion in Neurobiology* **27**, 68–74 (2014).
- Bora, N., Conway, S. J., Liang, H. & Smith, S. B. Transient overexpression of the Microphthalmia gene in the eyes of Microphthalmia vitiligo mutant mice. *Dev Dyn* **213**, 283–292 (1998).
- Borday, C. *et al.* Antagonistic cross-regulation between Wnt and Hedgehog signalling pathways controls post-embryonic retinal proliferation. *Development* **139**, 3499–3509 (2012).
- Boucherie, C. *et al.* Brief report: self-organizing neuroepithelium from human pluripotent stem cells facilitates derivation of photoreceptors. *Stem Cells* **31**, 408–414 (2013).
- Boulton, M. & Dayhaw-Barker, P. The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye (Lond)* **15**, 384–389 (2001).
- Boulton, M. & Dayhaw-Barker, P. The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye (Lond)* **15**, 384–389 (2001).
- Bowmaker, J. K. & Dartnall, H. J. Visual pigments of rods and cones in a human retina. *J Physiol* **298**, 501–511 (1980).
- Bradford, R. L., Wang, C., Zack, D. J. & Adler, R. Roles of cell-intrinsic and microenvironmental factors in photoreceptor cell differentiation. *Dev Biol* **286**, 31–45 (2005).
- Brandl, C. Generation of Functional Retinal Pigment Epithelium from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Methods Mol Biol* **1834**, 87–94 (2019).
- Bravo-Gil, N. *et al.* Unravelling the genetic basis of simplex Retinitis Pigmentosa cases. *Sci Rep* **7**, 41937 (2017).
- Breuer, D. K. *et al.* A comprehensive mutation analysis of RP2 and RPGR in a North American cohort of families with X-linked retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* **70**, 1545–1554 (2002).
- Buch, P. K., MacLaren, R. E. & Ali, R. R. Neuroprotective gene therapy for the treatment of inherited retinal degeneration. *Curr Gene Ther* **7**, 434–445 (2007).
- Buchholz, D. E. *et al.* Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium. *Stem Cells Transl Med* **2**, 384–393 (2013).
- Buganim, Y. *et al.* Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. *Cell* **150**, 1209–1222 (2012).
- Buganim, Y., Faddah, D. A. & Jaenisch, R. Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nat Rev Genet* **14**, 427–439 (2013).

Burns, S. A., Elsner, A. E., Sapoznik, K. A., Warner, R. L. & Gast, T. J. Adaptive optics imaging of the human retina. *Prog Retin Eye Res* **68**, 1–30 (2019).

Buskin, A. *et al.* Disrupted alternative splicing for genes implicated in splicing and ciliogenesis causes PRPF31 retinitis pigmentosa. *Nat Commun* **9**, 4234 (2018).

C.

Cameron, C. M., Hu, W.-S. & Kaufman, D. S. Improved development of human embryonic stem cell-derived embryoid bodies by stirred vessel cultivation. *Biotechnol Bioeng* **94**, 938–948 (2006).

Campo, R. V. & Aaberg, T. M. Ocular and systemic manifestations of the Bardet-Biedl syndrome. *Am J Ophthalmol* **94**, 750–756 (1982).

Capowski, E. E. *et al.* Reproducibility and staging of 3D human retinal organoids across multiple pluripotent stem cell lines. *Development* **146**, dev171686 (2019).

Carr, A.-J. *et al.* Protective effects of human iPS-derived retinal pigment epithelium cell transplantation in the retinal dystrophic rat. *PLoS One* **4**, e8152 (2009).

Cepko, C. L. The roles of intrinsic and extrinsic cues and bHLH genes in the determination of retinal cell fates. *Curr Opin Neurobiol* **9**, 37–46 (1999).

Cepko, C. L., Austin, C. P., Yang, X., Alexiades, M. & Ezzeddine, D. Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 589–595 (1996).

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

Chahine Karam, F. *et al.* Human iPSC-Derived Retinal Organoids and Retinal Pigment Epithelium for Novel Intronic RPGR Variant Assessment for Therapy Suitability. *J Pers Med* **12**, 502 (2022).

Chao, J. R. *et al.* Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Cells into the Subretinal Space of a Non-Human Primate. *Transl Vis Sci Technol* **6**, 4 (2017).

Chapman, M. R. *et al.* Sorting single satellite cells from individual myofibers reveals heterogeneity in cell-surface markers and myogenic capacity. *Integr Biol (Camb)* **5**, 692–702 (2013).

Chapman, R. W. & Guillette Jr, L. J. Contaminants and imPOSEX: transcriptomics of contaminant-induced sex change. *Molecular Ecology* **22**, 1485–1487 (2013).

Chen, J., Rattner, A. & Nathans, J. The Rod Photoreceptor-Specific Nuclear Receptor Nr2e3 Represses Transcription of Multiple Cone-Specific Genes. *J. Neurosci.* **25**, 118–129 (2005).

Cheng, H. *et al.* In vivo function of the orphan nuclear receptor NR2E3 in establishing photoreceptor identity during mammalian retinal development. *Hum Mol Genet* **15**, 2588–2602 (2006).

- Chiang, C. *et al.* Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407–413 (1996).
- Chiang, J. P.-W. *et al.* Progress and prospects of next-generation sequencing testing for inherited retinal dystrophy. *Expert Rev Mol Diagn* **15**, 1269–1275 (2015).
- Chin, M. H. *et al.* Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* **5**, 111–123 (2009).
- Chirco, K. R., Chew, S., Moore, A. T., Duncan, J. L. & Lamba, D. A. Allele-specific gene editing to rescue dominant CRX-associated LCA7 phenotypes in a retinal organoid model. *Stem Cell Reports* **16**, 2690–2702 (2021).
- Cho, S.-J. *et al.* Confirmation of germ-line transmission in the red fluorescence protein (RFP) transgenic cloned male cat. *Cell Reprogram* **12**, 739–747 (2010).
- Choudhary, P. *et al.* Directing Differentiation of Pluripotent Stem Cells Toward Retinal Pigment Epithelium Lineage. *Stem Cells Transl Med* **6**, 490–501 (2017).
- Chow, R. L. & Lang, R. A. Early eye development in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 255–296 (2001).
- Chun, Y. S., Byun, K. & Lee, B. Induced pluripotent stem cells and personalized medicine: current progress and future perspectives. *Anat Cell Biol* **44**, 245–255 (2011).
- Chun, Y. S., Chaudhari, P. & Jang, Y.-Y. Applications of patient-specific induced pluripotent stem cells; focused on disease modeling, drug screening and therapeutic potentials for liver disease. *Int J Biol Sci* **6**, 796–805 (2010).
- Chuong, A. S. *et al.* Noninvasive optical inhibition with a red-shifted microbial rhodopsin. *Nat Neurosci* **17**, 1123–1129 (2014).
- Cicero, S. A. *et al.* Cells previously identified as retinal stem cells are pigmented ciliary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 6685–6690 (2009).
- Clark, B. S. *et al.* Single-Cell RNA-Seq Analysis of Retinal Development Identifies NFI Factors as Regulating Mitotic Exit and Late-Born Cell Specification. *Neuron* **102**, 1111–1126.e5 (2019).
- Close, J. L., Gumuscu, B. & Reh, T. A. Retinal neurons regulate proliferation of postnatal progenitors and Müller glia in the rat retina via TGF beta signaling. *Development* **132**, 3015–3026 (2005).
- Cowan, C. S. *et al.* Cell Types of the Human Retina and Its Organoids at Single-Cell Resolution. *Cell* **182**, 1623–1640.e34 (2020).
- Cueva, J. G. *et al.* Vesicular gamma-aminobutyric acid transporter expression in amacrine and horizontal cells. *J Comp Neurol* **445**, 227–237 (2002).
- Cunningham, T. J. & Duester, G. Mechanisms of retinoic acid signalling and its roles in organ and limb development. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 110–123 (2015).

Czekaj, M. *et al.* In vitro expanded stem cells from the developing retina fail to generate photoreceptors but differentiate into myelinating oligodendrocytes. *PLoS One* **7**, e41798 (2012).

da Cruz, L. *et al.* The Argus II epiretinal prosthesis system allows letter and word reading and long-term function in patients with profound vision loss. *Br J Ophthalmol* **97**, 632–636 (2013).

D.

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 (2013).

Danno, H. *et al.* Molecular links among the causative genes for ocular malformation: Otx2 and Sox2 coregulate Rax expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5408–5413 (2008).

Das, T. *et al.* The transplantation of human fetal neuroretinal cells in advanced retinitis pigmentosa patients: results of a long-term safety study. *Exp Neurol* **157**, 58–68 (1999).

Davis, A. A., Matzuk, M. M. & Reh, T. A. Activin A promotes progenitor differentiation into photoreceptors in rodent retina. *Mol Cell Neurosci* **15**, 11–21 (2000).

Davis, R. L., Weintraub, H. & Lassar, A. B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**, 987–1000 (1987).

de Almeida-Pereira, L. *et al.* Adenine Nucleotides Control Proliferation In Vivo of Rat Retinal Progenitors by P2Y1 Receptor. *Mol Neurobiol* **54**, 5142–5155 (2017).

Decembrini, S., Andreazzoli, M., Barsacchi, G. & Cremisi, F. Dicer inactivation causes heterochronic retinogenesis in *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol* **52**, 1099–1103 (2008).

Dehghan, S., Mirshahi, R., Shoaee-Hassani, A. & Naseripour, M. Human-induced pluripotent stem cells-derived retinal pigmented epithelium, a new horizon for cells-based therapies for age-related macular degeneration. *Stem Cell Research & Therapy* **13**, 217 (2022).

Delplace, V. *et al.* Controlled release strategy designed for intravitreal protein delivery to the retina. *J Control Release* **293**, 10–20 (2019).

Deng, J. *et al.* Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *Nat Biotechnol* **27**, 353–360 (2009).

Deng, W.-L. *et al.* Gene Correction Reverses Ciliopathy and Photoreceptor Loss in iPSC-Derived Retinal Organoids from Retinitis Pigmentosa Patients. *Stem Cell Reports* **10**, 1267–1281 (2018).

Diakatou, M. *et al.* Allele-Specific Knockout by CRISPR/Cas to Treat Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa Caused by the G56R Mutation in NR2E3. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 2607 (2021).

Díaz, B., Serna, J., De Pablo, F. & de la Rosa, E. J. In vivo regulation of cell death by embryonic (pro)insulin and the insulin receptor during early retinal neurogenesis. *Development* **127**, 1641–1649 (2000).

Diniz, B. *et al.* Subretinal implantation of retinal pigment epithelial cells derived from human embryonic stem cells: improved survival when implanted as a monolayer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **54**, 5087–5096 (2013).

DiStefano, T. *et al.* Accelerated and Improved Differentiation of Retinal Organoids from Pluripotent Stem Cells in Rotating-Wall Vessel Bioreactors. *Stem Cell Reports* **10**, 300–313 (2017).

Donovan, S. L. & Dyer, M. A. Developmental defects in Rb-deficient retinæ. *Vision Res* **44**, 3323–3333 (2004).

Donovan, S. L. & Dyer, M. A. Regulation of proliferation during central nervous system development. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 407–421 (2005).

Dorgau, B. *et al.* Human Retinal Organoids Provide a Suitable Tool for Toxicological Investigations: A Comprehensive Validation Using Drugs and Compounds Affecting the Retina. *Stem Cells Translational Medicine* **11**, 159–177 (2022).

Dyer, M. A. & Cepko, C. L. Regulating proliferation during retinal development. *Nat Rev Neurosci* **2**, 333–342 (2001).

E.

Eberle, D., Schubert, S., Postel, K., Corbeil, D. & Ader, M. Increased Integration of Transplanted CD73-Positive Photoreceptor Precursors into Adult Mouse Retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **52**, 6462–6471 (2011).

Ebrahimi, B. Reprogramming barriers and enhancers: strategies to enhance the efficiency and kinetics of induced pluripotency. *Cell Regen* **4**, 10 (2015).

Echelard, Y. *et al.* Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* **75**, 1417–1430 (1993).

Eiraku, M. *et al.* Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* **472**, 51–56 (2011).

Elliott, J., Jolicoeur, C., Ramamurthy, V. & Cayouette, M. Ikaros confers early temporal competence to mouse retinal progenitor cells. *Neuron* **60**, 26–39 (2008).

Engle, S. J. & Vincent, F. Small Molecule Screening in Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Terminal Cell Types*. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 4562–4570 (2014).

Esteve, P. & Bovolenta, P. Secreted inducers in vertebrate eye development: more functions for old morphogens. *Curr Opin Neurobiol* **16**, 13–19 (2006).

Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154–156 (1981).

Ezzeddine, Z. D., Yang, X., DeChiara, T., Yancopoulos, G. & Cepko, C. L. Postmitotic cells fated to become rod photoreceptors can be respecified by CNTF treatment of the retina. *Development* **124**, 1055–1067 (1997).

F.

Fahy, G. M. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. *Cryobiology* **23**, 1–13 (1986).

Faktorovich, E. G., Steinberg, R. H., Yasumura, D., Matthes, M. T. & LaVail, M. M. Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. *Nature* **347**, 83–86 (1990).

Farber, D. B., Flannery, J. G. & Bowes-Rickman, C. The rd mouse story: Seventy years of research on an animal model of inherited retinal degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research* **13**, 31–64 (1994).

Fekete, D. M., Perez-Miguelsanz, J., Ryder, E. F. & Cepko, C. L. Clonal analysis in the chicken retina reveals tangential dispersion of clonally related cells. *Dev Biol* **166**, 666–682 (1994).

Fischer, A. J. & Reh, T. A. Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev Biol* **220**, 197–210 (2000).

Fischer, A. J., McGuire, C. R., Dierks, B. D. & Reh, T. A. Insulin and fibroblast growth factor 2 activate a neurogenic program in Müller glia of the chicken retina. *J Neurosci* **22**, 9387–9398 (2002).

Foltz, L. P. & Clegg, D. O. Patient-derived induced pluripotent stem cells for modelling genetic retinal dystrophies. *Prog Retin Eye Res* **68**, 54–66 (2019).

Frade, J. M. *et al.* Insulin-like growth factor-I stimulates neurogenesis in chick retina by regulating expression of the alpha 6 integrin subunit. *Development* **122**, 2497–2506 (1996).

Frasson, M. *et al.* Retinitis pigmentosa: rod photoreceptor rescue by a calcium-channel blocker in the rd mouse. *Nat Med* **5**, 1183–1187 (1999).

Fu, X., Sun, H., Klein, W. H. & Mu, X. Beta-catenin is essential for lamination but not neurogenesis in mouse retinal development. *Dev Biol* **299**, 424–437 (2006).

Fuhrmann, S., Kirsch, M., Heller, S., Rohrer, H. & Hofmann, H. D. Differential regulation of ciliary neurotrophic factor receptor-alpha expression in all major neuronal cell classes during development of the chick retina. *J Comp Neurol* **400**, 244–254 (1998).

Fuhrmann, S., Kirsch, M. & Hofmann, H. D. Ciliary neurotrophic factor promotes chick photoreceptor development in vitro. *Development* **121**, 2695–2706 (1995).

Fuhrmann, S., Levine, E. M. & Reh, T. A. Extraocular mesenchyme patterns the optic vesicle during early eye development in the embryonic chick. *Development* **127**, 4599–4609 (2000).

Fuhrmann, S. Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle. *Curr Top Dev Biol* **93**, 61–84 (2010).

Fujimura, N., Taketo, M. M., Mori, M., Korinek, V. & Kozmik, Z. Spatial and temporal regulation of Wnt/beta-catenin signaling is essential for development of the retinal pigment epithelium. *Dev Biol* **334**, 31–45 (2009).

G.

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).

Gagliardi, G., Ben M'Barek, K. & Goureau, O. Photoreceptor cell replacement in macular degeneration and retinitis pigmentosa: A pluripotent stem cell-based approach. *Prog Retin Eye Res* **71**, 1–25 (2019).

Gamm, D. M., Clark, E., Capowski, E. E. & Singh, R. The Role of FGF9 in the Production of Neural Retina and RPE in a Pluripotent Stem Cell Model of Early Human Retinal Development. *American Journal of Ophthalmology* **206**, 113–131 (2019).

Gamm, D. M. *et al.* Regulation of Prenatal Human Retinal Neurosphere Growth and Cell Fate Potential by Retinal Pigment Epithelium and Mash1. *Stem Cells* **26**, 3182–3193 (2008).

Gao, M.-L. *et al.* Patient-Specific Retinal Organoids Recapitulate Disease Features of Late-Onset Retinitis Pigmentosa. *Front Cell Dev Biol* **8**, 128 (2020).

Gaub, B. M. *et al.* Optogenetic Retinal Gene Therapy with the Light Gated GPCR Vertebrate Rhodopsin. *Methods Mol Biol* **1715**, 177–189 (2018).

Geng, X. *et al.* Haploinsufficiency of Six3 fails to activate Sonic hedgehog expression in the ventral forebrain and causes holoprosencephaly. *Dev Cell* **15**, 236–247 (2008).

Gerecht-Nir, S., Cohen, S. & Itskovitz-Eldor, J. Bioreactor cultivation enhances the efficiency of human embryoid body (hEB) formation and differentiation. *Biotechnol Bioeng* **86**, 493–502 (2004).

Gomes, F. L. A. F. *et al.* Reconstruction of rat retinal progenitor cell lineages in vitro reveals a surprising degree of stochasticity in cell fate decisions. *Development* **138**, 227–235 (2011).

González, F., Boué, S. & Izpisua Belmonte, J. C. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte. *Nat Rev Genet* **12**, 231–242 (2011).

Gonzalez-Cordero, A. *et al.* Recapitulation of Human Retinal Development from Human Pluripotent Stem Cells Generates Transplantable Populations of Cone Photoreceptors. *Stem Cell Reports* **9**, 820–837 (2017).

Graw, J. Eye development. *Curr Top Dev Biol* **90**, 343–386 (2010).

Grindley, J. C., Davidson, D. R. & Hill, R. E. The role of Pax-6 in eye and nasal development. *Development* **121**, 1433–1442 (1995).

Gualdoni, S. *et al.* Adult ciliary epithelial cells, previously identified as retinal stem cells with potential for retinal repair, fail to differentiate into new rod photoreceptors. *Stem Cells* **28**, 1048–1059 (2010).

Guha, P., Morgan, J. W., Mostoslavsky, G., Rodrigues, N. P. & Boyd, A. S. Lack of immune response to differentiated cells derived from syngeneic induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **12**, 407–412 (2013).

Gupta, V. K., You, Y., Gupta, V. B., Klistorner, A. & Graham, S. L. TrkB receptor signalling: implications in neurodegenerative, psychiatric and proliferative disorders. *Int J Mol Sci* **14**, 10122–10142 (2013).

H.

H. Rouviere & A. Delmas. *Anatomie humaine - descriptive, topographique et fonctionnelle - Tome 1, 2 et 3.* (2002).

Hacein-Bey-Abina, S. *et al.* LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**, 415–419 (2003).

Hägglund, A.-C., Dahl, L. & Carlsson, L. Lhx2 is required for patterning and expansion of a distinct progenitor cell population committed to eye development. *PLoS One* **6**, e23387 (2011).

Halder, G., Callaerts, P. & Gehring, W. J. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* **267**, 1788–1792 (1995).

Hallum, L. E. & Dakin, S. C. Retinal Implantation of Electronic Vision Prostheses to Treat Retinitis Pigmentosa: A Systematic Review. *Transl Vis Sci Technol* **10**, 8 (2021).

Hamel, C. P. Cone rod dystrophies. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **2**, 7 (2007).

Handgretinger, R. *et al.* Isolation and transplantation of autologous peripheral CD34+ progenitor cells highly purified by magnetic-activated cell sorting. *Bone Marrow Transplant* **21**, 987–993 (1998).

Hanna, J. *et al.* Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* **462**, 595–601 (2009).

Hartong, D. T., Berson, E. L. & Dryja, T. P. Retinitis pigmentosa. *Lancet* **368**, 1795–1809 (2006).

- Hasan, S. M. *et al.* Immortalized human fetal retinal cells retain progenitor characteristics and represent a potential source for the treatment of retinal degenerative disease. *Cell Transplant* **19**, 1291–1306 (2010).
- He, J. *et al.* How variable clones build an invariant retina. *Neuron* **75**, 786–798 (2012).
- Heavner, W. & Pevny, L. Eye development and retinogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, a008391 (2012).
- Hennig, A. K., Peng, G.-H. & Chen, S. Regulation of photoreceptor gene expression by Crx-associated transcription factor network. *Brain Res* **1192**, 114–133 (2008).
- Hernández-Sánchez, C., López-Carranza, A., Alarcón, C., de La Rosa, E. J. & de Pablo, F. Autocrine/paracrine role of insulin-related growth factors in neurogenesis: local expression and effects on cell proliferation and differentiation in retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9834–9838 (1995).
- Hicks, D. & Courtois, Y. Fibroblast growth factor stimulates photoreceptor differentiation in vitro. *J. Neurosci.* **12**, 2022–2033 (1992).
- Hirami, Y. *et al.* Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neurosci Lett* **458**, 126–131 (2009).
- Hochedlinger, K., Yamada, Y., Beard, C. & Jaenisch, R. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* **121**, 465–477 (2005).
- Hochmann, S. *et al.* Fgf Signaling is Required for Photoreceptor Maintenance in the Adult Zebrafish Retina. *PLOS ONE* **7**, e30365 (2012).
- Hofer, H., Carroll, J., Neitz, J., Neitz, M. & Williams, D. R. Organization of the human trichromatic cone mosaic. *J Neurosci* **25**, 9669–9679 (2005).
- Holt, C. E., Bertsch, T. W., Ellis, H. M. & Harris, W. A. Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth date. *Neuron* **1**, 15–26 (1988).
- Horsford, D. J. *et al.* Chx10 repression of Mitf is required for the maintenance of mammalian neuroretinal identity. *Development* **132**, 177–187 (2005).
- Hu, B.-Y. *et al.* Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 4335–4340 (2010).
- Huang, K.-C. *et al.* Morphological and Molecular Defects in Human Three-Dimensional Retinal Organoid Model of X-Linked Juvenile Retinoschisis. *Stem Cell Reports* **13**, 906–923 (2019).
- Huettner, J. E. & Baughman, R. W. Primary culture of identified neurons from the visual cortex of postnatal rats. *J Neurosci* **6**, 3044–3060 (1986).
- Hyatt, G. A., Schmitt, E. A., Fadool, J. M. & Dowling, J. E. Retinoic acid alters photoreceptor development in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13298–13303 (1996).

I.

Idelson, M. *et al.* Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells. *Cell Stem Cell* **5**, 396–408 (2009).

Ikeda, H. *et al.* Generation of Rx+/Pax6+ neural retinal precursors from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11331–11336 (2005).

Iraha, S. *et al.* Establishment of Immunodeficient Retinal Degeneration Model Mice and Functional Maturation of Human ESC-Derived Retinal Sheets after Transplantation. *Stem Cell Reports* **10**, 1059–1074 (2018).

Iwafuchi-Doi, M. & Zaret, K. S. Cell fate control by pioneer transcription factors. *Development* **143**, 1833–1837 (2016).

J.

Jayakody, S. A., Gonzalez-Cordero, A., Ali, R. R. & Pearson, R. A. Cellular strategies for retinal repair by photoreceptor replacement. *Prog Retin Eye Res* **46**, 31–66 (2015).

jCyte, Inc. *A Prospective, Multicenter, Randomized, Study of the Safety and Efficacy of Intravitreal Injection of Human Retinal Progenitor Cells (jCell) in Adult Subjects With Retinitis Pigmentosa (RP)*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03073733> (2022).

Jia, L. *et al.* Retinoid-related orphan nuclear receptor RORbeta is an early-acting factor in rod photoreceptor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17534–17539 (2009).

Jin, Z.-B. *et al.* Modeling Retinal Degeneration Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *PLOS ONE* **6**, e17084 (2011).

Jin, Z.-B., Okamoto, S., Xiang, P. & Takahashi, M. Integration-Free Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Retinitis Pigmentosa Patient for Disease Modeling. *Stem Cells Translational Medicine* **1**, 503–509 (2012).

Jones, S. E., Jomary, C., Grist, J., Stewart, H. J. & Neal, M. J. Altered expression of secreted frizzled-related protein-2 in retinitis pigmentosa retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 1297–1301 (2000).

Jones, S. E., Jomary, C., Grist, J., Stewart, H. J. & Neal, M. J. Modulated expression of secreted frizzled-related proteins in human retinal degeneration. *Neuroreport* **11**, 3963–3967 (2000).

K.

Kallman, A. *et al.* Investigating cone photoreceptor development using patient-derived NRL null retinal organoids. *Commun Biol* **3**, 82 (2020).

- Kanno, C. *et al.* Activin inhibits cell growth and induces differentiation in human retinoblastoma y79 cells. *Curr Eye Res* **34**, 652–659 (2009).
- Karagiannis, P. *et al.* Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development. *Physiol Rev* **99**, 79–114 (2019).
- Karlsson, M., Lindqvist, N., Mayordomo, R. & Hallböök, F. Overlapping and specific patterns of GDNF, c-ret and GFR alpha mRNA expression in the developing chicken retina. *Mech Dev* **114**, 161–165 (2002).
- Kaya, K. D. *et al.* Transcriptome-based molecular staging of human stem cell-derived retinal organoids uncovers accelerated photoreceptor differentiation by 9-cis retinal. *Mol Vis* **25**, 663–678 (2019).
- Kelava, I. & Lancaster, M. A. Dishing out mini-brains: Current progress and future prospects in brain organoid research. *Dev Biol* **420**, 199–209 (2016).
- Kelley, M. W., Turner, J. K. & Reh, T. A. Regulation of proliferation and photoreceptor differentiation in fetal human retinal cell cultures. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **36**, 1280–1289 (1995).
- Kelley, M. W., Turner, J. K. & Reh, T. A. Retinoic acid promotes differentiation of photoreceptors in vitro. *Development* **120**, 2091–2102 (1994).
- Kelley, M. W., Williams, R. C., Turner, J. K., Creech-Kraft, J. M. & Reh, T. A. Retinoic acid promotes rod photoreceptor differentiation in rat retina in vivo. *Neuroreport* **10**, 2389–2394 (1999).
- Kempf, H. *et al.* Controlling Expansion and Cardiomyogenic Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells in Scalable Suspension Culture. *Stem Cell Reports* **3**, 1132–1146 (2014).
- Khan, M. *et al.* Detailed Phenotyping and Therapeutic Strategies for Intronic ABCA4 Variants in Stargardt Disease. *Mol Ther Nucleic Acids* **21**, 412–427 (2020).
- Khanna, H. *et al.* Retinoic acid regulates the expression of photoreceptor transcription factor NRL. *J Biol Chem* **281**, 27327–27334 (2006).
- Kim, J. B. *et al.* Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* **461**, 649–643 (2009).
- Kim, J. B. *et al.* Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* **136**, 411–419 (2009).
- Kim, J. B. *et al.* Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* **454**, 646–650 (2008).
- Kim, K. *et al.* Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* **467**, 285–290 (2010).
- Kim, K. *et al.* Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* **29**, 1117–1119 (2011).

Kirsch, M., Schulz-Key, S., Wiese, A., Fuhrmann, S. & Hofmann, H. Ciliary neurotrophic factor blocks rod photoreceptor differentiation from postmitotic precursor cells in vitro. *Cell Tissue Res* **291**, 207–216 (1998).

Klassen, H. J. *et al.* Multipotent retinal progenitors express developmental markers, differentiate into retinal neurons, and preserve light-mediated behavior. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 4167–4173 (2004).

Klassen, H. *et al.* Progenitor cells from the porcine neural retina express photoreceptor markers after transplantation to the subretinal space of allorecipients. *Stem Cells* **25**, 1222–1230 (2007).

Klassen, H., Ziaieian, B., Kirov, I. I., Young, M. J. & Schwartz, P. H. Isolation of retinal progenitor cells from post-mortem human tissue and comparison with autologous brain progenitors. *J Neurosci Res* **77**, 334–343 (2004).

Klimova, L., Antosova, B., Kuzelova, A., Strnad, H. & Kozmik, Z. Onecut1 and Onecut2 transcription factors operate downstream of Pax6 to regulate horizontal cell development. *Dev Biol* **402**, 48–60 (2015).

Koenekoop, R. K. An overview of Leber congenital amaurosis: a model to understand human retinal development. *Surv Ophthalmol* **49**, 379–398 (2004).

Kokkinaki, M., Sahibzada, N. & Golestaneh, N. Human induced pluripotent stem-derived retinal pigment epithelium (RPE) cells exhibit ion transport, membrane potential, polarized vascular endothelial growth factor secretion, and gene expression pattern similar to native RPE. *Stem Cells* **29**, 825–835 (2011).

Krohne, T. U. *et al.* Generation of retinal pigment epithelial cells from small molecules and OCT4 reprogrammed human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med* **1**, 96–109 (2012).

Kruczek, K. *et al.* 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 (2017).

Kruczek, K. & Swaroop, A. Pluripotent stem cell-derived retinal organoids for disease modeling and development of therapies. *Stem Cells* **38**, 1206–1215 (2020).

Kubo, F., Takeichi, M. & Nakagawa, S. Wnt2b inhibits differentiation of retinal progenitor cells in the absence of Notch activity by downregulating the expression of proneural genes. *Development* **132**, 2759–2770 (2005).

L.

Lakowski, J. *et al.* Effective transplantation of photoreceptor precursor cells selected via cell surface antigen expression. *Stem Cells* **29**, 1391–1404 (2011).

- Lakowski, J. *et al.* Transplantation of Photoreceptor Precursors Isolated via a Cell Surface Biomarker Panel From Embryonic Stem Cell-Derived Self-Forming Retina. *Stem Cells* **33**, 2469–2482 (2015).
- Lakowski, J. *et al.* Isolation of Human Photoreceptor Precursors via a Cell Surface Marker Panel from Stem Cell-Derived Retinal Organoids and Fetal Retinae. *Stem Cells* **36**, 709–722 (2018).
- Lamb, T. D. Evolution of Phototransduction, Vertebrate Photoreceptors and Retina. in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* (eds. Kolb, H., Fernandez, E. & Nelson, R.) (University of Utah Health Sciences Center, 1995).
- Lamba, D. A., Gust, J. & Reh, T. A. Transplantation of human embryonic stem cell-derived photoreceptors restores some visual function in Crx-deficient mice. *Cell Stem Cell* **4**, 73–79 (2009).
- Lamba, D. A., Karl, M. O., Ware, C. B. & Reh, T. A. Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12769–12774 (2006).
- Lamba, D. A. *et al.* Generation, purification and transplantation of photoreceptors derived from human induced pluripotent stem cells. *PLoS One* **5**, e8763 (2010).
- Lane, A. *et al.* Modeling and Rescue of RP2 Retinitis Pigmentosa Using iPSC-Derived Retinal Organoids. *Stem Cell Reports* **15**, 67–79 (2020).
- Lane, A. *et al.* Engineering efficient retinal pigment epithelium differentiation from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med* **3**, 1295–1304 (2014).
- Langhans, S. A. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Frontiers in Pharmacology* **9**, (2018).
- Lavik, E. B., Klassen, H., Warfvinge, K., Langer, R. & Young, M. J. Fabrication of degradable polymer scaffolds to direct the integration and differentiation of retinal progenitors. *Biomaterials* **26**, 3187–3196 (2005).
- Lawrence, P. A. & Struhl, G. Morphogens, compartments, and pattern: lessons from drosophila? *Cell* **85**, 951–961 (1996).
- Leach, L. L. & Clegg, D. O. Concise Review: Making Stem Cells Retinal: Methods for Deriving Retinal Pigment Epithelium and Implications for Patients With Ocular Disease. *Stem Cells* **33**, 2363–2373 (2015).
- Lee, H.-S. *et al.* Dishevelled mediates ephrinB1 signalling in the eye field through the planar cell polarity pathway. *Nat Cell Biol* **8**, 55–63 (2006).
- Léveillard, T. *et al.* Identification and characterization of rod-derived cone viability factor. *Nat Genet* **36**, 755–759 (2004).
- Levine, E. M., Fuhrmann, S. & Reh, T. A. Soluble factors and the development of rod photoreceptors. *Cell Mol Life Sci* **57**, 224–234 (2000).

- Levine, E. M. & Green, E. S. Cell-intrinsic regulators of proliferation in vertebrate retinal progenitors. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 63–74 (2004).
- Li, G. *et al.* Generation and Characterization of Induced Pluripotent Stem Cells and Retinal Organoids From a Leber’s Congenital Amaurosis Patient With Novel RPE65 Mutations. *Front Mol Neurosci* **12**, 212 (2019).
- Li, H., Tierney, C., Wen, L., Wu, J. Y. & Rao, Y. A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the prechordal plate. *Development* **124**, 603–615 (1997).
- Li, S. *et al.* Foxn4 controls the genesis of amacrine and horizontal cells by retinal progenitors. *Neuron* **43**, 795–807 (2004).
- Li, W. *et al.* Rapid induction and long-term self-renewal of primitive neural precursors from human embryonic stem cells by small molecule inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 8299–8304 (2011).
- Li, Y. *et al.* Gene Therapy in Patient-specific Stem Cell Lines and a Preclinical Model of Retinitis Pigmentosa With Membrane Frizzled-related Protein Defects. *Mol Ther* **22**, 1688–1697 (2014).
- Liu, K. *et al.* DNA repair and replication links to pluripotency and differentiation capacity of pig iPS cells. *PLOS ONE* **12**, e0173047 (2017).
- Liu, Y. *et al.* Long-term safety of human retinal progenitor cell transplantation in retinitis pigmentosa patients. *Stem Cell Research & Therapy* **8**, 209 (2017).
- Livesey, F. J. & Cepko, C. L. Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nat Rev Neurosci* **2**, 109–118 (2001).
- Lock, L. T. & Tzanakakis, E. S. Expansion and differentiation of human embryonic stem cells to endoderm progeny in a microcarrier stirred-suspension culture. *Tissue Eng Part A* **15**, 2051–2063 (2009).
- Loh, Y.-H. *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* **113**, 5476–5479 (2009).
- Lombardini, J. B. Taurine: retinal function. *Brain Res Brain Res Rev* **16**, 151–169 (1991).
- Lu, Y. *et al.* Single-Cell Analysis of Human Retina Identifies Evolutionarily Conserved and Species-Specific Mechanisms Controlling Development. *Dev Cell* **53**, 473-491.e9 (2020).
- Ludwig, A. L. & Gamm, D. M. Outer Retinal Cell Replacement: Putting the Pieces Together. *Transl Vis Sci Technol* **10**, 15 (2021).
- Lukovic, D. *et al.* Human iPSC derived disease model of MERTK-associated retinitis pigmentosa. *Sci Rep* **5**, 12910 (2015).
- Lukovic, D. *et al.* Retinal Organoids derived from hiPSCs of an AIPL1-LCA Patient Maintain Cytoarchitecture despite Reduced levels of Mutant AIPL1. *Sci Rep* **10**, 5426 (2020).

Lukovic, D. *et al.* Generation of a human iPSC line from a patient with Leber congenital amaurosis caused by mutation in AIPL1. *Stem Cell Res* **33**, 151–155 (2018).

Luo, J. *et al.* Human Retinal Progenitor Cell Transplantation Preserves Vision. *J Biol Chem* **289**, 6362–6371 (2014).

M.

MacLaren, R. E. *et al.* Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature* **444**, 203–207 (2006).

Maherali, N. *et al.* A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **3**, 340–345 (2008).

Mandai, M. *et al.* Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med* **376**, 1038–1046 (2017).

Mansergh, F. C. *et al.* Loss of photoreceptor potential from retinal progenitor cell cultures, despite improvements in survival. *Exp Eye Res* **91**, 500–512 (2010).

Mao, X. *et al.* Single-Cell RNA Sequencing of hESC-Derived 3D Retinal Organoids Reveals Novel Genes Regulating RPC Commitment in Early Human Retinogenesis. *Stem Cell Reports* **13**, 747–760 (2019).

Marquardt, T. & Gruss, P. Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends Neurosci* **25**, 32–38 (2002).

Martins, R. A. P. & Pearson, R. A. Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. *Brain Res* **1192**, 37–60 (2008).

Maruotti, J. *et al.* Small-molecule-directed, efficient generation of retinal pigment epithelium from human pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 10950–10955 (2015).

Maruotti, J. *et al.* A simple and scalable process for the differentiation of retinal pigment epithelium from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med* **2**, 341–354 (2013).

Mata, N. L., Radu, R. A., Clemmons, R. C. & Travis, G. H. Isomerization and oxidation of vitamin a in cone-dominant retinas: a novel pathway for visual-pigment regeneration in daylight. *Neuron* **36**, 69–80 (2002).

Mathers, P. H., Grinberg, A., Mahon, K. A. & Jamrich, M. The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development. *Nature* **387**, 603–607 (1997).

Matsuoka, R. L. *et al.* Transmembrane semaphorin signalling controls laminar stratification in the mammalian retina. *Nature* **470**, 259–263 (2011).

- Mattar, P., Ericson, J., Blackshaw, S. & Cayouette, M. A conserved regulatory logic controls temporal identity in mouse neural progenitors. *Neuron* **85**, 497–504 (2015).
- Mattar, P., Stevanovic, M., Nad, I. & Cayouette, M. Casz1 controls higher-order nuclear organization in rod photoreceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**, E7987–E7996 (2018).
- McGee Sanftner, L. H., Abel, H., Hauswirth, W. W. & Flannery, J. G. Glial cell line derived neurotrophic factor delays photoreceptor degeneration in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther* **4**, 622–629 (2001).
- McLelland, B. T. *et al.* Transplanted hESC-Derived Retina Organoid Sheets Differentiate, Integrate, and Improve Visual Function in Retinal Degenerate Rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **59**, 2586–2603 (2018).
- Mears, A. J. *et al.* Nrl is required for rod photoreceptor development. *Nat Genet* **29**, 447–452 (2001).
- Megaw, R. *et al.* Gelsolin dysfunction causes photoreceptor loss in induced pluripotent cell and animal retinitis pigmentosa models. *Nat Commun* **8**, 271 (2017).
- Mellough, C. B., Sernagor, E., Moreno-Gimeno, I., Steel, D. H. W. & Lako, M. Efficient stage-specific differentiation of human pluripotent stem cells toward retinal photoreceptor cells. *Stem Cells* **30**, 673–686 (2012).
- Menachery, A., Qasaimeh, M. & Kumawat, N. Label-free microfluidic stem cell isolation technologies. *Trends in analytical chemistry* (2017).
- Menasché, P. *et al.* Towards a clinical use of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors: a translational experience. *Eur Heart J* **36**, 743–750 (2015).
- Menasché, P. *et al.* Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitors for Severe Ischemic Left Ventricular Dysfunction. *J Am Coll Cardiol* **71**, 429–438 (2018).
- 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).
- Meyer, J. S., Katz, M. L., Maruniak, J. A. & Kirk, M. D. Embryonic stem cell-derived neural progenitors incorporate into degenerating retina and enhance survival of host photoreceptors. *Stem Cells* **24**, 274–283 (2006).
- Meyer, J. S. *et al.* Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 16698–16703 (2009).
- Meyers, J. R. *et al.* β -catenin/Wnt signaling controls progenitor fate in the developing and regenerating zebrafish retina. *Neural Dev* **7**, 30 (2012).
- Milosevic, J., Storch, A. & Schwarz, J. Cryopreservation Does Not Affect Proliferation and Multipotency of Murine Neural Precursor Cells. *STEM CELLS* **23**, 681–688 (2005).

Moffat, B. A., Atchison, D. A. & Pope, J. M. Explanation of the Lens Paradox. *Optometry and Vision Science* **79**, 148–150 (2002).

Moon, S. Y. *et al.* Generation of two induced pluripotent stem cell lines from a retinitis pigmentosa patient with compound heterozygous mutations in CRB1. *Stem Cell Res* **54**, 102403 (2021).

Moore, K. B., Mood, K., Daar, I. O. & Moody, S. A. Morphogenetic movements underlying eye field formation require interactions between the FGF and ephrinB1 signaling pathways. *Dev Cell* **6**, 55–67 (2004).

Moshiri, A. & Reh, T. A. Persistent Progenitors at the Retinal Margin of *ptc*^{+/-} Mice. *J. Neurosci.* **24**, 229–237 (2004).

Mukhida, K. *et al.* Survival, differentiation, and migration of bioreactor-expanded human neural precursor cells in a model of Parkinson disease in rats. *Neurosurg Focus* **24**, E8 (2008).

Müller, F. *et al.* Direct action of the nodal-related signal cyclops in induction of sonic hedgehog in the ventral midline of the CNS. *Development* **127**, 3889–3897 (2000).

Murali, D. *et al.* Distinct developmental programs require different levels of Bmp signaling during mouse retinal development. *Development* **132**, 913–923 (2005).

Mustafi, D., Engel, A. H. & Palczewski, K. Structure of cone photoreceptors. *Prog Retin Eye Res* **28**, 289–302 (2009).

Mustafi, D., Kevany, B. M., Genoud, C., Bai, X. & Palczewski, K. Photoreceptor phagocytosis is mediated by phosphoinositide signaling. *FASEB J* **27**, 4585–4595 (2013).

N.

Nakagawa, S., Takada, S., Takada, R. & Takeichi, M. Identification of the laminar-inducing factor: Wnt-signal from the anterior rim induces correct laminar formation of the neural retina in vitro. *Dev Biol* **260**, 414–425 (2003).

Nakano, T. *et al.* Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell* **10**, 771–785 (2012).

Naylor, A., Hopkins, A., Hudson, N. & Campbell, M. Tight Junctions of the Outer Blood Retina Barrier. *Int J Mol Sci* **21**, E211 (2019).

Naylor, A., Hopkins, A., Hudson, N. & Campbell, M. Tight Junctions of the Outer Blood Retina Barrier. *Int J Mol Sci* **21**, E211 (2019).

Neeley, W. L. *et al.* A Microfabricated Scaffold for Retinal Progenitor Cell Grafting. *Biomaterials* **29**, 418–426 (2008).

Newman, A. M. & Cooper, J. B. Lab-specific gene expression signatures in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **7**, 258–262 (2010).

Nguyen, M. & Arnheiter, H. Signaling and transcriptional regulation in early mammalian eye development: a link between FGF and MITF. *Development* **127**, 3581–3591 (2000).

Niebruegge, S. *et al.* Generation of human embryonic stem cell-derived mesoderm and cardiac cells using size-specified aggregates in an oxygen-controlled bioreactor. *Biotechnol Bioeng* **102**, 493–507 (2009).

Nishida, A. *et al.* Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat Neurosci* **6**, 1255–1263 (2003).

Nishino, K. *et al.* DNA Methylation Dynamics in Human Induced Pluripotent Stem Cells over Time. *PLOS Genetics* **7**, e1002085 (2011).

Nistor, G., Seiler, M. J., Yan, F., Ferguson, D. & Keirstead, H. S. Three-dimensional early retinal progenitor 3D tissue constructs derived from human embryonic stem cells. *J Neurosci Methods* **190**, 63–70 (2010).

Ntai, A., La Spada, A., De Blasio, P. & Biunno, I. Trehalose to cryopreserve human pluripotent stem cells. *Stem Cell Research* **31**, 102–112 (2018).

O.

O'Brien, K. M. B., Schulte, D. & Hendrickson, A. E. Expression of photoreceptor-associated molecules during human fetal eye development. *Mol Vis* **9**, 401–409 (2003).

Ogilvie, J. M., Speck, J. D. & Lett, J. M. Growth factors in combination, but not individually, rescue rd mouse photoreceptors in organ culture. *Exp Neurol* **161**, 676–685 (2000).

Oh, E. C. T. *et al.* Rod differentiation factor NRL activates the expression of nuclear receptor NR2E3 to suppress the development of cone photoreceptors. *Brain Res* **1236**, 16–29 (2008).

Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**, 313–317 (2007).

Okita, K., Nagata, N. & Yamanaka, S. Immunogenicity of Induced Pluripotent Stem Cells. *Circulation Research* **109**, 720–721 (2011).

Oliver, G. *et al.* Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development* **121**, 4045–4055 (1995).

Oliver, G. *et al.* Homeobox genes and connective tissue patterning. *Development* **121**, 693–705 (1995).

Ornelas, I. M. & Ventura, A. L. M. Involvement of the PI3K/AKT pathway in ATP-induced proliferation of developing retinal cells in culture. *International Journal of Developmental Neuroscience* **28**, 503–511 (2010).

Osakada, F. *et al.* Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* **26**, 215–224 (2008).

Osakada, F. *et al.* In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction. *J Cell Sci* **122**, 3169–3179 (2009).

Ovando-Roche, P. *et al.* Use of bioreactors for culturing human retinal organoids improves photoreceptor yields. *Stem Cell Research & Therapy* **9**, 156 (2018).

P.

Parfitt, D. A. *et al.* Identification and Correction of Mechanisms Underlying Inherited Blindness in Human iPSC-Derived Optic Cups. *Cell Stem Cell* **18**, 769–781 (2016).

Park, I.-H. *et al.* Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* **451**, 141–146 (2008).

Pearson, R. A. *et al.* Restoration of vision after transplantation of photoreceptors. *Nature* **485**, 99–103 (2012).

Pearson, R. A., Dale, N., Llaudet, E. & Mobbs, P. ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron* **46**, 731–744 (2005).

Pegg, D. E. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol* **368**, 39–57 (2007).

Peng, G.-H., Ahmad, O., Ahmad, F., Liu, J. & Chen, S. The photoreceptor-specific nuclear receptor Nr2e3 interacts with Crx and exerts opposing effects on the transcription of rod versus cone genes. *Hum Mol Genet* **14**, 747–764 (2005).

Perron, M. & Harris, W. A. 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 (2000).

Perron, M., Kanekar, S., Vetter, M. L. & Harris, W. A. The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the *Xenopus* eye. *Dev Biol* **199**, 185–200 (1998).

Perron, M. *et al.* A novel function for Hedgehog signalling in retinal pigment epithelium differentiation. *Development* **130**, 1565–1577 (2003).

Phillips, M. J. *et al.* Blood-Derived Human iPSC Cells Generate Optic Vesicle-Like Structures with the Capacity to Form Retinal Laminae and Develop Synapses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**, 2007–2019 (2012).

Philp, N. J., Wang, D., Yoon, H. & Hjelmeland, L. M. Polarized expression of monocarboxylate transporters in human retinal pigment epithelium and ARPE-19 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 1716–1721 (2003).

Politi, L. E., Rotstein, N. P. & Carri, N. G. Effect of GDNF on Neuroblast Proliferation and Photoreceptor Survival: Additive Protection with Docosahexaenoic Acid. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **42**, 3008–3015 (2001).

Polo, J. M. *et al.* A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell* **151**, 1617–1632 (2012).

Polo, J. M. *et al.* Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* **28**, 848–855 (2010).

Prabhudesai, S. N., Cameron, D. A. & Stenkamp, D. L. Targeted effects of retinoic acid signaling upon photoreceptor development in zebrafish. *Dev Biol* **287**, 157–167 (2005).

Qian, X. *et al.* Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell* **165**, 1238–1254 (2016).

Q.

Qiu, G., Seiler, M. J., Arai, S., Aramant, R. B. & Sadda, S. R. Alternative culture conditions for isolation and expansion of retinal progenitor cells. *Curr Eye Res* **28**, 327–336 (2004).

Qiu, G. *et al.* Photoreceptor differentiation and integration of retinal progenitor cells transplanted into transgenic rats. *Exp Eye Res* **80**, 515–525 (2005).

Qiu, G. *et al.* Revisiting nestin expression in retinal progenitor cells in vitro and after transplantation in vivo. *Exp Eye Res* **84**, 1047–1059 (2007).

Quinn, P. M. *et al.* Human iPSC-Derived Retinas Recapitulate the Fetal CRB1 CRB2 Complex Formation and Demonstrate that Photoreceptors and Müller Glia Are Targets of AAV5. *Stem Cell Reports* **12**, 906–919 (2019).

R.

Ramos-Lopez, M. *et al.* Isolation and characterization of human retinal progenitor cells isolated from eyes with advanced retinopathy of prematurity. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **45**, 5186 (2004).

Ramsden, C. M. *et al.* Rescue of the MERTK phagocytic defect in a human iPSC disease model using translational read-through inducing drugs. *Sci Rep* **7**, 51 (2017).

Reese, B. E., Necessary, B. D., Tam, P. P., Faulkner-Jones, B. & Tan, S. S. Clonal expansion and cell dispersion in the developing mouse retina. *Eur J Neurosci* **11**, 2965–2978 (1999).

- Reh, T. A. & Kljavin, I. J. Age of differentiation determines rat retinal germinal cell phenotype: induction of differentiation by dissociation. *J Neurosci* **9**, 4179–4189 (1989).
- Reh, T. A. & Levine, E. M. Multipotential stem cells and progenitors in the vertebrate retina. *J Neurobiol* **36**, 206–220 (1998).
- 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).
- Reichman, S. *et al.* From confluent human iPS cells to self-forming neural retina and retinal pigmented epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 8518–8523 (2014).
- Ren, F., Yu, S., Chen, R., Lv, X. & Pan, C. Identification of a novel 12-bp insertion/deletion (indel) of iPS-related Oct4 gene and its association with reproductive traits in male piglets. *Anim Reprod Sci* **178**, 55–60 (2017).
- ReNeuron Limited. *First-in-human Phase I/IIa, Open-Label, Prospective Study of the Safety and Tolerability of Subretinally Transplanted Human Retinal Progenitor Cells (hRPC) in Patients With Retinitis Pigmentosa (RP)*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02464436> (2022).
- Ringuette, R. *et al.* Combinatorial hedgehog and mitogen signaling promotes the in vitro expansion but not retinal differentiation potential of retinal progenitor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **55**, 43–54 (2014).
- Roda, B. *et al.* Field-flow Fractionation in Bioanalysis: A Review of Recent Trends. *Analytica chimica acta* **635**, 132–43 (2009).
- Rodrigues, A. *et al.* Modeling PRPF31 retinitis pigmentosa using retinal pigment epithelium and organoids combined with gene augmentation rescue. *npj Regen Med* **7**, 1–22 (2022).
- Roessler, E. *et al.* Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet* **14**, 357–360 (1996).
- Rose, A. M., Luo, R., Radia, U. K. & Bhattacharya, S. S. Gene of the month: PRPF31. *J Clin Pathol* **70**, 729–732 (2017).
- Rothermel, A. & Layer, P. G. GDNF Regulates Chicken Rod Photoreceptor Development and Survival in Reaggregated Histotypic Retinal Spheres. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **44**, 2221–2228 (2003).
- Rothermel, A. *et al.* Spatial and temporal expression patterns of GDNF family receptor alpha4 in the developing chicken retina. *Gene Expr Patterns* **4**, 59–63 (2004).
- Rouhani, F. *et al.* Genetic Background Drives Transcriptional Variation in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *PLOS Genetics* **10**, e1004432 (2014).

Rowan, S., Chen, C.-M. A., Young, T. L., Fisher, D. E. & Cepko, C. L. Transdifferentiation of the retina into pigmented cells in ocular retardation mice defines a new function of the homeodomain gene Chx10. *Development* **131**, 5139–5152 (2004).

Rowe, R. G. & Daley, G. Q. Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Genet* **20**, 377–388 (2019).

S.

Sagner, A. *et al.* A shared transcriptional code orchestrates temporal patterning of the central nervous system. *PLoS Biology* **19**, e3001450 (2021).

Sahel, J.-A. *et al.* Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy. *Nat Med* **27**, 1223–1229 (2021).

Sakagami, K., Gan, L. & Yang, X.-J. Distinct Effects of Hedgehog Signaling on Neuronal Fate Specification and Cell Cycle Progression in the Embryonic Mouse Retina. *J Neurosci* **29**, 6932–6944 (2009).

Santos-Ferreira, T. F., Borsch, O. & Ader, M. Rebuilding the Missing Part-A Review on Photoreceptor Transplantation. *Front Syst Neurosci* **10**, 105 (2016).

Santos-Ferreira, T. *et al.* Stem Cell-Derived Photoreceptor Transplants Differentially Integrate Into Mouse Models of Cone-Rod Dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **57**, 3509–3520 (2016).

Santos-França, P. L., David, L. A., Kassem, F., Meng, X. Q. & Cayouette, M. Time to see: How temporal identity factors specify the developing mammalian retina. *Seminars in Cell & Developmental Biology* (2022) doi:[10.1016/j.semcdb.2022.06.003](https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.06.003).

Schulz-Key, S., Hofmann, H.-D., Beisenherz-Huss, C., Barbisch, C. & Kirsch, M. Ciliary neurotrophic factor as a transient negative regulator of rod development in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 3099–3108 (2002).

Schulz-Key, S., Hofmann, H.-D., Beisenherz-Huss, C., Barbisch, C. & Kirsch, M. Ciliary Neurotrophic Factor as a Transient Negative Regulator of Rod Development in Rat Retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **43**, 3099–3108 (2002).

Schwarz, M. *et al.* Spatial specification of mammalian eye territories by reciprocal transcriptional repression of Pax2 and Pax6. *Development* **127**, 4325–4334 (2000).

Schwarz, N. *et al.* Translational read-through of the RP2 Arg120stop mutation in patient iPSC-derived retinal pigment epithelium cells. *Hum Mol Genet* **24**, 972–986 (2015).

Schwarz, N. *et al.* Arl3 and RP2 regulate the trafficking of ciliary tip kinesins. *Hum Mol Genet* **26**, 2480–2492 (2017).

- Scruggs, B. A. *et al.* Optimizing Donor Cellular Dissociation and Subretinal Injection Parameters for Stem Cell-Based Treatments. *STEM CELLS Translational Medicine* **8**, 797–809 (2019).
- Scruggs, B. A. *et al.* Optimizing Donor Cellular Dissociation and Subretinal Injection Parameters for Stem Cell-Based Treatments. *Stem Cells Transl Med* **8**, 797–809 (2019).
- Seiler, M. J. & Aramant, R. B. Cell replacement and visual restoration by retinal sheet transplants. *Prog Retin Eye Res* **31**, 661–687 (2012).
- Semo, M. *et al.* Efficacy and Safety of Human Retinal Progenitor Cells. *Translational Vision Science & Technology* **5**, 6 (2016).
- Sharma, A. *et al.* Clinical features and burden of new onset diabetic foot ulcers post simultaneous pancreas kidney transplantation and kidney only transplantation. *Journal of Diabetes and its Complications* **33**, 662–667 (2019).
- Sharma, R. *et al.* Clinical-grade stem cell-derived retinal pigment epithelium patch rescues retinal degeneration in rodents and pigs. *Sci Transl Med* **11**, eaat5580 (2019).
- Sharma, T. P. *et al.* Patient-specific induced pluripotent stem cells to evaluate the pathophysiology of TRNT1-associated Retinitis pigmentosa. *Stem Cell Res* **21**, 58–70 (2017).
- Shiau, F., Ruzycski, P. A. & Clark, B. S. A single-cell guide to retinal development: Cell fate decisions of multipotent retinal progenitors in scRNA-seq. *Dev Biol* **478**, 41–58 (2021).
- Shintani, K., Shechtman, D. L. & Gurwood, A. S. Review and update: current treatment trends for patients with retinitis pigmentosa. *Optometry* **80**, 384–401 (2009).
- Shirai, H. *et al.* Transplantation of human embryonic stem cell-derived retinal tissue in two primate models of retinal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, E81–E90 (2016).
- Sholl-Franco, A., Fragel-Madeira, L., Macama, A. da C. C., Linden, R. & Ventura, A. L. M. ATP controls cell cycle and induces proliferation in the mouse developing retina. *International Journal of Developmental Neuroscience* **28**, 63–73 (2010).
- Simeone, A. *et al.* A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J* **12**, 2735–2747 (1993).
- Singh, M. S. *et al.* Reversal of end-stage retinal degeneration and restoration of visual function by photoreceptor transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 1101–1106 (2013).
- Singh, M. S. *et al.* Retinal stem cell transplantation: Balancing safety and potential. *Prog Retin Eye Res* **75**, 100779 (2020).
- Singh, R. K. *et al.* Characterization of Three-Dimensional Retinal Tissue Derived from Human Embryonic Stem Cells in Adherent Monolayer Cultures. *Stem Cells Dev* **24**, 2778–2795 (2015).

- Singh, R. *et al.* iPS cell modeling of Best disease: insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration. *Hum Mol Genet* **22**, 593–607 (2013).
- 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**, 7858796 (2019).
- 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**, 7858796 (2019).
- Spence, J. R. *et al.* The hedgehog pathway is a modulator of retina regeneration. *Development* **131**, 4607–4621 (2004).
- Sridhar, A. *et al.* Single-Cell Transcriptomic Comparison of Human Fetal Retina, hPSC-Derived Retinal Organoids, and Long-Term Retinal Cultures. *Cell Rep* **30**, 1644-1659.e4 (2020).
- Sridhar, A., Steward, M. M. & Meyer, J. S. Nonxenogeneic growth and retinal differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med* **2**, 255–264 (2013).
- Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D. T. & Hochedlinger, K. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* **2**, 230–240 (2008).
- Stevens, L. C. Experimental production of testicular teratomas in mice*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **52**, 654–661 (1964).
- Stiles, N. R. B., Patel, V. R. & Weiland, J. D. Multisensory perception in Argus II retinal prosthesis patients: Leveraging auditory-visual mappings to enhance prosthesis outcomes. *Vision Res* **182**, 58–68 (2021).
- Strauss, O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* **85**, 845–881 (2005).
- Sugita, S. Role of ocular pigment epithelial cells in immune privilege. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **57**, 263–268 (2009).
- Sung, C.-H. & Chuang, J.-Z. The cell biology of vision. *J Cell Biol* **190**, 953–963 (2010).
- Svendsen, C. N. Back to the future: how human induced pluripotent stem cells will transform regenerative medicine. *Hum Mol Genet* **22**, R32–R38 (2013).
- Swaroop, A., Kim, D. & Forrest, D. Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci* **11**, 563–576 (2010).
- Swinney, D. C. & Anthony, J. How were new medicines discovered? *Nat Rev Drug Discov* **10**, 507–519 (2011).

T.

Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).

Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).

Takahashi, K. & Yamanaka, S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 183–193 (2016).

Tang, X. *et al.* Using inducible lentiviral vectors to generate induced pluripotent stem cell line ZOCi001-A from peripheral blood cells of a patient with CRB1^{-/-} retinitis pigmentosa. *Stem Cell Res* **45**, 101817 (2020).

Tao, W. *et al.* Encapsulated cell-based delivery of CNTF reduces photoreceptor degeneration in animal models of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 3292–3298 (2002).

Tcheng, M., Oliver, L., Courtois, Y. & Jeanny, J. C. Effects of exogenous FGFs on growth, differentiation, and survival of chick neural retina cells. *Exp Cell Res* **212**, 30–35 (1994).

Tétreault, N., Champagne, M.-P. & Bernier, G. The LIM homeobox transcription factor Lhx2 is required to specify the retina field and synergistically cooperates with Pax6 for Six6 trans-activation. *Dev Biol* **327**, 541–550 (2009).

Thanos, C. & Emerich, D. Delivery of neurotrophic factors and therapeutic proteins for retinal diseases. *Expert Opin Biol Ther* **5**, 1443–1452 (2005).

Thomson, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147 (1998).

Tomita, T. *et al.* Effects of hematocrit value on microparticle enzyme immunoassay of tacrolimus concentration in therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* **27**, 94–97 (2005).

Too, L. K. *et al.* SURGICAL RETINAL EXPLANTS AS A SOURCE OF RETINAL PROGENITOR CELLS. *Retina* **41**, 1986–1993 (2021).

Tran, K. D. & Doe, C. Q. Pdm and Castor close successive temporal identity windows in the NB3-1 lineage. *Development* **135**, 3491–3499 (2008).

Traverso, V., Kinkl, N., Grimm, L., Sahel, J. & Hicks, D. Basic Fibroblast and Epidermal Growth Factors Stimulate Survival in Adult Porcine Photoreceptor Cell Cultures. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **44**, 4550–4558 (2003).

Tropepe, V. *et al.* Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* **287**, 2032–2036 (2000).

Trounson, A. & DeWitt, N. D. Pluripotent stem cells progressing to the clinic. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 194–200 (2016).

Tsang, S. H., Aycinena, A. R. P. & Sharma, T. Ciliopathy: Usher Syndrome. *Adv Exp Med Biol* **1085**, 167–170 (2018).

Tu, H.-Y. *et al.* Medium- to long-term survival and functional examination of human iPSC-derived retinas in rat and primate models of retinal degeneration. *EBioMedicine* **39**, 562–574 (2019).

Tucker, B. A. *et al.* Patient-specific iPSC-derived photoreceptor precursor cells as a means to investigate retinitis pigmentosa. *Elife* **2**, e00824 (2013).

Tucker, B. A. *et al.* The use of progenitor cell/biodegradable MMP2-PLGA polymer constructs to enhance cellular integration and retinal repopulation. *Biomaterials* **31**, 9–19 (2010).

Tucker, B. A. *et al.* Exome sequencing and analysis of induced pluripotent stem cells identify the cilia-related gene male germ cell-associated kinase (MAK) as a cause of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, E569-576 (2011).

Turner, D. L. & Cepko, C. L. A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* **328**, 131–136 (1987).

Turner, D. L., Snyder, E. Y. & Cepko, C. L. Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron* **4**, 833–845 (1990).

V.

Van Camp, J. K., Beckers, S., Zegers, D. & Van Hul, W. Wnt signaling and the control of human stem cell fate. *Stem Cell Rev Rep* **10**, 207–229 (2014).

Verbakel, S. K. *et al.* Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res* **66**, 157–186 (2018).

Vergara, M. N. *et al.* Three-dimensional automated reporter quantification (3D-ARQ) technology enables quantitative screening in retinal organoids. *Development* **144**, 3698–3705 (2017).

Völkner, M. *et al.* Retinal Organoids from Pluripotent Stem Cells Efficiently Recapitulate Retinogenesis. *Stem Cell Reports* **6**, 525–538 (2016).

Vugler, A. *et al.* Elucidating the phenomenon of HESC-derived RPE: anatomy of cell genesis, expansion and retinal transplantation. *Exp Neurol* **214**, 347–361 (2008).

W.

Wahlin, K. J. *et al.* Photoreceptor Outer Segment-like Structures in Long-Term 3D Retinas from Human Pluripotent Stem Cells. *Sci Rep* **7**, 766 (2017).

Wall, D. S. *et al.* Progenitor cell proliferation in the retina is dependent on Notch-independent Sonic hedgehog/Hes1 activity. *J Cell Biol* **184**, 101–112 (2009).

Wallace, V. A. Proliferative and cell fate effects of Hedgehog signaling in the vertebrate retina. *Brain Res* **1192**, 61–75 (2008).

Wang, T. *et al.* The histone demethylases Jhdm1a/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner. *Cell Stem Cell* **9**, 575–587 (2011).

Wang, Y., Dakubo, G. D., Thurig, S., Mazerolle, C. J. & Wallace, V. A. Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog locally controls proliferation and the timing of RGC development in the embryonic mouse retina. *Development* **132**, 5103–5113 (2005).

Warfvinge, K. *et al.* Retinal progenitor cell xenografts to the pig retina: morphologic integration and cytochemical differentiation. *Arch Ophthalmol* **123**, 1385–1393 (2005).

Wässle, H. Parallel processing in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci* **5**, 747–757 (2004).

West, E. L. *et al.* Antioxidant and lipid supplementation improve the development of photoreceptor outer segments in pluripotent stem cell-derived retinal organoids. *Stem Cell Reports* **17**, 775–788 (2022).

Westenskow, P., Piccolo, S. & Fuhrmann, S. Beta-catenin controls differentiation of the retinal pigment epithelium in the mouse optic cup by regulating *Mitf* and *Otx2* expression. *Development* **136**, 2505–2510 (2009).

Westenskow, P., Piccolo, S. & Fuhrmann, S. Beta-catenin controls differentiation of the retinal pigment epithelium in the mouse optic cup by regulating *Mitf* and *Otx2* expression. *Development* **136**, 2505–2510 (2009).

Wetts, R. & Fraser, S. E. Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina. *Science* **239**, 1142–1145 (1988).

Wetts, R., Serbedzija, G. N. & Fraser, S. E. Cell lineage analysis reveals multipotent precursors in the ciliary margin of the frog retina. *Dev Biol* **136**, 254–263 (1989).

Wright, L. S. *et al.* VSX2 and ASCL1 Are Indicators of Neurogenic Competence in Human Retinal Progenitor Cultures. *PLOS ONE* **10**, e0135830 (2015).

Wu, F. *et al.* *Onecut1* is essential for horizontal cell genesis and retinal integrity. *J Neurosci* **33**, 13053–13065, 13065a (2013).

Xiang, M. Intrinsic control of mammalian retinogenesis. *Cell Mol Life Sci* **70**, 2519–2532 (2013).

X.

Xie, H. Q. & Adler, R. Green cone opsin and rhodopsin regulation by CNTF and staurosporine in cultured chick photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 4317–4323 (2000).

Y.

Yamamoto, S. *et al.* Topical Isopropyl Unoprostone for Retinitis Pigmentosa: Microperimetric Results of the Phase 2 Clinical Study. *Ophthalmol Ther* **1**, 5 (2012).

Yanai, A. *et al.* Differentiation of human embryonic stem cells using size-controlled embryoid bodies and negative cell selection in the production of photoreceptor precursor cells. *Tissue Eng Part C Methods* **19**, 755–764 (2013).

Yang, P., Seiler, M. J., Aramant, R. B. & Whittemore, S. R. Differential lineage restriction of rat retinal progenitor cells in vitro and in vivo. *J Neurosci Res* **69**, 466–476 (2002).

Yang, P., Seiler, M. J., Aramant, R. B. & Whittemore, S. R. In Vitro Isolation and Expansion of Human Retinal Progenitor Cells. *Experimental Neurology* **177**, 326–331 (2002).

Yang, X.-J. Roles of cell-extrinsic growth factors in vertebrate eye pattern formation and retinogenesis. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 91–103 (2004).

Yirme, G., Amit, M., Laevsky, I., Osenberg, S. & Itskovitz-Eldor, J. Establishing a dynamic process for the formation, propagation, and differentiation of human embryoid bodies. *Stem Cells Dev* **17**, 1227–1241 (2008).

Yoshida, T. *et al.* The use of induced pluripotent stem cells to reveal pathogenic gene mutations and explore treatments for retinitis pigmentosa. *Molecular Brain* **7**, 45 (2014).

Young, R. W. Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat Rec* **212**, 199–205 (1985).

Yu, J. *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917–1920 (2007).

Yun, S. *et al.* Lhx2 links the intrinsic and extrinsic factors that control optic cup formation. *Development* **136**, 3895–3906 (2009).

Z.

Zaghloul, N. A., Yan, B. & Moody, S. A. Step-wise specification of retinal stem cells during normal embryogenesis. *Biol Cell* **97**, 321–337 (2005).

Zagozewski, J. L., Zhang, Q., Pinto, V. I., Wigle, J. T. & Eisenstat, D. D. The role of homeobox genes in retinal development and disease. *Dev Biol* **393**, 195–208 (2014).

Zahabi, A. *et al.* 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 (2012).

Zhao, S. *et al.* Patterning the optic neuroepithelium by FGF signaling and Ras activation. *Development* **128**, 5051–5060 (2001).

Zhong, X. *et al.* Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs. *Nat Commun* **5**, 4047 (2014).

Zhou, P.-Y., Peng, G.-H., Xu, H. & Yin, Z. Q. c-Kit⁺ cells isolated from human fetal retinas represent a new population of retinal progenitor cells. *J Cell Sci* **128**, 2169–2178 (2015).

Zhu, D. *et al.* Polarized secretion of PEDF from human embryonic stem cell-derived RPE promotes retinal progenitor cell survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**, 1573–1585 (2011).

Zrenner, E. *et al.* Can subretinal microphotodiodes successfully replace degenerated photoreceptors? *Vision Res* **39**, 2555–2567 (1999).

Zrenner, E. *et al.* Subretinal electronic chips allow blind patients to read letters and combine them to words. *Proc Biol Sci* **278**, 1489–1497 (2011).

Zuber, M. E., Gestri, G., Viczian, A. S., Barsacchi, G. & Harris, W. A. Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development* **130**, 5155–5167 (2003).

Zygar, C. A., Colbert, S., Yang, D. & Fernald, R. D. IGF-1 produced by cone photoreceptors regulates rod progenitor proliferation in the teleost retina. *Developmental Brain Research* **154**, 91–100 (2005).

Génération de progéniteurs rétiniens à partir de cellules iPS humaines pour la compréhension et le traitement des dystrophies rétiniennes

Les rétinoopathies pigmentaires (RP) sont des maladies héréditaires de la rétine, caractérisées par la mort des neurones photosensibles, les photorécepteurs. Cet ensemble de maladies dégénératives représente la principale cause de cécité d'origine héréditaire dans les pays industrialisés (30.000 personnes atteintes en France). L'objectif de notre équipe est de développer des thérapies innovantes utilisant les cellules souches pluripotentes humaines pour le traitement de ces maladies. Dans ce contexte, la reprogrammation des cellules somatiques en cellules souches induites à la pluripotence (iPS) offre un large panel d'applications en médecine régénérative, de la transplantation cellulaire à la modélisation des pathologies en passant par le criblage à haut débit. En 2014, l'équipe a développé un protocole simple de production d'organoïdes rétiniens à partir de cellules iPS humaines adhérentes. Composés initialement de cellules progénitrices de la rétine (RPCs), ces organoïdes cultivés en suspension sont capables de générer tous les types cellulaires d'une rétine adulte humaine. Les progéniteurs peuvent se différencier en précurseurs des photorécepteurs, la population la plus appropriée pour le remplacement des photorécepteurs par des approches de transplantation mais également en photorécepteurs plus matures pouvant être utilisés pour la modélisation des RP et la recherche de nouveaux composés neuroprotecteurs. Ces approches nécessitent un grand nombre de cellules et le caractère post-mitotique des précurseurs des photorécepteurs limite leur production à grande échelle. Pour répondre à ces besoins, nous proposons d'utiliser des RPCs mitotiques et multipotents isolés à partir d'organoïdes rétiniens. Au cours de la thèse, nous avons développé une approche permettant l'isolation des RPCs et le développement d'une nouvelle condition de culture permettant leur amplification et cryopréservation tout en maintenant leur caractère multipotent après plusieurs passages (4 passages). Cette propriété a été confirmée par une analyse transcriptomique a été confirmé par une analyse transcriptomique des RPCs avec une expression optimale de gènes spécifiques des RPCs au moins jusqu'au passage 4. Ces analyses ont également montré l'intérêt de cette lignée de RPCs pour la recherche de nouveaux gènes impliqués dans les maladies dégénératives de la rétine. Nous avons également établi différentes conditions de culture qui permettent de produire un très grand nombre (jusqu'à 90% en deux semaines) de précurseurs de photorécepteurs sans aucune étape de purification et d'engager ces précurseurs dans la voie des photorécepteurs à bâtonnet, le type cellulaire initialement touché dans la rétinite pigmentaire, nécessaire à l'identification de futurs composés neuroprotecteurs. Des tests de cryopréservation de ces précurseurs ont démontré leur capacité à être banqués, simplifiant leur utilisation pour de futures applications cliniques. Ainsi, ces RPCs dérivées de cellules iPS humaines dans nos conditions pourraient constituer une nouvelle source de cellules pour la thérapie cellulaire ou la découverte de médicaments et pourraient être un outil pertinent pour mieux comprendre les dystrophies rétiniennes dans un contexte humain.

Mots clés : Cellules iPS, Rétinite pigmentaire, Progéniteurs rétiniens, Organoïdes rétiniens

Generation of retinal progenitor cells from human iPS cells for the understanding and treatment of inherited retinal dystrophies

Inherited retinal degenerations represent a large group of diseases characterized by the death of photoreceptors, a specialized type of neuron that capture light. These degenerative diseases are known as the leading the cause of hereditary blindness in industrialized countries (30,000 people affected in France). The goal of our team is to develop innovative approaches for therapies using human pluripotent stem cells. According to that, the reprogramming of somatic cells into induced pluripotent stem cells (iPS) offers a wide range of applications in regenerative medicine, from cell transplantation to disease modelling and high throughput screening of new therapeutic molecules. In 2014, our team has developed a simple protocol for the production of retinal organoids derived from adherent human iPS cells. Initially composed of retinal progenitor cells (RPCs), these organoids cultured in suspension are capable to generate all the cell types of an adult human retina. RPCs can be differentiated into photoreceptor precursors, which represent the most appropriate population for photoreceptors replacement in transplantation approaches, but also into more mature photoreceptors that can be used for pharmacological screening tests and retinitis pigmentosa modeling. However, these approaches are cell-intensive and the post-mitotic nature of photoreceptor precursors limits their large-scale production. To meet these needs, we proposed the use of mitotic and multipotent retinal progenitor cells isolated from early ROs. Thus, during the thesis, we developed simple methods and media for the generation, expansion and cryopreservation of human induced pluripotent stem cell derived-RPCs, while keeping their mitotic and multipotent properties after several passages (4 passages). The multipotency property has been confirmed by transcriptomic analysis (RNA-sequencing) indicating that the RPCs key genes expression was preserved and by their differentiation into all retinal cell types. Transcriptomic analyses have also shown the interest of this cell line for discovery of new genes involved in retinal degenerative diseases. In order to produce large quantities of photoreceptor precursors, we have also established culture conditions that allow the production of cultures enriched (up to 90% in 2 weeks) in photoreceptor precursors without any purification step and culture conditions that allow them to be committed into rod photoreceptor pathway, the cell type initially affected in retinitis pigmentosa, necessary for the potential identification of neuroprotective compounds. Finally, cryopreservation assays of photoreceptor precursors have demonstrated their ability to be banked simplifying their use for future clinical applications. Thus, these RPCs derived from human iPS cells under our conditions could constitute a new source of cells for cell-based therapies or drug discovery and could be a relevant tool to better understand retinal dystrophies in a human context.

Keywords : iPS cells, Retinitis pigmentosa, Retinal progenitor cells, Retinal organoids