



HAL
open science

Utilisation des cellules souches pluripotentes humaines pour la reconstruction d'une retine par bioingenierie dans le but de traiter des pathologies degeneratives retiniennes

Elise Herardot

► To cite this version:

Elise Herardot. Utilisation des cellules souches pluripotentes humaines pour la reconstruction d'une retine par bioingenierie dans le but de traiter des pathologies degeneratives retiniennes. Neurobiologie. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASQ037 . tel-04427873

HAL Id: tel-04427873

<https://theses.hal.science/tel-04427873>

Submitted on 31 Jan 2024

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.

Utilisation des cellules souches pluripotentes
humaines pour la reconstruction d'une rétine
par bioingénierie dans le but de traiter des
pathologies dégénératives rétinienne.

*Use of human pluripotent stem cells for the reconstruction of a bioengineered
retinal tissue to treat retinal degenerative diseases.*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569, Innovation thérapeutique, du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : Immunologie
Graduate School : Santé et médicaments. Référent : Université d'Évry Val d'Essonne

Thèse préparée dans l'unité de recherche Inserm UMR 861, I-Stem, sous la direction du
Pr. Christelle MONVILLE et du Dr. Karim BEN M'BAREK.

Thèse soutenue à Corbeil-Essonnes, le 13 septembre 2023, par

Elise HERARDOT

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Kenneth MOYA Dr, CNRS collège de France CIRB, Paris	Président du jury
Vasiliki KALATZIS Dr, Institut des Neurosciences de Montpellier	Rapporteuse & Examinatrice
Frédéric MASCARELLI Dr, Centre de recherche des cordeliers, Paris	Rapporteur & Examinateur
Patrick PLA Pr, Institut NeuroPSI - UMR9197, Sacalay	Examinateur
Alexandra REBSAM Dr, Institut de la vision, Paris	Examinatrice

Titre : Utilisation des cellules souches pluripotentes humaines pour la reconstruction d'une rétine par bioingénierie dans le but de traiter des pathologies dégénératives rétinienne.

Mots clés : médecine régénérative, photorécepteurs, Epithélium Pigmenté Rétinien , microscope à force atomique, cellules souches pluripotentes humaines, maladies dégénératives de la rétine

Résumé : Les maladies dégénératives de la rétine telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et les rétinites pigmentaires (RPs) ont pour conséquence la dysfonction et/ou la dégénérescence des photorécepteurs et de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR). La perte de ces cellules est irréversible et peut entraîner à terme la cécité. La médecine régénérative est une stratégie thérapeutique en développement qui vise à remplacer les cellules de la rétine qui ont dégénéré par de nouvelles produites *in vitro*. Au cours de ma thèse, j'ai développé et optimisé une approche de thérapie cellulaire complexe de la rétine.

J'ai ainsi produit et caractérisé dans un premier temps des cellules de l'EPR à partir de cellules souches pluripotentes humaines (CSPHs). J'ai en particulier décrit les propriétés biomécaniques de ces cellules.

Ces propriétés mécaniques sont liées à des fonctions épithéliales essentielles pour l'EPR et peuvent être des indicateurs précoces de stress sub-létaux. Dans un second temps, j'ai produit des photorécepteurs à partir de ces CSPHs. Enfin, dans un troisième temps, j'ai assemblé ces différents types cellulaires de la rétine pour reformer une partie de la rétine qui dégénère *in vitro*. Afin de faciliter l'organisation particulière des photorécepteurs, j'ai utilisé une membrane microstructurée contenant des micro-puits sur laquelle j'aiensemencé les photorécepteurs.

Ces travaux permettent d'envisager l'évaluation dans le futur, du potentiel thérapeutique de cet assemblage de rétine *in vitro* sur des modèles animaux où les photorécepteurs ont déjà dégénéré.

Title : Use of human pluripotent stem cells for the reconstruction of a bioengineered retinal tissue to treat retinal degenerative diseases.

Keywords : regenerative medicine, photoreceptors, retinal pigment epithelium, Retinal degenerative disease, human pluripotent stem cell, atomic force microscopy

Abstract : Degenerative retinal diseases such as age-related macular degeneration (AMD) and retinitis pigmentosa (RP) result in dysfunction and/or degeneration of photoreceptors and retinal pigment epithelial (RPE) cells. The loss of these cells is irreversible and can eventually lead to blindness. Regenerative medicine is a therapeutic strategy aiming to replace degenerated retinal cells with newly produced cells generated *in vitro*.

During my thesis, I developed and optimized a complex retinal cell therapy approach. First, I produced and characterized RPE cells derived from human pluripotent stem cells (hPSCs). In particular, I described biomechanical properties of these cells.

These mechanical properties are related to essential epithelial functions of the RPE and can serve as early indicators of sub lethal stress.

Then, I generated photoreceptors from these hPSCs. Finally, I assembled these different retinal cell types to reconstruct part of the retina *in vitro*. To facilitate the specific organization of photoreceptors, I used a microstructured membrane with micro-wells onto which I seeded the photoreceptors.

Future work will allow to evaluate the therapeutic potential of this bioengineered retinal tissue in animal models with retinal degeneration.

L'œil ne voit que ce que l'esprit est prêt à comprendre.

- Henri Bergson

Remerciements

Je souhaite, premièrement, remercier l'ensemble des membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Un grand merci à mes deux rapporteurs, Dr Vasiliki Kalatzis et Dr Frédéric Mascarelli pour leur temps de lecture et de corrections de mon manuscrit. Merci également au Dr Alexandra Rebsam et au Pr Patrick Pla pour m'avoir conseillée au cours de mes deux comités de thèse et de terminer avec moi cette aventure en la qualité d'examineur. Merci aussi au Dr Kenneth Moya pour avoir accepté de participer à l'évaluation de mon travail comme examinateur.

Je tiens sincèrement à adresser un grand remerciement à Karim Ben M'Barek et à Christelle Monville en tant que directeurs de thèse pour m'avoir permis la réalisation cette thèse. Encore merci pour votre aide, vos conseils et votre soutien.

Je voudrais également remercier toutes les personnes de I-Stem, et plus particulièrement le Dr Marc Peschanski et le Dr Cécile Martinat pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire. Merci à tous les membres de l'équipe rétinopathie : Camille, Elie, Walter et Alexandra. J'ai vraiment adoré travailler à leurs côtés, surtout en culture dans le secteur 2. Merci également aux autres membres du laboratoire : Lucille, Louise, Sabrina, Adeline, Manon, Marion, Margot, Noémie, Judith, Quentin et Morgan pour toutes ces pauses déjeuners riches en conversations. Merci beaucoup à mes collaborateurs, Frédéric et Natacha pour la production des membranes au C2N. Merci à Amélie de l'institut de la vision, pour sa bonne humeur et pour m'avoir enseigné la culture des organoïdes de rétine. Merci aussi à mes collaborateurs du Lambe : Clément, Maxime et Guillaume pour ce joli travail avec l'AFM.

Merci à mes amis : Simon, Nada, Ronan, Hélène, Morgane, Maroussia. Merci à mon ami Valentin, pour ces 5 années d'études passées à étudier à ses côtés, et surtout pour ce master passé en Suède à Umeå ! Merci aussi à mes amies de toujours : Emilie, Camille et Raphaëlle. C'est pour moi un honneur d'évoluer à leurs côtés malgré les années qui passent.

Merci à ma famille pour son amour et son soutien. Merci à ma sœur et à ma maman de prendre soin de mes quatre chevaux en mon absence. Merci à mon père pour m'avoir transmis cette passion, surtout celle des percherons, et de m'avoir toujours permis d'avoir ces magnifiques animaux dans ses prés. Merci à ma grand-mère pour les relectures de ma thèse mais aussi pour avoir toujours cru en moi.

Merci à mon fiancé, Sébastien, pour son soutien infaillible, pour sa passion partagée des voyages autour du monde. Sans lui, cette aventure de thèse aurait été beaucoup plus difficile. Notre plus belle aventure est notre mariage prévu pour l'année prochaine.

Et pour finir, je souhaite remercier mon fils, né en même temps que cette thèse, dont le prénom signifie lumière, Lucien. Même si tu n'es pas encore en âge de comprendre parce que tu n'es même pas plus âgé qu'un organoïde de rétine, merci de m'avoir donné conscience de cette force m'anime.

I. Table des matières

I.	Introduction.....	13
1	Structure de l'œil et fonction de la rétine.....	13
a.	Morphologie de l'œil	13
b.	Généralités sur les différentes structures de la rétine	14
c.	Les photorécepteurs.....	15
d.	L'épithélium pigmentaire rétinien.....	18
e.	Le cycle visuel.....	20
f.	Transmission de l'information visuelle.....	24
2	Les maladies dégénératives de la rétine.....	26
a.	La dégénérescence maculaire liée à l'âge.....	26
b.	Les maladies héréditaires dégénératives de la rétine	28
c.	Remodelage rétinien suite à la dégénérescence rétinienne.....	31
d.	Les pistes thérapeutiques actuelles.....	34
3	La thérapie cellulaire	42
a.	Les sources des matériaux biologiques utilisés	42
b.	Les cellules souches pluripotentes humaines.....	43
4	Génération de photorécepteurs et de cellules de l'EPR à partir des CSPhis ou des CSEhs.....	46
a.	Embryologie de l'œil et de la rétine.....	46
b.	Différenciation des CSPhis en EPR <i>in vitro</i>	51
c.	Production de photorécepteurs <i>in vitro</i>	56
5	Transplantation sous-rétinienne.....	62
a.	Les modèles animaux modélisant les maladies rétinienne.....	62
b.	Stratégies de transplantations.....	63
6	Membranes biocompatibles.....	69
a.	Les biomatériaux utilisés pour la transplantation de l'EPR.....	69
b.	Les biomatériaux utilisés pour la maturation des photorécepteurs en vue d'une transplantation	72
7	Les essais cliniques de thérapie cellulaire.....	76
a.	Les stratégies d'immunosuppression	76
b.	Les essais cliniques ciblant l'EPR.....	78
c.	Les essais cliniques visant à restaurer les photorécepteurs.....	80
II.	Objectifs	83

III.	Résultats	85
1	Caractérisation biomécanique des cellules de l'EPR en utilisant un microscope à force atomique	85
a.	Introduction	85
b.	Publication scientifique	86
c.	Discussion.....	123
2	Développement d'un protocole de différenciation pour obtenir des photorécepteurs à partir de CSPhs.....	126
a.	Introduction	126
b.	Matériels et Méthodes.....	127
c.	Résultats.....	130
d.	Discussion.....	142
3	Mise au point d'un tissu rétinien par bio-ingénierie favorisant la maturation et l'intégration des photorécepteurs.....	145
a.	Introduction	145
b.	Matériels et méthodes.....	146
c.	Résultats.....	150
d.	Discussion.....	157
IV.	Discussion générale	161
1	Les contrôles qualité dans le cadre de la transplantation rétinienne	161
2	La différenciation pure des types cellulaires de la rétine reste un challenge	163
3	Vers une production industrielle des cellules rétinienne.....	165
4	Optimisation des membranes microstructurées	166
5	La bioimpression : une autre piste pour la médecine régénérative	169
6	Vers la preuve de concept de fonctionnalité <i>in vivo</i>	170
V.	Conclusion générale.....	172
VI.	Bibliographie	174
VII.	Annexes	199
1	Annexe n°1	199
2	Annexe n°2	224
3	Annexe n°3.....	241
4	Annexe n°4.....	270

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de l'anatomie de l'œil humain.

Figure 2 : Représentation des différentes couches de cellules composant la rétine neurale et l'EPR.

Figure 3 : Schéma représentant les morphologies respectives des cônes et des bâtonnets.

Figure 4 : Représentation de l'organisation d'une rétine humaine.

Figure 5 : Synthèse des fonctions de l'épithélium pigmentaire rétinien.

Figure 6 : Le mécanisme de la phototransduction.

Figure 7 : Schéma récapitulant le cycle visuel des rétinoïdes permettant de régénérer la RHODOPSINE des bâtonnets.

Figure 8 : Représentation de la voie visuelle principale en coupe axiale passant par les noyaux géniculés.

Figure 9 : Fond de l'œil d'un patient affecté par une rétinite pigmentaire, aux différents stades : précoce, intermédiaire et tardif.

Figure 10 : Représentation schématique de la progression des maladies génétiques affectant la rétine. Ici est illustrée en exemple une rétinite pigmentaire autosomale dominante.

Figure 11 : Les phases du remodelage rétinien.

Figure 12 : Les différentes stratégies thérapeutiques à adopter en fonction des stades de remodelage rétinien.

Figure 13 : Embryologie de l'œil et de la rétine.

Figure 14 : Réseau des facteurs de transcription établissant le champ visuel ou « Eye field » chez la souris.

Figure 15 : Apparition séquentielle des cellules rétinienne composant la rétine neurale chez différentes espèces.

Figure 16 : Les réseaux de gènes impliqués dans le développement des photorécepteurs.

Figure 17 : Séquence développementale depuis le stade blastocyste menant à la différenciation terminale des photorécepteurs et de l'EPR.

Figure 18 : Principaux protocoles permettant la différenciation des photorécepteurs à partir de CSPhs.

Figure 19 : Résultats de l'analyse combinatoire par RT-qPCR des facteurs influant sur la différenciation rétinienne.

Figure 20 : Résultats des RT-qPCR montrant l'expression de *VSX2* dans les différentes conditions testées au cours du temps par rapport à celles des CSEhs.

Figure 21 : La heat map montrant les résultats des RT-qPCR de l'analyse combinatoire.

Figure 22 : Analyse EnrichR. A. Diagramme en barres montrant le « combined score ranking » des gènes de la rétine pour chacune des conditions séquencées ainsi que pour les cellules provenant d'organoïdes de rétine.

Figure 23 : Analyse des marqueurs d'expression des progéniteurs rétiniens obtenus après 3 semaines de différenciation à partir de CSEhs RC9 dans la condition 2%KSR IGF-1.

Figure 24 : Progéniteurs rétiniens obtenus après 3 semaines de différenciation à partir de CSPhs dans la condition 2%KSR IGF-1.

Figure 25 : Protocole différenciation des photorécepteurs en 2D sous forme de cultures adhérentes à partir de CSPhs.

Figure 26 : Optimisation du protocole de différenciation pour obtenir des photorécepteurs immatures à 7 semaines de différenciation.

Figure 27 : Protocole de différenciation permettant d'obtenir des organoïdes de rétine après 120 jours de différenciation.

Figure 28 : Processus de création des membranes microstructurées.

Figure 29 : Formation des organoïdes de rétine au cours du temps.

Figure 30 : Les différents motifs des pores des membranes microstructurées obtenus.

Figure 31 : La méthode expérimentale menant à la construction du tissu rétinien complexe.

Figure 32 : Analyse du marqueur protéique RECOVERINE sur la rétine reconstruite *in vitro*.

Figure 33 : Maturation des photorécepteurs à l'intérieur des différentes membranes microstructurées.

Figure 34 : Occupation cellulaire des pores des différentes membranes microstructurées.

Figure 35 : Expression protéique de la RECOVERINE au sein du motif tripode. A. Vue sur le dessus d'un motif tripode d'une membrane microstructurée.

Figure 36 : Evolution de la membrane microstructurée idéale au cours du temps.

Liste des tables

Table 1 : Tableau récapitulatif des essais cliniques actuels pour la thérapie génique rétinienne.

Table 2 : Liste des protocoles utilisés pour générer des cellules de l'EPR à partir de CSPhs.

Table 3 : Tableau récapitulatif des biomatériaux utilisés pour la culture d'EPR.

Table 4 : Tableau récapitulatif des biomatériaux utilisés pour la maturation des photorécepteurs.

Table 5 : Récapitulatif des essais cliniques visant à restaurer l'EPR.

Table 6 : Liste des amorces utilisées en RT-qPCR.

Table 7 : Les molécules choisies dans l'analyse combinatoire jusqu'à 3 semaines de différenciation.

Table 8 : Liste des cytokines pouvant être impliquées dans la différenciation terminale des photorécepteurs.

Table 9 : Les avantages et les inconvénients des différentes membranes microstructurées élaborées.

Liste des abréviations

A

AAV : virus adéno-associés

AFM : microscope à force atomique

AR : acide rétinoïque

AREDS : Age-related Eye Disease Study

B

BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau

BMP : bone morphogenic protein

B2M : Beta-2 Microglobulin

C

CCG : couche des cellules ganglionnaires

CFH : complement factor H

CNE : couche nucléaire externe

CMH : complexe majeur histocompatibilité

CNG : specific nucleotide-gate ion

CNI : couche nucléaire interne

CNTF : facteur neurotrophique ciliaire

CPE : couche plexiforme externe

CPI : couche plexiforme interne

CPR : cellules progénitrices rétiniennes

CRALBP1 : Cellular retinaldehyde binding Protein 1

CRBP1 : Cellular Retinol Binding Protein 1

CSEhs : cellules souches embryonnaires humaines

CSM : cellules souches mésenchymateuses

CSN : cellules souches neurales

CSPhis : cellules souches pluripotentes humaines induites

D

DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge

E

EFTF : Eye Field Transcription factor

EPR : épithélium pigmentaire rétinien

ERG : électrorétinogramme

ERO : espèces réactives à l'oxygène

F

FGF : fibroblast growth factor

G

GDNF : facteur neurotrophique dérivé de la glie

GMP : Good Manufacturing Practices

GMPc : Guanosine-3'-5'-monophosphate cyclique

I

IA : Intelligence artificielle

IGF-1 : Insuline-like Growth Factor 1

IRBP : interphotoreceptor retinol binding protein

L

LRAT : Lecithin rétinol acyltransférase

M

MCI : masse cellulaire interne

N

NEAA : acides aminés non-essentiels

NRL : Neural leucine zipper

O

OCT : Optic coherence tomography
(Tomographie à cohérence optique)

P

GFAP : protéine acide fibrillaire gliale

PCL : poly(caprolactone)

PDE : phosphodiesterase

PDMS : polydimethylsiloxane

PEDF : Pigment Epithelium-Derived Factor

PGS : poly(glycerol-sebacate)

PLGA : poly(lactic-co-glycolic acid)

PLLA : poly(L-lactic acid)

PPV: pars plana vitrectomie

PTMC : poly(trimethylene) carbonate

R

RCS : rat Royal College of Surgeons

RdCVF : rod-derived cone viability factor

RDH8 : rétinol désydrégénase 8

R : rhodopsine

R* : métarhodopsine II

RDH5 : rétinol désydrégénase 5

RDH11 : rétinol désydrégénase 11

RP : rétinite pigmentaire

S

SHH : sonic hedgehog

T

TEER : Trans Epithelial Electrical Résistance

TEM : transition épithélio-
mésenchymateuse

TGF- β : Transforming growth factor β

Thr β 2 : récepteur de l'hormone
tyroïdienne

V

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

1, 2, 3

2D : 2-dimensions

3D : 3-dimensions

I. Introduction

1 Structure de l'œil et fonction de la rétine

a. Morphologie de l'œil

L'évolution nous a dotés d'un système très perfectionné pour appréhender le monde, les yeux (**Figure 1**). La vision nous permet de nous mouvoir dans l'espace et d'interagir avec notre environnement. L'œil est l'organe de la vision permettant de convertir l'intensité lumineuse en des influx nerveux compréhensibles par le cerveau. L'œil est constitué de plusieurs parties distinctes : la cornée, l'iris, la pupille, le cristallin, l'humeur vitrée et la rétine (Behar-Cohen et al. 2020).

La cornée est une membrane courbée et transparente permettant la transmission de la lumière du cristallin à la rétine. Elle sert aussi à la protection de l'œil des dommages physiques, des rayons UV et des agressions pathogènes. L'iris, située derrière la cornée, est un diaphragme coloré, unique à chaque personne entourant la pupille. La pupille, quant à elle, est localisée au centre de l'iris, elle permet aux rayons lumineux de passer pour atteindre la rétine. Situé à l'arrière de l'iris et de la pupille, le cristallin agit comme une lentille souple, transparente, permettant l'accommodation et l'orientation des rayons lumineux vers la rétine. L'adaptation de sa courbure et de la forme de ses structures réfractives permet, grâce au muscle ciliaire, de concentrer la lumière sur la rétine. L'accommodation permet la mise au point d'une image nette en fonction de la distance de l'objet. Derrière le cristallin, une large substance visqueuse et transparente participe au maintien de la pression intraoculaire, il s'agit de l'humeur vitrée. Derrière celle-ci apparaît la rétine, elle tapisse la surface interne du globe oculaire (**Figure 2**) (Kels, Grzybowski, et Grant-Kels 2015).

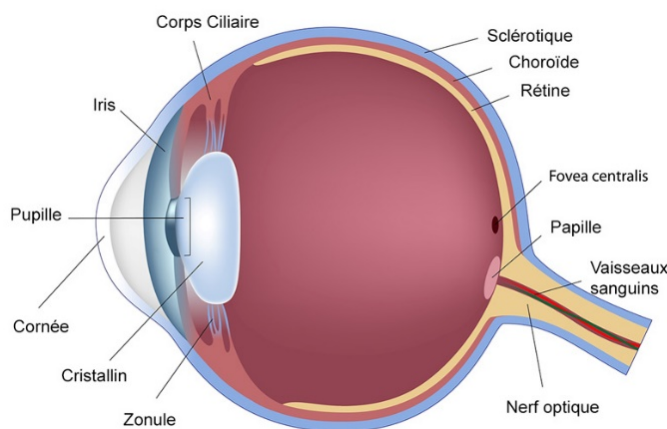


Figure 1 : Schéma de l'anatomie de l'œil humain (extrait de <http://www.haute-vision.fr/glossaire/>).

La lumière, constituée de photons, va tout d'abord pénétrer dans l'œil par la cornée, puis l'iris. Celle-ci va réguler le flux lumineux entrant dans l'œil en ajustant le diamètre de la pupille en fonction de l'intensité lumineuse. Ainsi, à une intensité lumineuse forte, la pupille aura un petit diamètre, elle sera en myosis et en basse intensité lumineuse, la pupille sera dilatée, en mydriase, pour permettre à plus de lumière de rentrer dans celle-ci, elle permet une adaptation optimale à l'intensité lumineuse extérieure. Puis, la lumière traverse le cristallin, une lentille transparente biconvexe qui, permettra de faire converger les rayons lumineux et de les concentrer sur la rétine. En passant ensuite par l'humeur vitrée, les photons atteindront la rétine neurale et plus précisément les photorécepteurs. Ceux-ci vont

convertir le signal lumineux en des influx électriques qui vont être intégrés par les autres neurones de la rétine (cellules bipolaires, amacrines, horizontales et ganglionnaires) avant d'être envoyés aux structures cérébrales centrales afin d'être traités par cortex visuel (Rigaudière 2012). Les photons doivent traverser tout le globe optique, mais aussi toutes les couches de la rétine avant de pouvoir atteindre les photorécepteurs. Le sens de propagation de la lumière au sein de la rétine est ainsi contraire au sens de propagation du signal électrophysiologique (Kels et al. 2015).

b. Généralités sur les différentes structures de la rétine

Chez les vertébrés, la rétine s'organise de manière pluristratifiée, elle est composée de deux parties distinctes : la rétine neurale et l'épithélium pigmentaire rétinien (J B Jonas et al. 1992; Purves et al. 2001).

La rétine neurale est organisée en trois couches consécutives contenant les corps cellulaires des neurones. Ces trois couches sont, de la plus proximale à la plus distale, la couche des cellules ganglionnaires (CCG), la couche nucléaire interne (CNI) et la couche nucléaire externe (CNE) séparées respectivement par les couches plexiformes interne (CPI) et externe (CPE). La CCG est la couche la plus antérieure par rapport au globe oculaire (**Figure 2**). Les cellules ganglionnaires transmettent les signaux électriques des cellules bipolaires et amacrines au cerveau par le thalamus. Les principales zones de projection des cellules ganglionnaires sont le noyau géniculé latéral (aire visuelle du thalamus), et le colliculus supérieur (J B Jonas et al. 1992; Purves et al. 2001).

Les connexions entre les cellules ganglionnaires, amacrines et bipolaires se font au niveau des CPI. La couche intermédiaire, la CNI, est constituée par les corps cellulaires des cellules bipolaires, amacrines, horizontales ainsi que des cellules gliales de Müller. Le rôle des cellules bipolaires est d'intégrer et de transmettre le signal électrique des photorécepteurs aux cellules ganglionnaires. Les cellules bipolaires se diversifient en fonction de leurs morphologies et de leurs connexions synaptiques aux photorécepteurs, et à leurs manières de se polariser en réponse à la lumière (Bloomfield et Dacheux 2001; Snellman et al. 2008). Les cellules bipolaires qui répondent à la lumière en s'hyperpolarisant sont dites « OFF » et celles qui répondent à la lumière en se dépolarisant sont dites « ON » (Euler et al. 2014).

Les cellules amacrines permettent de moduler les signaux électriques en jouant le rôle d'interneurones. Il existe également plus de 30 types de cellules amacrines connues, en fonction de leurs morphologies, de leurs localisations, et des neurotransmetteurs qu'elles sécrètent (GABA/glycine), mais aussi en fonction de leurs marqueurs moléculaires (Laboissonniere et al. 2019). Elles ont la capacité de s'adapter à l'intensité lumineuse extérieure, et ainsi de moduler le signal électrique des cellules bipolaires et ganglionnaires (Cherry et al. 2009; Koontz et al. 1993). L'autre type d'interneurones sont les cellules horizontales, elles servent à moduler le signal électrique entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires. Elles sont de deux types, en fonction de leurs jonctions avec les photorécepteurs. Les cellules horizontales de type « H1 » reçoivent un signal électrique des bâtonnets et des cônes de type L- et M-, tandis que les cellules horizontales « H2 » reçoivent un fort signal électrique des cônes S et un plus faible sur les cônes de type L- et M- (Dacey et al. 1996).

Egalement localisées dans la CNI, les cellules gliales de Müller ont des fonctions un peu plus variées que les autres cellules de la rétine. Elles jouent un rôle de support métabolique des cellules rétiniennes permettant de contrôler l'homéostasie rétinienne, facilitant le transport de l'eau et des ions à l'aide d'un réseau glial présent dans toutes les couches de la rétine (Reichenbach et Bringmann 2013).

La CPE est caractérisée par les synapses entre les cellules bipolaires, horizontales et les photorécepteurs. La CNE contient les corps cellulaires des photorécepteurs, sa partie la plus distale, celle des segments externes des photorécepteurs, est directement en contact avec l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) (Reichenbach et Bringmann 2013) (**Figure 2**).

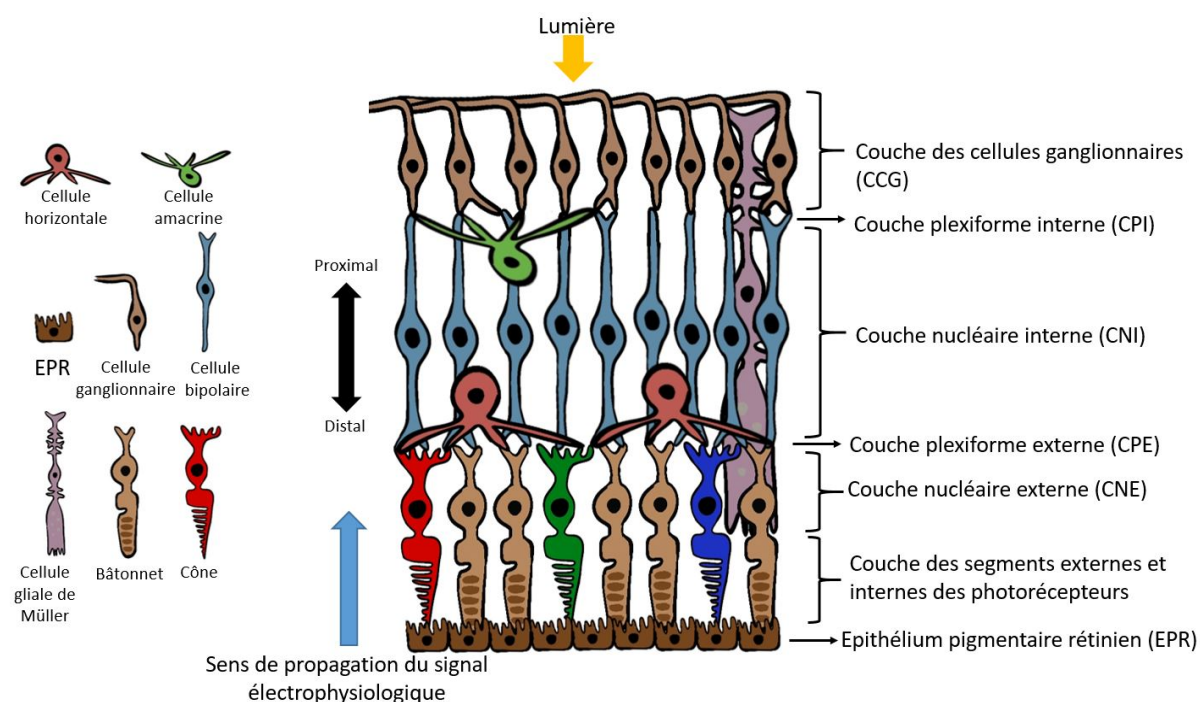


Figure 2 : Représentation des différentes couches de cellules composant la rétine neurale et l'EPR.

c. Les photorécepteurs

Les photorécepteurs sont constitués d'un segment externe en interaction avec l'EPR, d'un segment interne, d'un corps cellulaire et d'une terminaison synaptique. En effet, les photorécepteurs forment des synapses avec les cellules bipolaires et horizontales ; et des jonctions gap avec les autres photorécepteurs (cônes et bâtonnets confondus) (Ishibashi et al. 2022) (**Figure 3**).

Les deux types de photorécepteurs sont les cônes (détection des couleurs) et les bâtonnets (détection des variations d'intensité lumineuse). La proportion cônes/bâtonnets dans la rétine varie en fonction des espèces. Ainsi, chez l'homme adulte, les bâtonnets sont 20 fois plus nombreux que les cônes, ce qui représente environ 4,6 millions de cônes et 92 millions de bâtonnets (Koontz et al. 1993).

Les différents types de photorécepteurs sont au nombre de quatre chez l'homme : les bâtonnets et les cônes S, M et L. Les cônes opsine L peuvent absorber des longueurs d'onde de maximum 560 nm (rouge), L pour longueur d'onde longue. Les cônes opsine M, peuvent absorber des longueurs d'onde

maximale de 530 nm (vert), M pour longueur d'onde moyenne. Les cônes opsine S peuvent, quant à eux, absorber des longueurs d'onde de maximum 420 nm (bleu), S pour longueur d'onde « short », petite en anglais (Cherry et al. 2009). La présence de ces trois photopigments permet une vision de type trichromatique.

La rétine humaine s'organise en différentes régions (**Figure 4**) qui sont la fovéola, la fovéa, la macula, le pôle postérieur et la rétine périphérique. Les régions les plus centrales de la rétine (la fovéola, la fovéa et la macula) contiennent une forte densité en cônes. La fovéola contient seulement des cônes –M et –L (Viets, Eldred, et Johnston 2016). Les cônes –S, absents dans la fovéola, sont présents dans la fovéa et la macula avec les cônes –M et –L. Les cônes L sont deux fois plus nombreux que les cônes M dans la fovéa, ils se distribuent aléatoirement les uns par rapport aux autres. Les cônes S correspondent à 10% de la totalité des cônes. Les bâtonnets sont présents avec les cônes dans la macula. Enfin, la rétine périphérique contient majoritairement des bâtonnets et les cônes y sont plus dispersés (Cherry et al. 2009; Fitzgibbon et al. 1994; Viets et al. 2016).

La fovéa est une petite dépression existant au centre de la macula. Elle est induite par l'absence de vascularisation, il s'agit du seul endroit de la rétine où celle-ci n'est pas organisée en trois niveaux, mais seulement composée d'un seul étage rétinien. La densité de cônes dans la fovéa et la fovéola est d'environ 10 000, sur une surface très restreinte, d'environ 0,1mm² (Curcio et Hendrickson 1991). En l'absence des autres structures de la rétine, la lumière atteignant cette région ne subit donc aucune diffusion, ce qui favorise la vision des détails par les cônes (Salesse 2017).

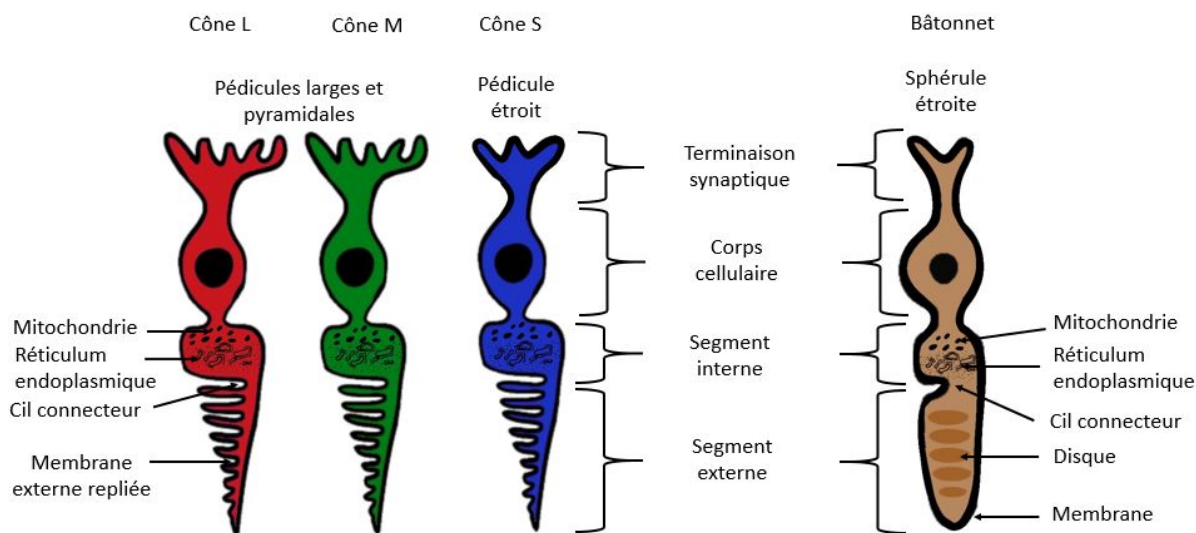


Figure 3 : Schéma représentant les morphologies respectives des cônes et des bâtonnets. Les photorécepteurs comportent un segment interne, un segment externe, un corps cellulaire et une terminaison synaptique. Le segment externe d'un bâtonnet est constitué d'un empilement de disques entourés d'une membrane plasmique tandis que le segment externe d'un cône se caractérise par le repliement de sa membrane plasmique. Les bâtonnets sont caractérisés par un plus grand segment externe que les cônes.

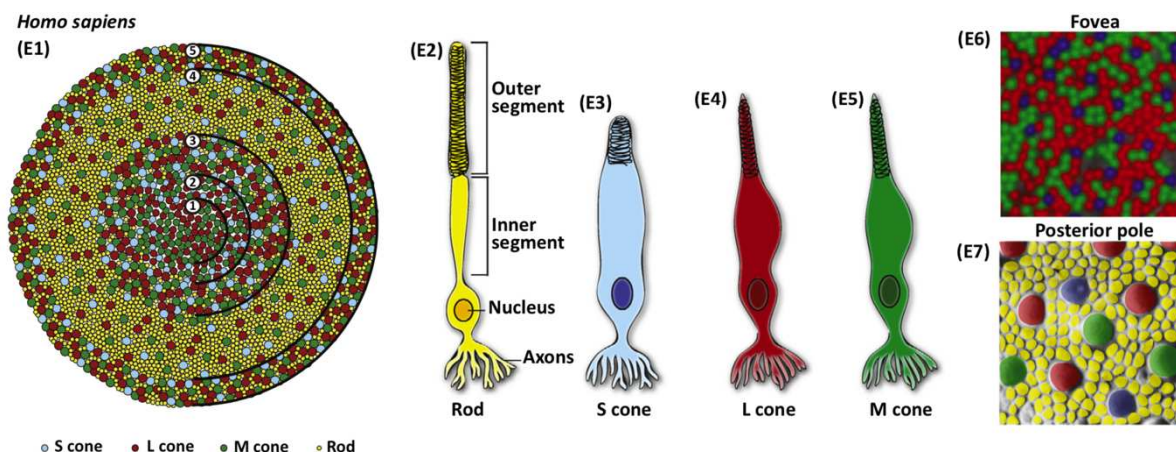


Figure 4 : Représentation de l'organisation d'une rétine humaine (image non à l'échelle) avec 1 : la fovéola, 2 : la fovéa, 3 : la macula, 4 : le pôle postérieur et 5 : le bord périphérique (Viets et al. 2016) .

Le segment externe des cônes se compose d'une seule membrane qui le sépare du milieu extracellulaire rétinien (**Figure 3**). Sur un côté de cette membrane, des plis sont présents sur lesquels se trouvent les photopigments opsine S, M ou L, en relation directe avec le milieu extracellulaire (Fu et Yau 2007). Le diamètre du segment externe des cônes varie en fonction de sa position sur la rétine. Les cônes présents dans la fovéa et dans la fovéola sont plus petits que ceux localisés dans la macula et dans la rétine périphérique. Si le cône est situé vers la fovéa, son diamètre est d'environ $1,5 \mu\text{m}$, alors que s'il est situé en périphérie de la rétine, son diamètre est de $6 \mu\text{m}$ en moyenne. La longueur des cônes varie elle aussi également, en fonction de leur position sur la rétine, elle est de $80 \mu\text{m}$ au niveau de la fovéa et de $20 \mu\text{m}$ en périphérie de la rétine (Sharpe et Stockman 1999). Les cônes sont reliés à des cellules bipolaires ON et OFF qui leur sont dédiées (Whitaker et al. 2021).

Les bâtonnets présentent un segment externe de forme cylindrique délimité par une membrane permettant de séparer le milieu intercellulaire du milieu extracellulaire (**Figure 3**). Les segments externes des bâtonnets ont une forme plus allongée que ceux des cônes. A l'intérieur de chaque segment externe des bâtonnets, se trouve un empilement de 700 à 1 100 disques contenant le pigment visuel, la Rhodopsine, servant à l'absorption de la lumière. La membrane de chaque disque est complètement dissociable de la membrane externe. La Rhodopsine est présente en très grande concentration dans chacun des disques des bâtonnets (soit environ $10,4 \times 10^7$ Rhodopsines pour un seul bâtonnet) (Young 1971). Un bâtonnet possède un segment externe d'en moyenne $1 \mu\text{m}$ de diamètre vers la fovéa et de $2,5 \mu\text{m}$ de diamètre en périphérie de la rétine. Chez l'homme sa longueur est d'environ $30 \mu\text{m}$. Les bâtonnets sont uniquement reliés aux cellules bipolaires dédiées ON (Whitaker et al. 2021).

A l'obscurité, les photorécepteurs vont relarguer continuellement du glutamate au niveau de leurs terminaisons axonales, cela va inhiber en réponse les cellules bipolaires ON (en les hyperpolarisant), et exciter les cellules bipolaires OFF (en les dépolarisant) (Euler et al. 2014). A l'opposé, à la lumière, lorsque les photons interagissent avec le segment externe des photorécepteurs, une cascade de

réactions va réduire la libération de glutamate, ce qui va modifier le signal transmis aux cellules bipolaires (Bloomfield et Dacheux 2001; Hack, Peichl, et Brandstätter 1999). Les cellules bipolaires ON vont se dépolariiser tandis que les cellules bipolaires OFF vont s'hyperpolariser (Euler et al. 2014).

d. L'épithélium pigmentaire rétinien

L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) est un épithélium composé d'une couche cellulaire monostratifiée et pigmentée, composée de cellules de forme hexagonale caractérisées par la présence de mélanine. L'EPR possède des jonctions serrées établies grâce à des protéines transmembranaires induisant une polarité apico-basale. L'EPR est localisé entre les photorécepteurs de la rétine neurale et la membrane de Bruch (Rigaudière 2012). La membrane de Bruch est localisée entre l'EPR et les choriocapillaires. L'EPR permet des échanges de métabolites et de nutriments essentiels depuis le sang et la rétine ; les produits de dégradation de la rétine passent dans le sens opposé (Edwards et Luty 2021).

L'EPR possède de nombreuses fonctions citées ci-dessous (**Figure 5**) :

- Le recyclage des pigments impliqués dans le cycle visuel
- La sécrétion de molécules essentielles impliquées dans la survie et le maintien des photorécepteurs et de la choroïde
- La phagocytose des segments externes des photorécepteurs
- La protection contre la photo-oxydation
- L'apport et l'évacuation de métabolites de la rétine neurale

L'interaction entre la rétine neurale et l'EPR est essentielle au bon fonctionnement des photorécepteurs. Le segment externe des photorécepteurs vient se loger entre les extensions apicales de l'EPR, nommées microvillosités, formant une interface morphologique et fonctionnelle. L'EPR a deux types de microvillosités, des longues et fines, mesurant 5 à 7 μm ; et d'autres plus courtes et épaisses. Les plus longues microvillosités servent à atteindre le segment des cônes qui est plus court que celui des bâtonnets. Les microvillosités les plus courtes sont principalement en contact avec le segment externe des bâtonnets (Boulton et Dayhaw-Barker 2001). Cette interaction permet de maintenir l'intégrité des photorécepteurs et de l'EPR en recyclant le 11-cis rétinol impliqué dans le cycle visuel. Le cycle visuel et l'action de l'EPR dans cette fonction sont détaillés plus loin dans cette thèse.

Le maintien de l'activité rétinienne s'effectue également par l'évacuation de certains déchets produits par les photorécepteurs, grâce au processus de phagocytose (Kevany et Palczewski 2010). Ce processus a toujours lieu sur la face apicale de l'EPR. A cause de leur exposition à la lumière, les photorécepteurs produisent une accumulation de substances toxiques, surtout des dommages photo-oxydatifs, pouvant induire le dysfonctionnement de ces derniers si elles ne sont pas éliminées. Afin de maintenir leur excitabilité, les photorécepteurs ont un processus de renouvellement constant de leur segment externe (Bok 1993). La fabrication d'un nouveau segment externe s'effectue à la base du segment externe. Les segments externes des photorécepteurs contenant le plus de radicaux et de protéines endommagés sont phagocytés par l'EPR. Cependant, l'intégrité des photorécepteurs est

conservée à l'aide de l'EPR, qui après internalisation des segments externes usagés, délivre des molécules essentielles (comme l'acide docosahexaénoïque et le rétinol) permettant la reconstruction de ces derniers (Bibb et Young 1974; Bok 1993). Une dizaine de jours est nécessaire pour permettre le renouvellement complet du segment externe des photorécepteurs (Strauss 2005).

Du fait de sa fonction et de sa localisation, la rétine est le seul tissu neural directement exposé à la lumière. Cette situation favorise la photo-oxydation des lipides devenant très toxiques pour les cellules rétinienne (Girotti et Kriska 2004). De plus, la rétine est un tissu consommant énormément d'oxygène (Eshaq, Wright, et Harris 2014). Ces conditions induisent la génération d'espèces réactives à l'oxygène (ERO), dont des radicaux libres, le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène singulet. L'EPR agit comme un élément essentiel pour contre balancer ce stress oxydatif existant dans la rétine. La première ligne de défense est la mélanine, elle permet d'absorber les photons non captés par les pigments visuels (Strauss 2005). L'absence ou la réduction significative de mélanine chez certains sujets, a pour conséquence des problèmes de photophobie et d'acuité visuelle réduite en raison d'une trop forte dispersion de la lumière dans leurs yeux (Kamaraj et Purohit 2014). Les pigments de mélanine sont contenus dans les mélanosomes, ils se situent sur la face apicale de l'EPR (Rózanowski et al. 2008). La seconde ligne de défense de l'EPR est faite d'antioxydants comme les superoxydes dismutases et les catalases (Frank, Amin, et Puklin 1999).

L'EPR a aussi un rôle de transport épithélial, grâce à sa polarité entre la rétine neurale et la choroïde vascularisée, l'EPR doit transporter les nutriments essentiels, de l'eau, et des ions depuis la choroïde richement vascularisée vers les photorécepteurs. Il forme un des composants de la barrière hémato rétinienne (Strauss 2005). Les nutriments essentiels délivrés par l'EPR aux photorécepteurs sont le glucose, le rétinol, la vitamine A, l'acide ascorbique, des acides gras (docosahexaénoïque) (Simó et al. 2010). Pour transporter le glucose, l'EPR possède des transporteurs actifs de glucose (GLUT1 et GLUT3), largement exprimés sur sa surface apicale et basale (Rizzolo 2008).

La rétine présente également d'importants échanges aqueux du corps vitré vers la rétine, essentiels pour maintenir une pression intraoculaire constante. Une grande quantité d'eau s'accumule dans la rétine pour maintenir cette pression. Elle est aussi due en partie à l'importante activité métabolique des photorécepteurs. L'eau résiduelle de la rétine neurale va être éliminée en traversant la rétine neurale pour aller à l'EPR grâce aux cellules gliales de Müller. Puis l'EPR va transporter l'eau vers la choroïde via le canal spécifique Aquaporine-1 (Stamer et al. 2003). Le transport des ions et de l'eau est couplé et s'effectue à l'aide des pompes $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ localisées sur la membrane apicale de l'EPR (Marmorstein 2001). Cet échange d'eau et d'ions permet la mise en place de la différence de potentiel transépithéliale, mais aussi d'instaurer une certaine pression permettant l'adhésion de la rétine neurale au fond du globe oculaire. L'EPR possède aussi des canaux et des transporteurs nécessaires à l'évacuation de produits métaboliques générés par les photorécepteurs dans l'espace sous-rétinien comme l'acide lactique et les déchets des segments externes des photorécepteurs (Philp et al. 2003; Vohra et Kolko 2020).

D'autres échanges sont également connus pour maintenir l'intégrité de la rétine, car l'EPR secrète une grande variété de facteurs de croissance, d'interleukines et de molécules de signalisations essentielles pour la survie des photorécepteurs mais aussi pour maintenir l'intégrité des structures avoisinantes. L'EPR sécrète de manière constante et régulée le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) au niveau

de sa face basale. Son rôle est d'induire l'angiogenèse. Le Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) est au contraire libéré sur la face apicale. Son rôle est de promouvoir la survie cellulaire et la prolifération. Plusieurs autres facteurs, tous importants, comme le Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) et le Transforming growth factor β (TGF- β) sont également connus pour être sécrétés par l'EPR (Dawson et al. 1999; Pagan-Mercado et Becerra 2019).

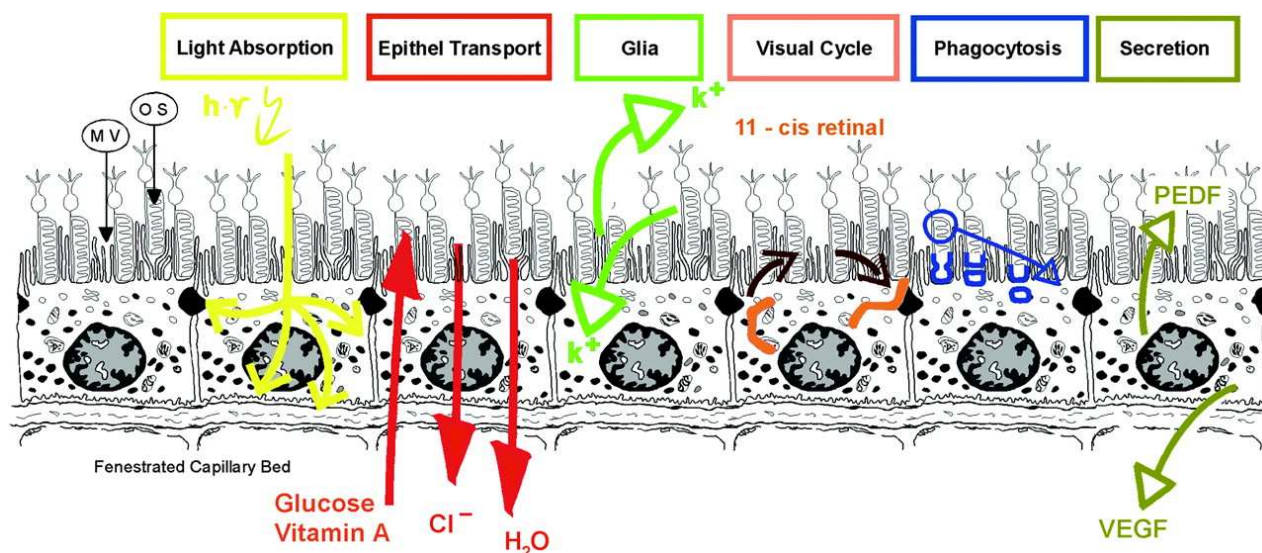


Figure 5 : Synthèse des fonctions de l'épithélium pigmentaire rétinien (Strauss 2005; Strauß 2016).

L'EPR a été très largement décrit dans différentes études scientifiques à cause de son implication dans les dégénérescences rétinienne. Cependant, en dépit des grandes connaissances biologiques relatives à l'EPR, les propriétés bio-physiques et bio-mécaniques de l'épithélium (comme son élasticité) restent largement méconnues.

e. Le cycle visuel

1. Activation de la phototransduction visuelle

La phototransduction visuelle s'effectue au niveau des segments externes des photorécepteurs, il s'agit de la conversion d'un photon en un signal électrique. Il est à noter que les mécanismes biochimiques impliqués dans ce processus sont presque les mêmes pour les cônes et les bâtonnets. Ce mécanisme de phototransduction s'articule en deux voies biochimiques. Une voie implique une partie protéique localisée dans la membrane cellulaire et dans les disques membranaires des cônes et des bâtonnets. La seconde résulte de l'isomérisation d'un chromophore (11-cis-rétinal), dérivé de la vitamine A, sensible à la lumière (Tsin, Betts-Obregon, et Grigsby 2018).

A l'obscurité, le photorécepteur a un potentiel membranaire de -40mV. Ce potentiel de membrane est dû à un courant sodique, d'ions Na^+ rentrant dans le segment externe du photorécepteur. Les canaux sodium de la membrane plasmique sont maintenus ouverts à l'obscurité grâce à l'activité de la Guanosine-3'-5'-monophosphate cyclique (GMPc). Le segment externe des photorécepteurs

contient des disques empilés les uns sur les autres, formés de membranes dans lesquels se trouvent diverses protéines (dont la Transducine, la Phosphodiesterase (PDE), mais surtout la Rhodopsine pour les bâtonnets et les Opsine pour les cônes. Dans les bâtonnets la cascade menant à la phototransduction est initiée par l'absorption d'un ou plusieurs photons. Les photons sont absorbés par le chromophore (Imbert 1988). Ce processus induit l'isomérisation du 11-cis rétinale en all-trans-rétinal (Tsin et al. 2018). L'absorption de photons induira également un changement conformationnel de la Rhodopsine en la Metarhodopsine II qui deviendra catalytiquement active (Kukura et al. 2005). La Metarhodopsine II va reconnaître, activer et lier la Transducine. La Transducine est composée de trois sous unités différentes ($G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$). L'activation de la transducine entraîne la transformation du GDP en GTP, par la sous unité $G\alpha$, qui devient active sous la forme $G\alpha t$ -GTP. La sous unité se détache ensuite du complexe avec lequel elle est reliée, puis elle va venir lever l'inhibition des deux sous unités PDE. L'activité du PDE est d'hydrolyser le cGMP en 5'-GMP. Il s'agit de la seconde étape d'amplification de la transduction visuelle. Chaque Rhodopsine photoactivée permet l'hydrolyse de $5,2 \times 10^6$ GMPC par seconde. La PDE comporte deux sous unités, donc elle doit être activée par deux $G\alpha$ -GTP. La durée de l'activation de la phototransduction est d'environ 200ms à des intensités lumineuses non saturantes pour les photorécepteurs (Kawamura et Tachibanaki 2008). L'activité de la PDE induit la chute de la concentration en cGMP et donc par conséquent la fermeture des pores Na^+/Ca^{2+} de la membrane plasmique des photorécepteurs, car leurs ouvertures sont permises par la liaison GMPC. Cependant, la membrane plasmique est équipée d'un échangeur Na^+/Ca^{2+} , qui continue à pomper le Ca^{2+} à l'extérieur des photorécepteurs. Cela a pour conséquence d'induire la décroissance de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} dans le segment externe et d'induire l'hyperpolarisation du photorécepteur. Cette action entraîne la polarisation membranaire de plusieurs mV (1 ou 2mV), il s'agit de l'évènement initial de la chaîne de traitement de l'information visuelle (**Figure 6**). Cela induit également l'arrêt de la sécrétion en glutamate. Pour permettre le retour à l'état basal des photorécepteurs, plusieurs protéines vont être inactivées.

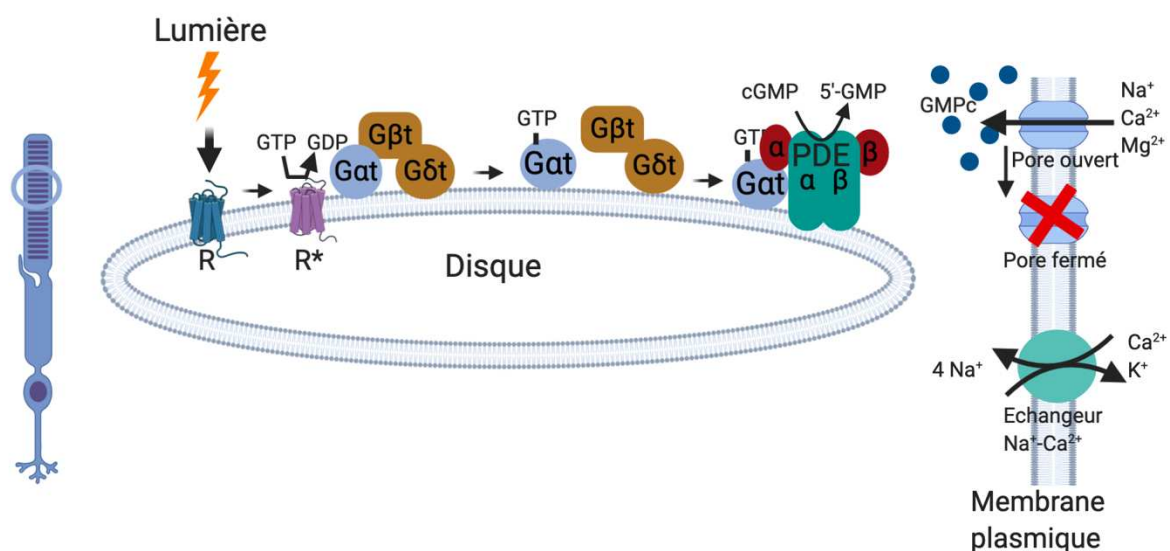


Figure 6 : Le mécanisme de la phototransduction. Après réception des photons, la Rhodopsine est activée en Metarhodopsine, puis celle-ci se lie à la Transducine, activant sa sous unité α . Le complexe Phosphodiesterase (PDE) va alors s'activer grâce à la sous unité α de la transducine. Le PDE va alors convertir le cGMP en GMP, induisant la fermeture des canaux cGMP-dépendant. Seul l'échangeur d'ions

continue à fonctionner, ce qui induit l'hyperpolarisation du photorécepteur (Salesse 2017). R pour Rhodopsine et R pour Metarhodopsine. (Crée avec biorender.com)*

2. Inactivation de la phototransduction visuelle

Pour revenir à l'état basal, la Phosphodiesterase et la Metarhodopsine II doivent être inactivées, et du GMPc doit être synthétisé afin de permettre l'ouverture des canaux à $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrane plasmique. La chute de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} induit ce mécanisme (Ames et al. 1997; Hughes et al. 1995). La Rhodopsine kinase activée va phosphoryler plusieurs acides aminés de la Rhodopsine. La Rhodopsine phosphorylée est alors reconnue et liée par l'Arrestine, ce qui empêche la liaison avec Transducine. La Rhodopsine est alors inactivée par ce mécanisme. L'activité PDE prend fin lorsque ses deux sous unités sont dissociées, lorsque la sous unité G α -GTP se détache. Afin de retrouver la concentration de GMPc, des protéines membranaires, les guanylates cyclases produisent du GMPc dont la liaison aux canaux à $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ permet de reformer le potentiel membranaire des photorécepteurs en réponse à la précédente chute de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} . La synthèse du GMPc permet l'ouverture des canaux à $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et le retour de la concentration cytosolique de Ca^{2+} à l'état basal. A ce stade, un nouveau cycle de phototransduction peut donc être permis (Stephen et al. 2008).

La Rhodopsine pourra se reconstituer grâce à plusieurs enzymes du cycle visuel qui se situent à la fois dans l'EPR et dans les photorécepteurs ainsi qu'à partir de l'opsine et du 11-cis rétinol (Lhor et Salesse 2014; Tsin et al. 2018).

Le all-trans-rétinal est donc réduit en all-trans-rétinol par la rétinol dehydrogenase 8 située dans le segment externe des bâtonnets et grâce à la rétinol dehydrogenase 12 située dans le segment interne des bâtonnets (Haeseleer et al. 2002). En revanche, le chromophore all-trans-rétinol ne peut pas se régénérer sous sa forme -cis car les photorécepteurs ne possèdent pas les enzymes nécessaires.

Grâce à son hydrophobicité, le all-trans-rétinol est véhiculé dans la matrice inter-photoréceptrice jusqu'à l'EPR par une protéine de transport : L'Interphotoreceptor retinol binding protein (IRBP). Ensuite, il migre dans l'EPR jusque dans les microsomes grâce à la protéine Cellular retinol binding protein 1 (CRBP1) (**Figure 7**). Puis, le all-trans rétinol est converti en all-trans-rétinyl ester à l'aide de l'enzyme Lecithin retinol acyltransferase (LRAT) (Saari et Bredberg 1989). Le produit de cette transformation est ensuite stocké dans les rétisomes ou est métabolisé par l'isomerohydrolase rétinol (RPE65) afin de produire le 11-cis rétinol, qui sera ensuite oxydé en 11-cis-rétinal par la Rétinol déshydrogénase 5 (RDH5) et par la Rétinol déshydrogénase 11 (RDH11) dans l'EPR (Parker et Crouch 2010). Ensuite, le rétinol sous l'état 11-cis-rétinal migre à l'aide de la protéine Cellular retinaldehyde binding protein 1 (CRALBP1) jusqu'aux segments externes des photorécepteurs afin de régénérer la Rhodopsine (**Figure 7**) (Salesse 2017).

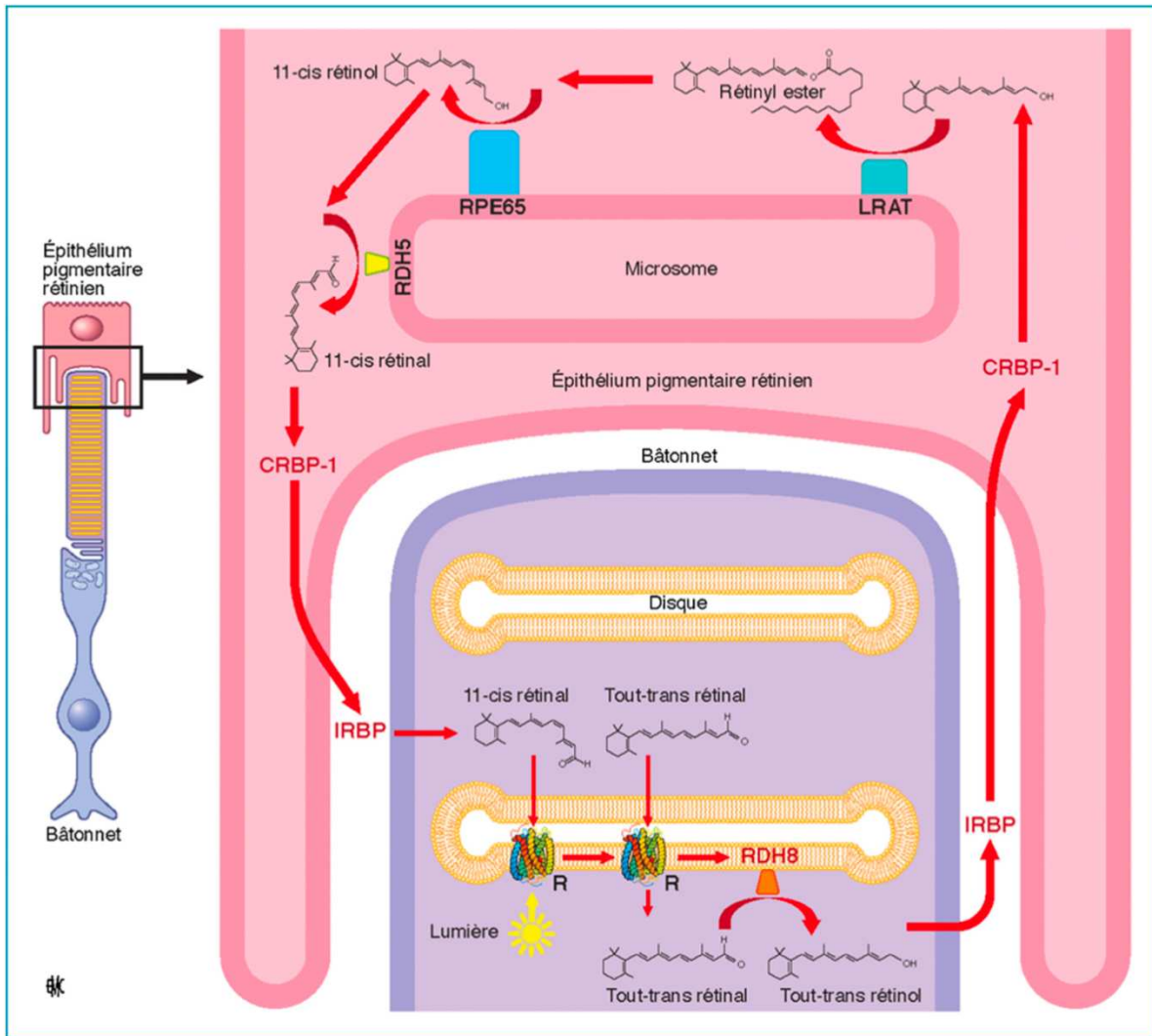


Figure 7 : Schéma récapitulant le cycle visuel des rétinoïdes permettant de régénérer la Rhodopsine des bâtonnets. Le photon absorbé par la Rhodopsine induisant l'isomérisation de son chromophore, le 11-cis rétinol en all-trans-retinal et ainsi former la Rhodopsine photoactivée. Le all-trans retinal se désassemble de l'opsine, puis il est oxydé par la Retinol Deshydrogenase 8 (RDH8) en all-trans-rétinol. Celui-ci est ensuite transporté dans l'EPR par l'Interphotoreceptor Binding Protein (IRBP) et la Cellular Retinol Binding Protein-1 (CRBP-1). Puis, la Lecithine Retinol Acyltransferase (LRAT) va permettre au all-trans rétinol de se transformer en rétinyle ester. Ce dernier sera coupé et isomérisé afin de produire le 11-cis rétinol à l'aide de la RPE65. Le 11-cis rétinol sera alors réduit en 11-cis rétinol par la RDH5 et ainsi, il est conduit au photorécepteur par la CRBP-1 et l'IRBP. Une fois dans le photorécepteur, il pourra se lier à l'opsine afin de régénérer la Rhodopsine. R pour Rhodopsine (image issue de Salesse, 2017).

Il est intéressant de noter certaines différences métaboliques entre les cônes et les bâtonnets. La Transducine est 5 fois moins efficace dans les cônes que dans les bâtonnets ; car en effet, celle-ci possède des sous unités catalytiquement différentes ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\gamma 1$ pour les bâtonnets et $\alpha 2$, $\beta 3$, $\gamma 8$ pour les cônes) (Ingram, Sampath, et Fain 2016). Cette différence permet d'expliquer que les bâtonnets s'activent à de plus basses intensités lumineuses, comparée aux cônes. Cependant, la phosphorylation des pigments visuels des cônes pour retourner à l'état basal est environ 50 fois plus rapide que la Rhodopsine chez les bâtonnets. Car les bâtonnets expriment qu'un seul type de Rhodopsine kinase,

la GRK1, alors les cônes expriment aussi GRK1 ainsi que la GRK7 (Weiss et al. 2001). En effet, l'activité de la GRK7 (spécifique des cônes) est beaucoup plus rapide que celle de la GRK1 (Tachibanaki et al. 2005). Ceci permet aux cônes de retourner à leur état basal 10 fois plus rapidement que les bâtonnets (Kawamura et Tachibanaki 2008). Ces différences permettent de comprendre pourquoi les cônes s'adaptent beaucoup plus rapidement aux intensités lumineuses que les bâtonnets (Salesse 2017; Schnapf et al. 1990).

Enfin, cette différence de sensibilité peut aussi s'expliquer par la différence de volume du segment externe des deux types de photorécepteurs. Les bâtonnets sont beaucoup plus longs, ce qui permet d'accroître la probabilité d'absorption d'un photon (Fu et Yau 2007).

f. Transmission de l'information visuelle

Après transduction de l'information lumineuse en potentiels d'actions puis son intégration dans la rétine, le signal est envoyé au reste du système visuel par le nerf optique composé des axones des cellules ganglionnaires. Parmi tous les types de cellules ganglionnaires que comporte la rétine (environ 40), chacun d'entre eux participe à un circuit rétinien différent et projette à des endroits bien spécifiques du cerveau (Laboissonniere et al. 2019; Schmidt et al. 2011). Les axones des cellules ganglionnaires issus des deux yeux se rencontrent au niveau du chiasma, situé près de l'hypothalamus. Les axones des cellules ganglionnaires localisés au niveau nasal projettent dans l'hémisphère opposé du cerveau ; tandis que les axones de la rétine temporale projettent dans le même hémisphère que leur côté d'origine (Erskine et Herrera 2014). Après le chiasma optique, les axones projettent dans différents noyaux : le corps géniculé latéral, le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus, le colliculus supérieur et le pulvinar. Les projections rétiniennes sont organisées en des territoires complémentaires qui ne se chevauchent pas (Godement, Salaün, et Imbert 1984). Le corps géniculé latéral est un noyau relais, localisé au niveau du thalamus, permettant le transfert de l'information vers le cortex visuel. 10% des fibres visuelles localisées dans le corps géniculé latéral vont se projeter dans le colliculus supérieur. Cette structure joue un rôle important dans le traitement visuel et l'orientation des mouvements des yeux et de la tête en réponse à des stimuli visuels (Zénon et Krauzlis 2014). Les fibres nerveuses qui relient le corps géniculé latéral au cortex visuel constituent la radiation optique de l'hémisphère cérébral. En cas de lésion d'une radiation optique, la vision est endommagée de manière partielle ou totale. Le cortex visuel permet le traitement des images. Le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus permet de son côté, de synchroniser notre rythme circadien à l'aide de sa relation directe avec les cellules ganglionnaires (**Figure 8**) (Harada, Harada, et Parada 2007; Ma et Morrison 2023; Pezaris et Eskandar 2009; Wörgötter et Koch 1991).

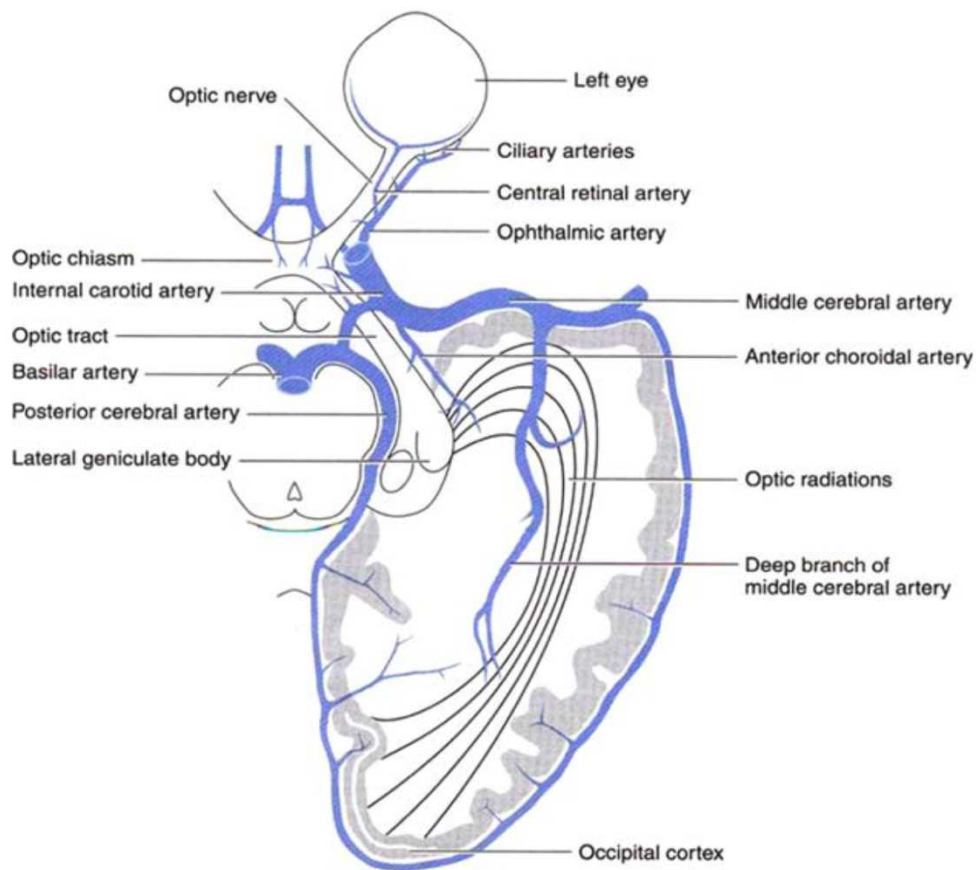


Figure 8 : Représentation de la voie visuelle principale en coupe axiale passant par les noyaux géniculés. L'ensemble des axones des cellules ganglionnaires continue jusqu'au chiasma optique, puis voyage par les tractus optiques et se termine dans les noyaux géniculés latéraux. Interviennent ensuite les neurones relais géniculocorticaux qui forment ensemble les radiations optiques jusqu'aux lobes occipitaux. (Image extraite de (De Moraes 2013)).

2 Les maladies dégénératives de la rétine

a. La dégénérescence maculaire liée à l'âge

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est l'une des principales causes sévères de perte de vision dans les pays développés chez les personnes de plus de 55 ans (Burton et al. 2021; Mitchell et al. 2018; Thomas, Mirza, et Gill 2021). Sa prévalence est en constante augmentation avec le vieillissement de la population et pourrait atteindre, tous stades de DMLA inclus, environ 288 millions de personnes en 2040 (Wong et al. 2014). La prévalence n'est pas homogène en fonction des populations. En effet, les populations asiatiques (7.4%) et africaines (7.5%) sont moins atteintes que les population européennes (12.3%) (Wong et al. 2014).

La DMLA est une maladie multifactorielle. L'âge est le premier facteur de risque de cette maladie. Ainsi, les formes avancées de DMLA concernent environ 0.2% de la tranche d'âge 55-64 ans, tandis qu'elles atteignent 13.1% des plus de 85 ans (Mitchell et al. 2018). D'autres facteurs de risques incluent l'obésité, le tabagisme, ou encore l'hypertension (Mitchell et al. 2018; Thomas et al. 2021). Aux facteurs de risques environnementaux s'ajoutent aussi des facteurs de risques génétiques. En effet, les polymorphismes des gènes du complément factor H (*CFH*), et de l'age-related maculopathy susceptibility 2/ high-temperature requirement factor A1 (*ARMS2/HTRA1*) accroissent le risque de développer une DMLA (Handa et al. 2019).

D'un point de vue clinique, l'examen ophtalmologique des patients permet de définir différents stades de progression de la maladie (précoce, intermédiaire et avancé) (Berninger et Arden 1988; Costello et al. 2021) :

- La phase précoce : l'examen du fond de l'œil permet de visualiser les structures de la rétine et les éventuels dépôts présents sur la rétine comme les drusens (dépôts anormaux d'acides nucléiques, d'acides aminés, de calcium et de polysaccharides, visualisés sous la forme de dépôts jaunâtres). La taille des drusens présents permet de donner une indication sur le stade de la maladie (Costello et al. 2021). La présence de petits drusens inférieurs à 63µm de diamètre ou de quelques-uns de taille moyenne (de 63 à 124 µm) indiquent que la maladie est au stade précoce. A ce stade, le patient ne remarque aucun changement d'acuité visuelle (Mitchell et al. 2018).
- La phase intermédiaire : très peu de symptômes sont visibles, excepté la présence de dépôts de drusen de tailles moyens ou petits dans la macula. Certains patients remarqueront la présence d'une distorsion (ou un léger flou) dans leur vision centrale, et la perte de sensibilité aux contrastes. Un changement de pigmentation de la rétine est aussi observé (hyperpigmentation ou dépigmentation) (Clemons et al. 2005).
- La phase avancée : deux formes avancées se distinguent, la forme avancée néovasculaire (15 à 20% des cas) et la forme avancée atrophique (représente 80 à 85% des cas) dans les populations européennes (Mitchell et al. 2018). La forme néovasculaire de la DMLA est la plus sévère, avec une dégradation plus rapide de la rétine à cause de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins induisant des hémorragies rétinienne ainsi qu'une accumulation de

fluides. L'angiogenèse anormale de la forme néovasculaire est contrôlée en partie par le relargage anormal du VEGF (Thomas et al. 2021). Dans la forme atrophique de la DMLA, des drusens s'accumulent sur l'EPR, provoquant une atrophie locale ou étendue de ce dernier (Hanus, Zhao, et Wang 2016). Dans les deux cas, la présence de plusieurs drusens de tailles supérieures à 124 µm indiquent une DMLA au stade avancé. A ce stade, les patients présentent un ou plusieurs scotomes affectant la vision centrale (Clemons et al. 2005; Thomas et al. 2021).

Au niveau cellulaire, les cellules de l'EPR deviennent dysfonctionnelles et finissent par mourir, entraînant dans un second temps la dégénérescence des photorécepteurs (Hanus et al. 2016). La dégénérescence de la rétine se produit en grande partie à cause d'une dérégulation des voies du complément, d'un stress oxydatif, des dysfonctionnements métaboliques, une accumulation de lipides, de l'angiogenèse, des altérations au niveau de la matrice extracellulaire et de l'inflammation (Brown et al. 2018; Handa et al. 2019; Hussain, Lee, et Marshall 2020; Morizur et al. 2020). Même si tous les mécanismes exacts ne sont pas connus, l'accumulation des protéines et de lipides dans la membrane de Bruch est suspectée de promouvoir l'inflammation et d'affecter la circulation des nutriments, dégradant l'EPR.

Quelques traitements commerciaux ont été mis en place afin de ralentir la progression de la maladie. Concernant les formes néovasculaires, différentes stratégies ont été proposées. Avant les années 2000, le laser était utilisé afin de détruire les néo vaisseaux. Cependant, cette méthode est moins utilisée de nos jours car le point du laser détruit également la région qu'il a touché entraînant une perte de vision irréversible sur la région traitée (Jager, Mieler, et Miller 2008). Puis un traitement à base d'injections en intravitréen a fait son apparition : la thérapie anti-VEGF (le ranibizumab commercialisé sous le nom LUCENTIS®, l'aflibercept commercialisé sous le nom EYLEA® ou le bevacizumab commercialisé sous le nom AVASTIN®) (Fraser-Bell et Gillies 2020). Ces traitements sont chers et doivent être délivrés à intervalles réguliers. Tous les patients ne répondent pas au traitement mais une amélioration modérée de l'acuité visuelle est observée chez certains d'entre eux. En effet, après un an, de traitement anti-VEGF délivré à intervalles réguliers, environ 20% des patients perdent la vision, 50% d'entre eux ne parviennent pas à obtenir une acuité visuelle de 20/40, et plus de 2/3 des patients ne montrent quasiment aucune amélioration de leur acuité visuelle sur la charte ETDRS (Al-Kharsan et al. 2019). En plus de ce traitement, l'Age-related Eye Disease Study (AREDS) préconise la prise de vitamines C, E, Zinc, cuivre, Zeaxanthin et de Lutein. Cette supplémentation est conseillée à partir de la phase précoce de la maladie car elle réduit de 25% le risque de développer un stade avancé (Age-Related Eye Disease Study 2 Research Group 2013).

Très récemment, le premier traitement spécifique de la DMLA atrophique, le Syfovre™ (pegcetacoplan), a été approuvé en février 2023 par la Food and Drug Administration (le régulateur des USA du médicament). Il s'agit d'une injection en intravitréen de pegcetacoplan, inhibiteur du complément commercialisé par Apellis Pharmaceuticals (Devarasetti 2023; Pfau et al. 2022). Une étude clinique (ClinicalTrials : NCT02503332) a montré que ce traitement ralentit la perte des segments externes des photorécepteurs sur 97 patients souffrant de DMLA atrophique durant 12 mois (Nittala et al. 2022). Cependant, ces traitements ne permettent pas de traiter l'intégralité des patients car ils doivent être appliqués très précocement pour qu'ils soient efficaces.

b. Les maladies héréditaires dégénératives de la rétine

1. Les rétinites pigmentaires (RPs)

Les RPs font partie d'un groupe de maladies génétiques monogéniques pouvant mener jusqu'à la cécité (Pagon 1988; Pierrottet et al. 2014). A l'heure actuelle, 71 gènes différents ont été identifiés (<https://web.sph.uth.edu/RetNet/>) (O'Neal et Luther 2023). Les RPs sont des maladies rares touchant environ 1 personne sur 5 000 dans le monde. En fonction de la localisation chromosomique du gène atteint, tous les modes de transmissions génétiques sont possibles : autosomique dominant (15-25 % des cas), autosomique récessif (15-20 % des cas), lié au chromosome X (10-15% des cas) (Bunker et al. 1984; Dufier 2003; Liu et al. 2022; Prem Senthil, Khadka, et Pesudovs 2017). Les mutations sporadiques (mutations survenues spontanément) peuvent représenter jusqu'à 52% des cas (Tsuji-kawa et al. 2008). La cause des RPs (mutation à l'origine de la maladie) est connue dans 70% des RPs non-syndromiques et dans 50% des RPs autosomales dominantes (Hartong, Berson, et Dryja 2006; Verbakel et al. 2018). Les formes non syndromiques représentent la majorité des cas de RPs (environ 70-80% des cas) (Hartong et al. 2006) et sont caractérisées par 3 étapes distinctes.

Les symptômes précoces des RPs sont la perte de la capacité à s'adapter aux différents contrastes ainsi que la perte progressive de la vision nocturne (Hamel 2006). Les patients ont généralement un mode de vie normal, et la maladie est difficile à détecter, surtout lorsqu'il n'y a pas d'antécédents dans la famille. En effet, la cécité nocturne survient progressivement et elle est parfois ignorée au début par les patients. La vision des couleurs reste normale et l'examen du fond de l'œil ne révèle aucune anomalie. Seul un électrorétinogramme (ERG qui mesure la réponse électrique de la rétine à un signal lumineux) permet de détecter la baisse de sensibilité à la lumière de la rétine, en visualisant notamment des anomalies sur les ondes a et b (Ferrari et al. 2011; Hassan-Karimi et al. 2012).

Dans sa forme intermédiaire, la perte de la vision nocturne est complète. Les patients deviennent de plus en plus conscients de l'état de dégradation de leur vision. La vision des couleurs se ternit (due à la perte des cônes). Après un examen du fond de l'œil, la rétine présente des dépôts de pigments en forme de spicules osseux en périphérie, ainsi qu'une atrophie vasculaire. Les vaisseaux rétinien apparaissent comme rétrécis (Hamel 2006).

Dans sa forme tardive, les patients ne peuvent plus se déplacer sans une aide extérieure. Ils ont totalement perdu la vision périphérique (vision en tunnel). Les examens du fond de l'œil révèlent une forte concentration de dépôts dans la zone maculaire. L'examen du fond de l'œil met en évidence les signes cliniques des RPs dont l'affinement des vaisseaux sanguins, le rétrécissement artériel et un éclaircissement du nerf optique (Hamel 2006). Tardivement mais symptomatiquement des maladies, la rétine apparaît comme tachetée de débris pigmentés (**Figure 9**). Cette pigmentation est le témoin de la destruction de l'EPR avec la libération des pigments migrant vers les couches les plus internes de la rétine formant des amas intra-rétiens. Les patients peuvent également souffrir de photophobie dans les cas où l'EPR est détérioré (Otsuka et al. 2020). Ces maladies sont bilatérales dans l'immense majorité des cas (Dufier 2003). On note également la diminution de l'épaisseur de la CNE (couche contenant les noyaux des photorécepteurs) à l'examen de tomographie en cohérence optique (OCT) chez ces patients souffrant d'une RPs (Garcia et al. 2012; Oh et al. 2020). Certains patients deviennent aveugles à 30 ans, tandis que la vaste majorité des patients perdent la vue vers 40 ans (Verbakel et al. 2018).

Cette description correspond à la forme la plus répandue des RPs « bâtonnet-cône » (**Figure 10**). La forme inverse, encore plus rare est nommée « cône-bâtonnet ». Elle correspond à la dégénérescence en premier des cônes puis à celle des bâtonnets, avec une prévalence de 1/40 000 (Hamel 2007).

Au niveau cellulaire, les RPs sont souvent associées à des agrégats de protéines menant au dysfonctionnement des photorécepteurs, à des stresses oxydatifs, à l'infiltration et à l'activation du système immunitaire, et à des dysfonctions métaboliques. Les photorécepteurs meurent *in fine* soit par autophagie, apoptose ou par nécrose (Liu et al. 2022). La plupart du temps, la mutation génétique affecte les fonctions des photorécepteurs, mais peut aussi altérer le fonctionnement de l'EPR dans 5% des cas (Ben M'Barek et al. 2018). Dans les formes avancées des RPs, l'OCT montre que la couche des cellules ganglionnaires et la CNI restent préservées tandis que la couche des photorécepteurs est très endommagée. La plupart des gènes mutés impliqués dans les RPs, jouent un rôle dans la cascade de phototransduction, dans le cycle visuel, dans l'épissage, dans les structures ciliaires et dans le transport intracellulaire (Hartong et al. 2006; Verbakel et al. 2018).



Figure 9 : Fond de l'œil d'un patient affecté par une rétinite pigmentaire, aux différents stades : précoce, intermédiaire et tardif (Image extraite de Hamel, 2006 (Hamel 2006)).

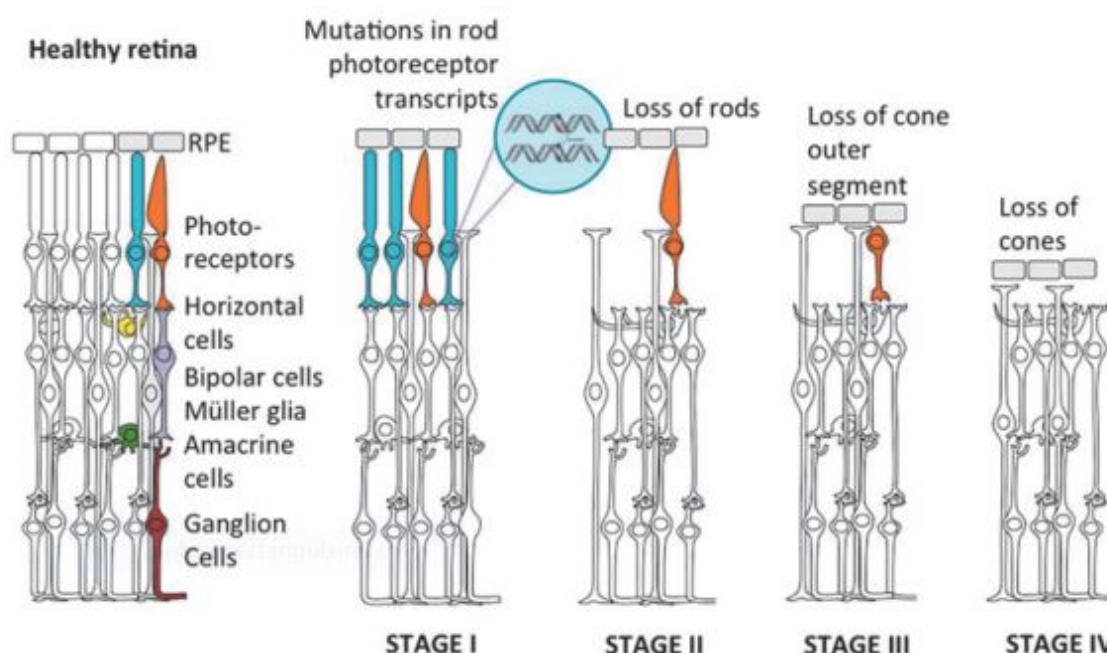


Figure 10 : Représentation schématique de la progression des maladies génétiques affectant la rétine. Ici est illustrée en exemple une rétinite pigmentaire autosomale dominante. Dans le cas des RPs, les

mutations affectent souvent les bâtonnets en premier, induisant la mort de ces derniers (représentés en bleu) (stade 1). Rapidement, les cônes se dégradent (représentés en orange) (stades II et III). Au stade final (IV), la totalité des photorécepteurs a disparu (Image issue de Dalkara, 2016 (Dalkara et al. 2016)).

Il n'existe qu'un seul traitement : la thérapie génique *RPE65*. En effet, la première et la seule thérapie génique actuellement sur le marché traitant les RPs est le LUXTURNA™. (voretigène néparovec) (Hartong et al. 2006; Moraru et al. 2022; Prado, Acosta-Acero, et Maldonado 2020). Ce traitement permet de traiter les patients souffrant d'amaurose congénitale de Leber résultant de mutations bi-alléliques du gène *RPE65*, grâce à la supplémentation de ce même gène, ce qui représente seulement 2% des patients atteints de RPs (Ben M'Barek et Monville 2019). Une fois que le LUXTURNA™ est injecté sous la rétine, le vecteur AAV2 va induire le transport du gène *RPE65* dans l'EPR dans le but de relancer la production de l'enzyme RPE65 (permettant de reconverter le 11-cis-retinal) et de restaurer le cycle visuel (Bainbridge et al. 2008; Ducloyer et al. 2020; Prado et al. 2020). Cette thérapie a montré qu'elle permet une amélioration de la vision de nuit, du champ visuel et de la sensibilité à la lumière (Gao, Hussain, et Weng 2020).

Les patients souffrant d'une RP sont également susceptibles de développer une cataracte (environ 23,4%- 53% des patients RP) (Heckenlively 1982). La chirurgie de la cataracte permet aux patients d'augmenter considérablement leur acuité visuelle, car elle est une des causes les plus importantes de la perte de la vision centrale dans les cas de RPs (Chatterjee et al. 2021; Pandey et Sharma 2021).

Enfin, des lunettes spécifiques sont souvent prescrites dans les phases précoces de RP. L'acuité visuelle de nuit étant en premier affectée, des lunettes de vision nocturne ont été développées afin d'amplifier la lumière et ainsi permettre aux personnes atteintes de RPs d'accroître leur mobilité dans les environnements de faible luminosité (Hartong et al. 2004; Ikeda et al. 2019).

Ainsi, il n'existe donc aucun traitement disponible pour traiter 98% des patients souffrant de RPs.

2. Les formes syndromiques

Les formes syndromiques des RPs sont moins communes, elles représentent 30% des cas, et sont associées à d'autres dysfonctionnements métaboliques. Une trentaine de syndromes sont répertoriés. Souvent, le symptôme le plus couramment associé est la surdité. D'autres symptômes existent tels que la déficience mentale, des déformations faciales, une microcéphalie (malformation congénitale où la tête des bébés est plus petite que la normale), une obésité, des déficiences rénales, immunitaires et métaboliques (Dufier 2003). Les principaux syndromes affectant le plus de patients sont les syndromes de Bardet-Biedl (5%) et celui de Usher (10%) (Hamel 2006).

Voici la description de quelques-uns de ces syndromes :

Le syndrome de Usher est une ciliopathie. Ainsi, le dysfonctionnement des cils primaires ou des cils mobiles est à l'origine, entre autres, du dysfonctionnement des photorécepteurs. Ce syndrome a une prévalence de 1/30 000 et se transmet de façon autosomique/récessif (Ouyang et al. 2005; Tsang, Aycinena, et Sharma 2018b). Une dizaine de gènes à l'origine de ce syndrome a été identifiée. Parmi

les symptômes couramment décrits, une surdité congénitale est diagnostiquée dans 97% des cas, et la RP de type « bâtonnet-cône » apparaît secondairement, dans la seconde ou la troisième décennie de vie (Tsang et al. 2018b).

Le syndrome de Bardet-Biedl est également une ciliopathie, sa prévalence est de 1/1 250 000. Ce trouble est associé à une combinaison de plusieurs symptômes cliniques comme une obésité, une RP de type « bâtonnet-cône », une atteinte de la fonction rénale et des difficultés d'apprentissage (Tsang, Aycinena, et Sharma 2018a). La plupart des signes sont présents chez une majorité de patients, néanmoins, seule la RP est constante à l'âge adulte chez tous les patients. Au moins 12 gènes ont été reconnus comme étant impliqués. Ces gènes ont la particularité de coder pour des protéines jouant un rôle dans le développement et le maintien de l'intégrité des cils (Ferrari et al. 2011; Forsythe et Beales 2013).

Le syndrome de Alström est causé par la mutation du gène *ALMS1*, il s'agit d'une ciliopathie monogénique et récessive. Sa prévalence est de 9/1 000 000. Cette mutation se manifeste d'abord par une atteinte des cônes puis évolue vers une RP de type « cônes-bâtonnet » (Nasser et al. 2018). Les autres symptômes associés sont une obésité depuis l'enfance, un diabète de type 2, une cardiomyopathie, une surdité, et de l'acanthosis nigricans (épaississement et hyperpigmentation de la peau). Ce syndrome est progressif et le premier symptôme observé sur les enfants en bas âge (observable entre la naissance et les 15 premiers mois de vie) est habituellement une photophobie et un nystagmus (tremblement des yeux) (Marshall et al. 2015; Paisey et al. 1993). La plupart des patients ont perdu la vue à la fin de la seconde décennie de vie, tandis qu'une petite minorité reste capable de lire de gros caractères durant la troisième décennie de vie (Paisey et al. 1993).

c. Remodelage rétinien suite à la dégénérescence rétinienne

Suite à la dégénérescence graduelle des photorécepteurs, un remodelage des structures de la rétine s'effectue. Il s'agit d'une série progressive d'altérations et/ou de modifications du métabolisme rétinien, de l'expression des récepteurs, de l'organisation du réseau de neurites, ainsi que de mort cellulaire. Le remodelage rétinien s'articule en quatre phases :

La première phase du remodelage de la rétine est caractérisée par les premiers évènements de stress et de dégénérescence des photorécepteurs (**Figure 11**). La morphologie des astrocytes change et ils étendent leurs extensions jusqu'aux photorécepteurs (Marc et al. 2007; Pfeiffer, Marc, et Jones 2020). Les cellules de la microglie se ramifient également et étendent leurs extensions jusqu'aux photorécepteurs afin de phagocyter ceux qui sont apoptotiques (Gupta, Brown, et Milam 2003). Les cellules de Müller commencent à altérer leur signature métabolique, menant à la dérégulation de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) (surexpression), de la glutamine synthétase (sous-expression) et de la protéine cellulaire retinaldehyde-binding (CRALBP) (sous-expression). La décroissance de l'expression de glutamine synthétase altère le fonctionnement du cycle visuel (Pfeiffer et al. 2020; Sakami, Imanishi, et Palczewski 2019).

La seconde phase du remodelage rétinien est définie par la perte progressive et définitive des photorécepteurs restants. Cette seconde phase se maintient tant qu'il reste des photorécepteurs. La

réorganisation synaptique entre les neurones, aussi appelée rebranchement (ou reconnexion), entre dans une phase très active (Jones et al. 2003; Strettoi et al. 2003a). Dans un premier temps, les bâtonnets étendent leurs connexions axonales plus loin que la couche plexiforme interne (CPI), jusque dans les couches plus internes de la rétine, et dans certains cas jusqu'au niveau de la membrane limitante interne (Sethi et al. 2005). Lorsque que les bâtonnets commencent à mourir, les cellules bipolaires et les cellules horizontales connectées à ces derniers remodelent leurs neurites pour venir reformer de nouvelles connexions avec les cônes restants (Linberg et al. 2006). De la même manière, quand les derniers photorécepteurs meurent, les cellules bipolaires vont remodeler leurs neurites et les cellules horizontales étendent leurs neurites pour venir se reconnecter aux cellules de la couche plexiforme interne (CPI) (Strettoi et al. 2003b; Strettoi et Pignatelli 2000).

La troisième phase se caractérise lorsque tous les photorécepteurs sont morts, et que de nombreuses neurites des cellules rétinienne restantes ont colonisé la rétine atrophique (Marc et al. 2003).

Dans la quatrième phase, des conformations protéiques aberrantes (α -syn) sont retrouvées, semblables aux protéinopathies retrouvées dans d'autres formes de maladies dégénératives comme Alzheimer ou Parkinson. Lors des phases les plus avancées de dégénérescence rétinienne, la rétine a perdu plus de 90% de ses neurones (Pfeiffer et al. 2020).

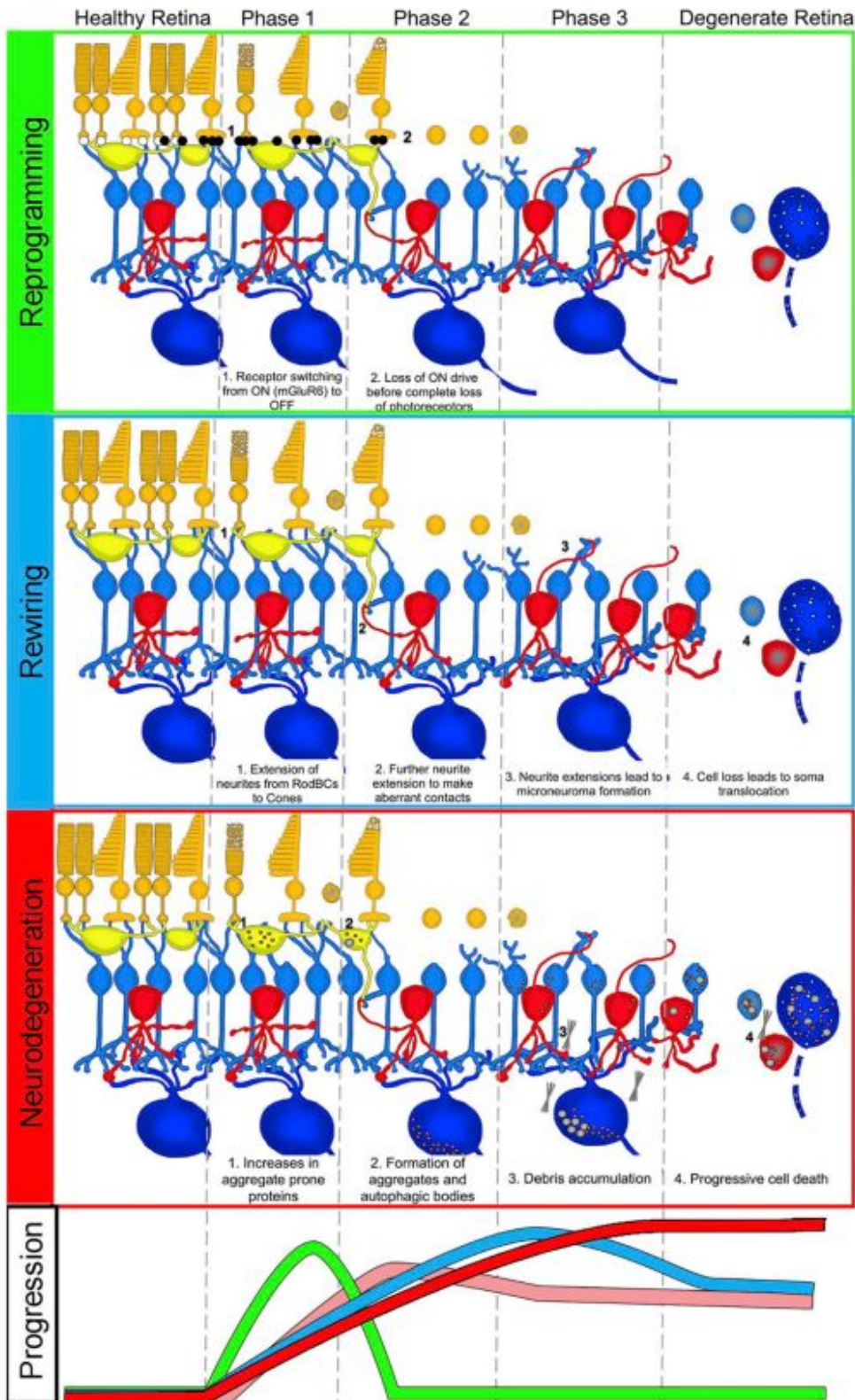


Figure 11 : Les phases du remodelage rétinien. La frise en bas représente les temps relatifs pour l'initiation et les contributions maximales de chacun des composants du remodelage : la reprogrammation en vert, la réécriture en bleu, la neurodégénération en rouge et les contributions des cellules gliales en rose. Les cellules jaune clair sont les photorécepteurs, les jaunes foncés sont les cellules

horizontales, les bleus clairs sont les cellules bipolaires, les rouges sont les cellules amacrines et les bleus foncés sont les cellules ganglionnaires (Extrait de (Pfeiffer et al. 2020)).

Pour une application en thérapie cellulaire, il est important de connaître précisément le temps de progression des différentes maladies dégénératives et comment la rétine se remodèle avec exactitude au cours du temps. Ceci permet de définir le temps, le moment le plus approprié pour la greffe des cellules. Afin de maximiser les chances d'intégration des photorécepteurs dans le cadre d'une thérapie cellulaire, la greffe doit être réalisée durant les phases II ou III (Cuenca et al. 2014). Ce temps de greffe relativement précoce sert aussi à éviter que les synapses des cellules de la rétine neurale ne se soient complètement transformées. Une désorganisation trop importante du circuit rétinien a pour conséquence d'altérer le signal électrophysiologique et de ne plus permettre aux photorécepteurs greffés de se connecter aux cellules hôtes (Cuenca et al. 2014).

d. Les pistes thérapeutiques actuelles

Différentes pistes thérapeutiques sont explorées, actuellement en phase de développement préclinique ou clinique, en fonction du stade de progression de ces maladies (**Figure 12**). La thérapie génique ciblée sur un gène muté, ou les approches de neuroprotection doivent être réalisées très tôt chez les patients, avant que les photorécepteurs ne dégénèrent complètement, lors de la 1^{ère} ou la 2nd phase du remodelage rétinien. Dans le cas où les photorécepteurs ont dégénéré, trois stratégies peuvent être envisagées : l'implant rétinien électronique, l'optogénétique et la thérapie cellulaire. La transplantation cellulaire est plutôt envisagée durant la 2^{ème} ou la 3^{ème} phase du remodelage rétinien, tandis que l'optogénétique est plutôt envisagée dans la 3^{ème} phase. L'implant électronique est envisagé dans les stades les plus tardifs (3^{ème} et 4^{ème} phase) (Cuenca et al. 2014; Roska et Sahel 2018).

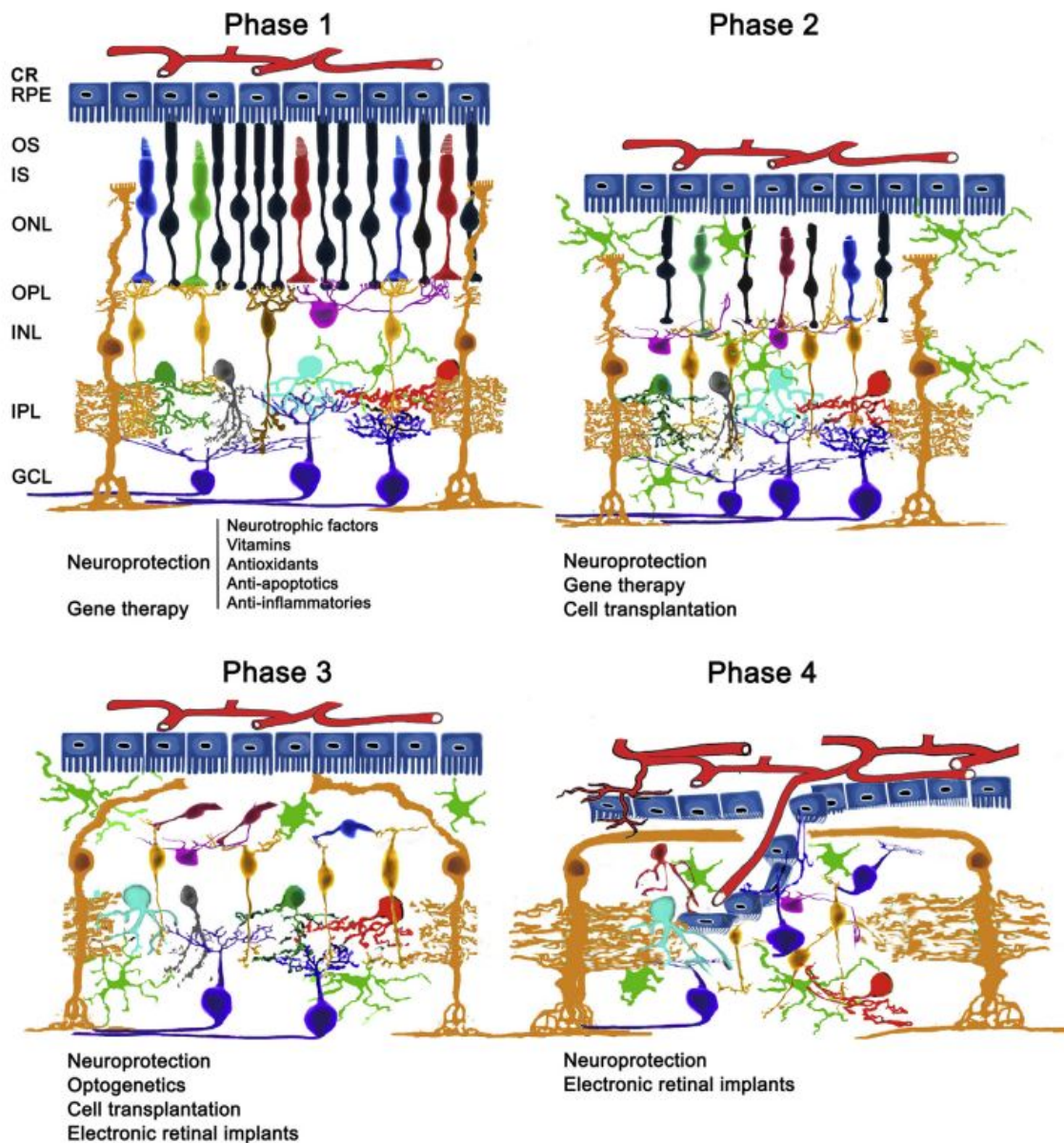


Figure 12 : Les différentes stratégies thérapeutiques à adopter en fonction des stades de remodelage rétinien. CR: Choroid, RPE: Retinal pigment epithelium; OS: outer segments; IS: inner segments; ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer. Extrait de (Cuenca et al. 2014).

1. La thérapie génique de compensation d'un gène muté

La thérapie génique a vu le jour grâce aux progrès des techniques d'édition du génome et grâce à la maîtrise des vecteurs viraux. Cette technique repose sur le fait d'apporter un gène spécifique à l'intérieur de la cellule afin de corriger une mutation ciblée (cas des RP). Pour réparer ou désactiver un gène dysfonctionnel de manière précise, il faut apporter dans la cellule des nucléases capables de couper le génome de manière précise et localisée, ainsi qu'un fragment d'ADN contenant le gène fonctionnel (Sayed et al. 2022). Pour cela, deux méthodes de transport ont été développées : les

vecteurs non viraux et les vecteurs viraux. Les vecteurs viraux sont principalement utilisés, ils sont impliqués dans 75% des essais cliniques de thérapie génique (Lino et al. 2018).

En fonction des cellules ciblées, de la taille du gène à incorporer, de la réponse immunitaire induite, de la stabilité transgénique souhaitée au cours du temps, ou encore du profil oncogénique de certains virus, le choix du vecteur viral se fait en fonction des propriétés intrinsèques du virus d'origine. Dans le cas de la thérapie génique destinée au traitement des dégénérescences rétiniennes, le vecteur viral le plus utilisé est le virus adéno-associé (AAV) (Cheng et Punzo 2022; Lipinski, Thake, et MacLaren 2013).

De manière générale, il est important de connaître précisément le gène muté pour mettre en œuvre la thérapie génique, ce qui n'est pas le cas pour 30% des cas des RPs non syndromiques et pour 50% des RPs autosomiques dominantes (Hartong et al. 2006; Verbakel et al. 2018). De plus, il existe plus de 71 gènes connus impliqués dans les RPs. Il faudrait ainsi développer une thérapie génique adaptée à chaque gène/mutation. De plus, la thérapie génique apparaît comme une technique très coûteuse comparée au nombre de patients concernés pour chacun des gènes mutés (Verbakel et al. 2018). C'est notamment le cas du traitement LUXTURNA™, une thérapie génique ciblant un seul gène d'une RP (*RPE65*) et dont le coût est de 735 000 euros par patient. Malgré tout, d'autres thérapies géniques ciblant les maladies rétiniennes sont actuellement en cours d'essais cliniques (**Table 1**) (Dalkara et al. 2016; Hu et al. 2021).

Disease	Target Gene	Vector/Type	Starting year	NCT		Status	Location(s)
				Identifier	Phase		
Achromatopsia	CNGA3	AAV8-hCNGA3	2015	02610582	1/2	Active, not recruiting	Germany
	CNGB3	AAV2/2YF-PRI.7-hCNGB3	2016	02599922	1/2	Recruiting	USA
	CNGA3	AAV2/2YF-PRI.7-hCNGA3	2017	02935517	1/2	Recruiting	USA and Israel
Choroideremia	CNGA3 and CNGA3:	AAV2/8-hCARp-hCNGB3 and AAV2/8-hG1.7p-coCNGA3	2017	03278873	1/2	Recruiting	UK
	CNGA3	AAV2/8-hG1.7p-coCNGA3	2019	03758404	1/2	Recruiting	UK and USA
	CHM	AAV2-hCHM	2015	02341807	1/2	Active, not recruiting	USA
		AAV2-REP1	2016	02671539	2	Active, not recruiting	Germany
		AAV2-REP1	2016	02407678	2	Active, not recruiting	UK
		AAV2-REP1	2017	03507686	2	Active, not recruiting	USA and Germany
		AAV2-REP1	2017	03496012	3	Active, not recruiting	USA, Canada, Denmark, Finland, France, Germany, Netherlands, UK
Leber congenital amaurosis 2	RPE65	AAV2-CBSB-hRPE65	2007	00481546	1	Active, not recruiting	USA
		AAV2-hRPE65v2 (voretigene neparovect-zyl)	2007	00516477	1	Active, not recruiting	USA
		AAV2-hRPE65v2 (voretigene neparovect-zyl)	2010	01208389	1/2	Active, not recruiting	USA
Leber congenital amaurosis 10	CEP290	AAV2-hRPE65v2 (voretigene neparovect-zyl)	2012	00999609	3	Active, not recruiting	USA
		AAV2/5-OPTIRPE65	2016	02946879	1/2	Recruiting	UK
		QR-110 (antisense oligonucleotide)	2017	03140969	1/2	Completed	USA, Belgium
Retinitis pigmentosa, autosomal recessive	MERTK	AAV5 (AGN-151,587 or EDIT-101)	2019	03872479	1/2	Recruiting	USA
	PDE6B	AAV2-VMD2-hMERTK	2011	01482195	1	Recruiting	Saudi Arabia
	RHO	AAV2/5-hPDE6B	2017	03328130	1/2	Recruiting	France
Retinitis pigmentosa, X-linked dominant	RHO	OR-1123 (antisense oligonucleotide)	2019	04123626	1/2	Recruiting	USA
	RPGR	AAV8-coRPGR	2017	03116113	1/2/3	Recruiting	USA, UK
		AAV2/5-RPGR	2017	03252847	1/2	Active, not recruiting	USA, UK
Retinitis pigmentosa, X-linked recessive	RPGR	AAV2/5-RPGR	2017	03316560	1/2	Recruiting	USA
		AAV2/2YF-GRK1-RPGR (AGTCS01)	2018	02556736	1/2	Active, not recruiting	USA
		AAV2-Chop2 (RST-001)	2015	03326336	1/2	Recruiting	USA, France and UK
Retinitis pigmentosa, non-specific	CHR2 (Optogenetics)	AAV2-7m8-CAG-ChrimsonR-tdTomato (GS030)	2018	04278131	1/2	Recruiting	USA, France and UK
		AAV ChronosFP (BS01)	2020	01736592	1/2	Recruiting	USA and France
		EIAV (SAR422459)	2011	02065011	1/2	Active, not recruiting	USA and France
Stargardt disease	ABCA4	EIAV-CMV-AMVO7A (Ush1at)	2013	03780257	1/2	Recruiting	USA, Belgium, Canada, France
Usher syndrome 1B	MYO7A	QR-421a (antisense oligonucleotide)	2019	02317887	1/2	Recruiting	USA
Usher syndrome 2	USH2A	AAV8-sCR5/IRBhrs	2015	02416622	1/2	Active, not recruiting	USA
X-linked retinoschisis	HRS1	AAV2/2YF-CB-hRS1	2015				USA

Table 1 : Tableau récapitulatif des essais cliniques actuels pour la thérapie génique rétinienne (image extraite de (Hu et al. 2021)).

2. Les approches de neuroprotection

Cette stratégie à l'étude est une approche alternative indépendante de la mutation agissant en faveur de la survie des photorécepteurs, ce qui lui permet d'être appliquée à plusieurs types de RPs et/ou de dégénérescences rétiniennes. Les facteurs neurotrophiques ont été étudiés afin d'utiliser leurs actions trophiques et protectrices sur des modèles animaux porteurs d'une dystrophie rétinienne. Par exemple, la surexpression du rod-derived cone viability factor (RdCVF), à l'aide de la thérapie génique permettrait d'agir comme une neuroprotection. En effet, cette protéine permet de prévenir du stress oxydatif, elle est capable de retarder la dégénérescence des photorécepteurs (Clérin et al. 2020; Léveillard et Sahel 2010). Cette stratégie a montré son efficacité sur des modèles murins de RPs (modèles de souris rd10, et P23H). La dégénérescence des cônes a ainsi été retardée. De plus, une meilleure fonctionnalité après incorporation de RdCVF par thérapie génique à l'aide d'un AAV a également pu être observée sur ces modèles murins. L'ERG a montré 3, 4 et 5 semaines après l'injection en intra-vitréen, que l'onde a (hyperpolarisation due aux photorécepteurs lors qu'un signal lumineux est détecté) présente une meilleure amplitude par rapport au groupe contrôle (Byrne et al. 2015). Ceci indique une meilleure réponse à la lumière des photorécepteurs et par conséquent une préservation de ces derniers. Cette stratégie est actuellement en essai clinique de phase I/II sur 33 patients (Clinical trial : NCT05748873), sponsorisé par la société Sparing Vision. L'essai a commencé en avril 2023 et les résultats sont attendus pour 2029.

D'autres facteurs neurotrophiques ont démontré une survie et une action protectrice sur les photorécepteurs matures : le facteur neurotrophique ciliaire (CNTF) ou encore le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) (Delplace et al. 2019; Gupta et al. 2013). Pour que cette stratégie soit efficace, il faut que les facteurs neurotrophiques soient libérés en continu. Comme il ne paraît pas envisageable pour les patients de subir des injections à répétition, la société Neurotech Pharmaceuticals, Inc. a développé l'implant «NT-501» mesurant 1mm de diamètre pour 6 mm de long. Cet implant (placé dans le vitré) contient des cellules modifiées génétiquement conçues pour sécréter en continu durant 2 ans du CNTF (Annamalai et al. 2018; Kauper et al. 2012). Après avoir testé cette méthode chez un modèle animal, cette stratégie a été lancée en essais cliniques aux Etats-Unis (ClinicalTrials NCT00063765, NCT00447954, NCT00447980, NCT00447993) (Tao et al. 2002). Les essais cliniques sont terminés, et les résultats sont encourageants. En effet, 12 mois après l'implantation, les patients ayant reçu l'implant « NT-501 » sécrétant 1.6 +/- 0.7 ng/jour de CNTF (10 patients) ont montré une stabilisation de leur acuité visuelle, tandis que le groupe contrôle (9 patients) a perdu de l'acuité visuelle (Kauper et al. 2012).

Une autre stratégie de neuroprotection envisagée est la supplémentation du 11-cis-retinal. Certains patients atteints de RPs en phase précoce présentent une mutation sur les gènes *LRAT* ou *RPE65*. Ces mutations induisent un dysfonctionnement du cycle visuel, le 11-cis-retinal n'est plus régénéré. Un traitement oral de 9-cis-retinal, analogue au 11-cis-retinal permettrait de substituer à ce déficit et de contribuer à un cycle visuel fonctionnel si les photorécepteurs n'ont pas dégénéré avant le début du

traitement (Scholl et al. 2015). Cependant, il s'agit seulement d'une seule étude, d'un seul essai clinique de phase I (ClinicalTrials NCT01014052) qui a testé cette méthode de restauration du 11-cis-retinal. De plus, cette étude a été réalisée il y a longtemps, et aucune suite à ce travail n'a été publiée depuis.

3. L'implant électronique

Une autre stratégie envisagée pour traiter les RPs est l'implant électronique (ou implant rétinien), elle s'adresse aux patients ayant une dégénérescence très importante des photorécepteurs. Le principe de l'implant électronique est de remplacer la fonction des photorécepteurs par des électrodes à l'aide d'un implant de 3mm² fixé sur ou sous la rétine (Allen 2021). L'implant, composé d'électrodes stimule électriquement la rétine. La mise en place de ce dispositif dans l'œil du patient est uniquement possible grâce à une opération chirurgicale. Basés sur le type de chirurgie mis en œuvre, plusieurs types d'implant électronique se distinguent : ceux dits épitrétiens, sous-rétiens, supra-chroïdiens ou intra-scléales. Les dispositifs épi- et sous-rétiens permettent d'obtenir la meilleure restauration visuelle aux patients, certains parviennent même à lire des mots courts (Zrenner et al. 2011). Les premiers prototypes ont été réalisés dans les années 1990, ils comportaient seulement 16 à 20 électrodes contre 1500 aujourd'hui. Plus le nombre d'électrodes ou photodiodes est important, plus l'image perçue par le patient sera qualitative.

Deux types d'implants rétiens peuvent être actuellement greffés. Le premier type est le modèle Argus II (En 2013, il est le premier implant à être commercialisé en Europe et aux Etats-Unis) (Second Sight) et le modèle Iris II (Pixium vision) (Ayton et al. 2020; da Cruz et al. 2013; Humayun et al. 2012; Stiles, Patel, et Weiland 2021). Ils sont dits « épitrétiens », car ils sont placés à la surface de la rétine, directement sur les cellules ganglionnaires. L'autre type d'implant se place sous la rétine, à la place des photorécepteurs, ce modèle s'appelle Alpha-AMS/IMS (Retina implant) (K et E 2013). Ces deux types d'implants fonctionnent différemment. Pour les modèles dits épitrétiens (Argus II et Iris II) des caméras sont intégrées dans une paire de lunettes. Les informations visuelles collectées sont transmises à un système électronique placé à la ceinture du patient. Il permet de convertir les informations visuelles en des signaux électriques transmis aux neurones de la rétine en aval des photorécepteurs. Ces derniers sont envoyés à un récepteur placé sur l'œil par des ondes radio. Le récepteur prend le relais et convertit les ondes radio en des courants électriques qui seront transmis dans des fils pénétrants dans l'œil jusqu'à l'implant. Argus II est composée de 60 électrodes en platine et a été implanté chez plus de 350 patients dans le monde. Cependant, ce modèle n'est plus fabriqué depuis 2019 à cause d'un manque d'investisseurs.

Le modèle Iris II comprend 150 électrodes, il est donc plus résolutif que Argus II (da Cruz et al. 2013; Erickson-Davis et Korzybska 2021; Rachitskaya et Yuan 2016). L'autre type d'implant, Alpha-AMS/IMS de chez Retina Implant n'a pas le même principe de fonctionnement. Celui-ci est composé de 1500 électrodes et de 1500 diodes sensibles à la lumière. Les diodes captent et transforment la lumière en des courants électriques qui seront ensuite amplifiés par une composante électrique avant d'être transmis au niveau des électrodes. Avec cet implant, il n'y a pas de lunettes associées, cependant, le circuit électrique relié aux photodiodes doit être alimenté. Pour cela, un câble partant sous la puce de la rétine, vers l'extérieur de l'œil, jusque derrière l'oreille est nécessaire. Ces systèmes sont actuellement en phase clinique. La plupart des patients implantés a bénéficié d'une amélioration

de leur vision allant de la visualisation d'un passage piéton à la lecture de mots à gros caractères sur un écran. Cependant, tout comme Argus II, sa commercialisation a été arrêtée (Edwards et al. 2018; Faber et al. 2020). Une société française « Pixium Vision » a développé un implant plus complexe, nommé « Prima ». Il s'agit d'un implant composé de 378 électrodes de neurostimulation photovoltaïque non filaire. Un matériau sensible à la lumière infrarouge stimule électriquement les cellules bipolaires. Ce dispositif est couplé lui aussi à des lunettes qui transforment à l'aide d'une caméra le signal lumineux en signal infrarouge transmis ensuite à l'implant.

Il est à noter que dans les cas de dégénération avancées, l'intégrité du signal est dégradée à cause de la dégénérescence presque totale de tous les types cellulaires de la rétine neurale (Palanker et al. 2020; Pfeiffer et al. 2020). De plus, l'implantation d'une rétine électronique mène dans 24% des cas à un détachement rétinien (Kitiratschky et al. 2015).

4. L'optogénétique

L'optogénétique est une autre approche thérapeutique indépendante de la mutation dont l'objectif est de faire exprimer par d'autres cellules rétiniennes initialement non sensibles à la lumière (cellules bipolaires, cellules ganglionnaires, cônes dormants) des protéines photosensibles de type opsine microbienne (polarisante ou dépolarisante) ou animale (Melanopsine, Rhodopsine, cone opsine). Ces cellules acquièrent alors la capacité de convertir la lumière en des signaux électriques (Sakai, Tomita, et Maeda 2022; Simunovic et al. 2019).

Dans certains cas de dégénérescence rétinienne, le segment externe de certains cônes se retrouve raccourci ou manquant, cependant, leur corps cellulaire demeure intact. Ces cônes survivants ne sont plus sensibles à la lumière et sont appelés cônes dormants (Lin, Masland, et Strettoi 2009). Ainsi, si ces cônes dormants retrouvent leur fonctionnalité une faible sensibilité à la lumière peut être restaurée. Le transfert par thérapie génique d'une opsine hyperpolarisante d'origine bactérienne (la light-activated chloride pump halorhodopsin obtenue à partir de *Natronomonas pharaoni*), a restauré les fonctions de ces cônes dormants sur des souris *rd1* et *Rho*^{-/-}, en visualisant une augmentation de leur acuité visuelle (Busskamp et al. 2010).

Les opsines hyperpolarisantes peuvent aussi être utilisées pour restaurer les réponses « OFF » sur des cellules (cellules bipolaires et ganglionnaires) de la rétine neurale (Sahel et al. 2021; Sakai et al. 2022; Wang et al. 2016; Zhang et al. 2007). Si tous les photorécepteurs sont dégradés cette stratégie peut être aussi appliquée sur les cellules rétiniennes aux réponses dites « ON » en utilisant des opsines dépolarisantes (Jones et al. 2016).

La première application de cette technologie a été faite sur un modèle murin *rd1* souffrant de dégénérescence rétinienne. Les cellules ganglionnaires de l'animal ont été activées avec succès grâce à l'injection d'un vecteur viral AAV permettant l'intégration du gène pour la channelrhodopsine ChR2. Des stimulations lumineuses avec des longueurs d'onde de 460 à 580 nm ont été opérées sur les souris transfectées et ils ont montré que 9 des 13 yeux répondaient à une stimulation de 460nm et pas à celle de 560nm ; ce qui correspond à la longueur d'onde de sensibilité de la channelrhodopsine ChR2 (Bi et al. 2006). Des résultats similaires en terme d'efficacité et de sécurité de l'optogénétique sur des cellules ganglionnaires de primates non humains ont été obtenus dans les années qui ont

suivi (Chaffiol et al. 2017; McGregor et al. 2020; Sengupta et al. 2016). Cette stratégie a été réalisée pour la première fois avec succès chez un patient de 54 ans souffrant d'une RP avancée dans le cadre d'un essai clinique de phase I/II (Sahel et al. 2021). Les cellules ganglionnaires situées au niveau de la fovéa du patient ont été transfectées avec un adénovirus contenant la protéine « light-sensing channel rhodopsin ChrimsonR ». Les patients doivent être également équipés de lunettes capables de concentrer les stimuli lumineux et d'en produire des images projetées sur la rétine. Le pic de sensibilité du ChrimsonR-tdTomato est de 590 nm (couleur ambre). Cette longueur d'onde a été choisie car la couleur ambre est plus sûre et cause moins de contractions des pupilles que la couleur bleue habituellement choisie. Sept mois après l'injection, ce système a permis au patient de recouvrir partiellement la vision, il a été capable de distinguer des livres sur une table. Une électroencéphalographie a aussi permis de détecter que l'activité électrique des cellules ganglionnaires se propage jusqu'au cortex visuel (Sahel et al. 2021). Récemment, une autre équipe a induit l'expression de ReaChR sur les cellules bipolaires ON d'une souris *rd1* souffrant de dégénérescence rétinienne. Même si l'acuité visuelle de ces souris reste moindre par rapport aux souris sauvages, les résultats restent très prometteurs (Rodgers et al. 2023).

Ainsi, toutes ces approches optogénétiques permettraient de restaurer en partie la vision des patients. Un certain nombre d'écueils sont toutefois à relever. L'application de l'optogénétique sur les cellules ganglionnaires semble être une meilleure option car les cellules ganglionnaires sont les cellules qui résistent le plus longtemps au cours de la dégénérescence rétinienne. Cependant, cela court-circuite les autres types cellulaires (les photorécepteurs, les cellules bipolaires, amacrines et horizontales) Il y a donc une perte d'intégration du signal. Par ailleurs, les cellules modifiées peuvent interagir avec les cellules environnantes de la rétine d'une manière différente de celle des photorécepteurs initialement présents. De plus, une seule opsine est implantée, codant pour un type de longueur d'onde particulier, ce qui ne reflète pas la diversité des couleurs captées par un œil sain, et celle-ci n'a pas la complexité des différents sous-types de la rétine. (Busskamp et al. 2012; Prosseda et al. 2022; Simunovic et al. 2019b).

Dans la suite de cette thèse, je m'intéresserai aux stratégies de thérapie cellulaire.

3 La thérapie cellulaire

a. Les sources des matériaux biologiques utilisés

La thérapie cellulaire consiste à remplacer les cellules rétiniennees mortes ou défectueuses par l'apport de nouvelles cellules saines. Les premières tentatives de thérapies cellulaires de la rétine ont été effectuées à partir de cellules de l'EPR sur des singes (Gouras, Flood, et Kjeldbye 1984). Depuis, plusieurs sources de cellules pour la thérapie cellulaire, ont été décrites dans la littérature. Les cellules peuvent être d'origine adulte, fœtale ou provenir de cellules souches pluripotentes (prochaine section).

Les cellules de l'EPR d'origine fœtale sont généralement obtenues sur des fœtus âgés de 10 à 15 semaines (Maminishkis et al. 2006; Zhu, Provis, et Penfold 1998). L'utilisation de ces cellules de l'EPR en suspension a montré que lorsqu'elles sont injectées entre l'EPR et les photorécepteurs de rats porteurs d'une dégénérescence rétinienne (rat RCS), ces derniers présentent une amélioration de leur acuité visuelle (Little et al. 1996). En effet, une analyse histologique montre qu'au niveau du site de la greffe, les photorécepteurs demeurent préservés. Les cellules de l'EPR fœtales injectées deviennent fonctionnelles et sont capables de phagocyter les débris des photorécepteurs (Sheng et al. 1995). D'autres études ont greffé des feuillets allogéniques fœtaux âgés de 10 à 15 semaines, comprenant la rétine neurale et l'EPR sur des patients atteints de dégénérescence rétinienne (DMLA ou RPs avec un stade très avancé et une acuité visuelle de 20/200 au mieux) (Radtke et al. 2008). 7 patients sur 10 ont montré une amélioration de leur vision à l'aide du test ETDRS (Radtke et al. 2008). Même si ces études ont obtenu des résultats encourageants, l'obtention de cellules de l'EPR et de photorécepteurs d'origine fœtale est soumise à des réglementations strictes et à de nombreuses considérations éthiques. Les réglementations en vigueur peuvent changer d'un pays à l'autre, ce qui complique leur utilisation. De plus, la Déclaration d'Helsinki a fixé les exigences pour l'utilisation de matériel humain : le consentement de la personne doit être éclairé ; il ne doit pas y avoir incitation à l'avortement ; la procuration de matériel humain, s'il n'a pas vocation à être utilisé pour la recherche, l'échantillon doit être jeté ; et l'historique du patient doit être connu (World Medical Association 2013). Une autre des contraintes à prendre en compte est la variation de l'âge du fœtus à partir duquel proviennent les cellules (Ben M'Barek et Monville 2019a). Toutes ces considérations ont mené à l'abandon progressif de cette source cellulaire.

Les cellules rétiniennees peuvent aussi être obtenues à partir de cadavres humains (greffe allogénique), ou à partir des patients eux-mêmes (greffe autologue). Des feuillets d'EPR peuvent être prélevés post-mortem depuis des donneurs adultes (Binder et al. 2007). Ce feuillet de cellules de l'EPR adulte a montré une fonctionnalité sur la survie des photorécepteurs des rats RCS comparés aux photorécepteurs des rats non greffés (Castillo et al. 1997). Dans cette étude, ils ont utilisé des feuillets rétinienens de l'EPR issus de donneurs âgés de 10 et de 49 ans, et ils ont montré que l'âge des donneurs n'avait aucun impact sur la fonctionnalité de l'EPR greffé. Ainsi, les photorécepteurs des rats RCS ont été préservés de la même manière quel que soit l'âge du donneur (Castillo et al. 1997).

Des cellules de l'EPR adulte peuvent être récoltées vers le côté nasal de la rétine, et peuvent être greffées à un autre endroit de la rétine où l'EPR est détérioré. Après que cette procédure ait été validée sur des lapins, elle a été réalisée sur des patients souffrant de DMLA néovasculaire (Binder et al. 2002;

Phillips et al. 2003). Sur les 17 patients ainsi greffés, 13 ont vu leur acuité visuelle augmenter après 17 mois (Binder et al. 2007). Malgré le fait que ces études ont montré le potentiel thérapeutique des cellules de l'EPR ou des photorécepteurs adultes (utilisation allogénique depuis des cadavres ou une utilisation autologue), leur utilisation est limitée à la quantité de cellules pouvant être obtenues, car ces cellules ont un très faible potentiel mitotique. Tout comme pour les cellules d'origine foétale, une des limitations importantes, est l'hétérogénéité des donneurs, pouvant engendrer de grandes variations entre les cellules prélevées (Ben M'Barek et Monville 2019b).

D'autres cellules autres que les photorécepteurs et l'EPR peuvent être utilisées. Ces cellules sont utilisées non pas pour remplacer un type cellulaire par un autre, mais pour apporter un effet trophique, c'est-à-dire qu'elles induisent une action bénéfique non pas en remplaçant les fonctions des cellules rétiniennes, mais par la libération de cytokines ayant un impact sur la survie des cellules. Ainsi, d'autres cellules qui ne sont pas des cellules rétiniennes ont été proposées : l'épithélium pigmentaire de l'iris, les cellules de Schwann, les progéniteurs neuronaux dérivés du cerveau, les cellules mésenchymateuses ou encore les cellules souches du cordon ombilical (Ben M'Barek et Monville 2019b). En effet, l'épithélium pigmentaire de l'iris possède la capacité de former une monocouche avec des jonctions serrées, capable de faire de la phagocytose. L'épithélium pigmentaire de l'iris pourrait être utilisé pour reformer la barrière hémato-rétinienne (Schraermeyer et al. 1997). Les cellules de Schwann sont connues pour sécréter des facteurs trophiques capables de maintenir la survie des photorécepteurs lorsque qu'ils sont greffés dans des rats RCS (Lawrence et al. 2000). Tout comme ces dernières, les progéniteurs neuronaux dérivés du cerveau sécrètent des facteurs trophiques permettant de maintenir la survie des photorécepteurs. Les cellules ont été obtenues à partir d'un fœtus humain à 21 semaines de gestation et ont été cultivées comme des neurosphères (Wang et al. 2008). Ces cellules ont été capables de préserver la vision des rat RCS durant 280 jours (Gamm et al. 2007). Les cellules mésenchymateuses ont la capacité d'acquérir une forme semblable à celle des cellules de l'EPR 2 mois après l'opération. En libérant des facteurs trophiques, elles sont capables d'améliorer la dégénérescence rétinienne de rats RCS (Inoue et al. 2007). Les cellules issues du cordon ombilical, en plus d'avoir un haut potentiel d'amplification (1×10^{17} cellules peuvent être générées à partir d'une seule), peuvent améliorer le phénotype visuel des rats RCS en libérant des facteurs trophiques comme le « brain derived neurotrophic factor » (BDNF) (facteur trophique dérivé du cerveau) (Lund et al. 2007). Les effets et facteurs trophiques engendrés sont très prometteurs, mais tout comme les approches de neuroprotection précédemment discutées, l'apport de ces cellules doit être réalisé très précocement dans les maladies rétiniennes.

Dans le prochain paragraphe, nous discuterons de l'obtention de l'EPR et des photorécepteurs à partir de cellules souches pluripotentes (CSPs).

b. Les cellules souches pluripotentes humaines

Depuis l'établissement de la première lignée de cellules souches embryonnaires humaines (CSEhs) par Thomson en 1998, l'utilisation de ces cellules s'est avérée très prometteuse dans le domaine biomédical, grâce à leur compétence d'auto-renouvellement (c'est-à-dire leur capacité à se multiplier à l'identique) et leur capacité à se maintenir dans un état pluripotent (elles gardent le

potentiel de se différencier en n'importe laquelle des cellules du corps humain). Les CSEhs sont prélevées sur des embryons âgés de 5 à 7 jours après une fécondation *in vitro*, correspondant au stade blastocyste du développement embryonnaire. Le blastocyste est composé de 3 parties, le trophoblaste périphérique qui donnera naissance à la plupart des structures extra-embryonnaires comme le cordon ombilical et le placenta ; la masse cellulaire interne (MCI) qui est constituée de cellules souches embryonnaires, capables de donner l'organisme humain entier ; et enfin une grande cavité remplie d'un liquide appelé blastocèle qui disparaîtra progressivement au cours du développement embryonnaire. Les premières CSEhs ont été isolées à partir de la MCI du blastocyste, et plus particulièrement de l'épiblaste (Thomson et al. 1998). Les méthodes de culture des CSEhs ont été optimisées avec le temps pour garantir la stabilité de leur pluripotence, caryotype et leur auto-renouvellement. Elles sont aussi très utilisées pour mieux comprendre le développement embryonnaire (Amit et al. 2000; Choi et al. 2020; Thomson et al. 1998).

Malgré le grand potentiel que représentent les CSEhs pour la recherche médicale, leur utilisation est controversée. Pour obtenir des CSEhs, une fécondation *in vitro* est nécessaire et l'embryon est détruit dans la plupart des méthodes utilisées. Cette action alimente de nombreux débats moraux, éthiques, politiques et religieux. Pour utiliser des CSEhs, il faut en France faire une déclaration préalablement à l'Agence de Biomédecine (<https://www.agence-biomedecine.fr/>) La législation varie d'un pays à l'autre : des états tels que les Etats Unis ou la Pologne ont choisi de ne pas autoriser la recherche sur les CSEhs.

Afin de pallier aux difficultés éthiques rencontrées lors de l'utilisation des CSEhs, l'équipe du Pr. Yamanaka a montré comment reprogrammer n'importe quelle cellule somatique afin de lui donner des caractéristiques similaires à celle d'une CSE : ils ont inventé les cellules souches pluripotentes induites (CSPi). Ils ont forcé des fibroblastes de souris à exprimer plusieurs facteurs de transcription associés à l'état de pluripotence des cellules souches (Oct3/4, Sox2, C-myc et Klf4) à l'aide de rétrovirus. La combinaison de la surexpression de ces quatre facteurs a été mise en évidence grâce à l'étude des 24 facteurs de transcription naturellement présents dans les ovocytes et dans les CSEs. Ces facteurs de transcription impliqués normalement dans le processus d'embryogenèse ont la capacité, quand ils sont surexprimés artificiellement ensemble dans des cellules somatiques (ce que l'on appelle « reprogrammation »), de déterminer l'état pluripotent des cellules (Takahashi et Yamanaka 2006). Oct3/4 est connu pour permettre le passage du stade de morula à celui de blastocyste, Sox2 permet de maintenir la pluripotence des CSEhs et il est impliqué dans l'auto-renouvellement. C-myc est exprimé dans les cellules à haut potentiel prolifératif, car il agit sur l'environnement de la chromatine (oncogène) et Klf4 sert à contrôler la transcription. En d'autres termes, C-myc et Klf4 modifient la structure de la chromatine, pendant que Oct3/4 et Sox2 se lient sur leur zone d'action (Okita, Ichisaka, et Yamanaka 2007; Schmidt et Plath 2012; Takahashi et Yamanaka 2006). Une fois cette stratégie de reprogrammation mise au point sur des fibroblastes de souris, celle-ci a été appliquée avec succès à des fibroblastes humains par la même équipe. Pour cela, les fibroblastes humains ont été transfectés avec les facteurs de reprogrammation précédemment cités à l'aide de lentivirus (Takahashi et al. 2007). Cependant, une étude a rapporté le rôle négatif de C-Myc comme induisant l'apoptose des CSEhs. La réactivation de C-Myc est connue pour augmenter le risque de tumeur au sein des cellules

reprogrammées (Sumi et al. 2007). Pour pallier cette difficulté l'équipe a établi un nouveau set de facteurs de transcription s'affranchissant de C-Myc qui finalement ne s'avère pas être indispensable : OCT4, SOX2, NANOG, et LIN28 (Yu et al. 2007).

Depuis, les protocoles de reprogrammation ont été améliorés et diversifiés. Les facteurs de transcription peuvent être apportés sous la forme d'ADN, d'ARN ou de protéines. Les principales différences entre ces méthodes reposent sur l'utilisation de vecteurs viraux ou non. En effet, l'utilisation de vecteurs viraux (lentivirus ou rétrovirus), peut induire quelques effets indésirables : ils peuvent s'intégrer malencontreusement sur un site oncogénique ou encore provoquer des mutations au sein de certains gènes. Ces problèmes peuvent compromettre l'utilisation des CSPis en thérapie humaine. Pour dépasser cette problématique, des systèmes non intégratifs ont été mis au point. Ils permettent certes une expression plus modérée des facteurs de transcription mais limitent les risques oncogéniques (Wuputra et al. 2020). Cependant, en dépit des grandes similitudes existantes entre les CSPis et les CSEs comme la pluripotence, de nombreuses différences ont aussi été relevées entre ces deux types cellulaires. Plusieurs études ont noté que les CSPis peuvent présenter une accumulation d'anomalies. Elles peuvent présenter des traces épigénétiques, témoignage de leurs origines cellulaires somatiques comme des méthylations de l'ADN et certaines expressions géniques (Kim et al. 2010; Noguchi, Miyagi-Shiohira, et Nakashima 2018). A cause de cette variabilité, ces différences peuvent induire des différences de rendements entre deux expériences de différenciations en fonction des lignées CSPis étudiées (Ohnuki et Takahashi 2015).

4 Génération de photorécepteurs et de cellules de l'EPR à partir des CSPhis ou des CSEhs

Au cours des dernières décennies, de grandes avancées ont été réalisées dans le développement de protocoles pour la génération de cellules rétinienne à partir de CSEhs ou de CSPhis. Ces progrès ont été permis grâce aux connaissances antérieures du développement embryonnaire de la rétine des vertébrés. Dans ce chapitre, je vais donc dans un premier temps décrire le développement embryonnaire de la rétine avant de présenter les différents protocoles de différenciation en cellules de la rétine.

a. Embryologie de l'œil et de la rétine

1. Durant la période embryonnaire

La mise en place de l'œil au cours de la période embryonnaire demande la contribution de différents feuilletts embryonnaires issus de la gastrulation, présents chez l'embryon : le neuroectoderme, l'ectoderme de surface, le mésoderme. La neurorétine et l'EPR dérivent du tube neural antérieur, qui lui-même dérive du neuroectoderme.

Chez l'homme, le développement embryonnaire de l'œil commence au cours de la troisième semaine post conception, alors que la taille de l'embryon est de 2mm. À ce moment-là, le tube neural n'est pas encore fermé, deux dépressions commencent à apparaître au niveau de la partie antérieure de la gouttière neurale : ce sont les fossettes optiques.

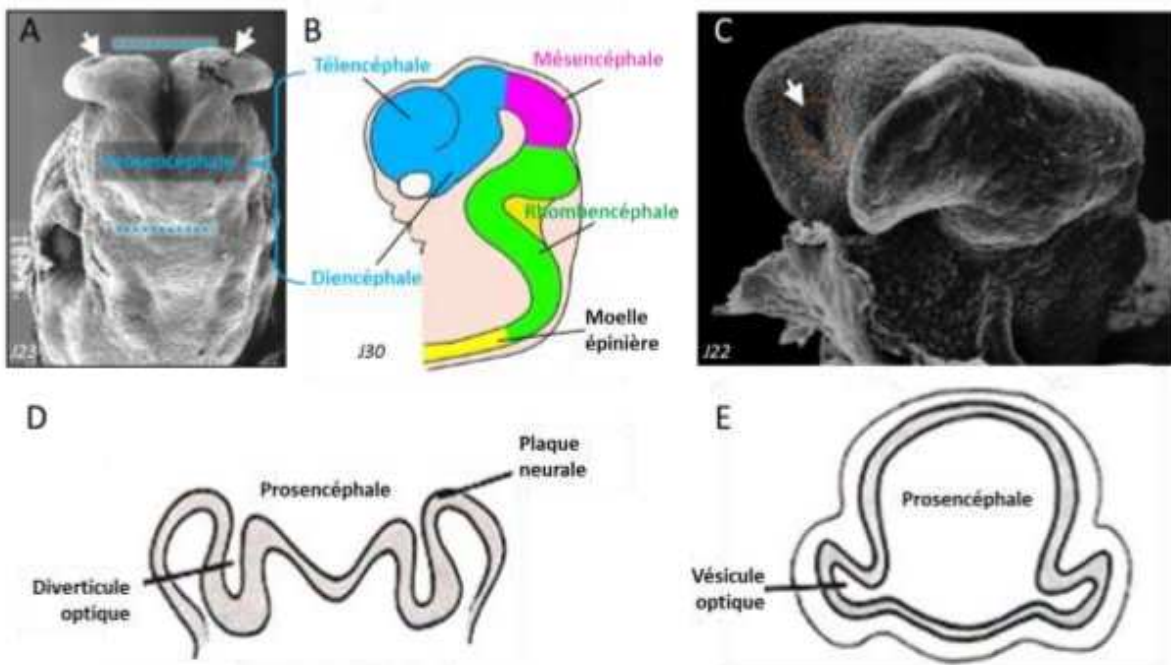


Figure 13 : Embryologie de l'œil et de la rétine. A. A partir du 28^{ème} jour de développement, les évaginations optiques sont visibles dans le neuroépithélium. B. Représentation en vue latérale de gauche des sous divisions anatomiques du cerveau apparaissant à partir de la 6^{ème} semaine. Le petit cercle blanc représente la vésicule optique. C. Photo obtenue en microscopie électronique à balayage d'un embryon humain à J22 en vue fronto-latérale. La flèche blanche montre le diverticule optique. D. Coupe

transversale du cerveau antérieur et des champs optiques à J22. E. Coupe transversale du cerveau antérieur et des champs optiques à J26. A ce moment-là, les bourrelets du diencephale se referment (Image issue de Creuzet, 2017 (Creuzet et Etchevers 2017)).

Toutes ces étapes de l'embryogenèse sont régulées par des facteurs extrinsèques et intrinsèques. Pour comprendre le développement embryonnaire de l'œil, il est nécessaire de récapituler les principales voies de signalisation.

Dans un premier temps, il y a la spécification du territoire oculaire grâce à la spécification des cellules de la plaque neurale antérieure. L'induction neurale est permise grâce à l'activation des voies FGF (Fibroblast Growth Factor) et IGF (Insuline-like Growth factor) et par l'inhibition des voies activine/Nodal, bone morphogenic protein (BMP) et de Wnt/ β -catenin (Chambers et al. 2009; Fuhrmann 2008; Smith et al. 2008). Puis, le tube neural se divise en quatre aires distinctes : le télencéphale, le diencephale, le mésencéphale et le rhombencéphale (**Figure 13**). Cette régionalisation est induite grâce à la sécrétion de molécules comme l'acide rétinoïque (AR), et la sécrétion graduelle le long de l'axe antéro-postérieur de molécules régulées par les voies Wnt, BMP et Nodal (Piccolo et al. 1999). Au niveau du diencephale, tout juste régionalisé, la mise en place du champ oculaire s'installe grâce à l'expression de différents facteurs de transcription du champ visuel « Eye Field Transcription factor » (EFTFs) : *Pax6*, *Otx2*, *Rax*, *Sox2*, *Six6*, *Six3*, *Lhx2* (études réalisées sur la souris) (Zuber 2010; Zuber et al. 2003). Le premier de ces facteurs de transcription à s'exprimer est *Otx2*, il permet la mise en place des autres facteurs de transcription du champ visuel. En effet, il est très précocement exprimé car il se retrouve dans le cerveau antérieur au cours de l'embryogenèse précoce (Heavner et Pevny 2012). *Otx2* est connu pour se fixer en amont du promoteur de *Rax*, induisant son expression (étude réalisée sur la souris) (**Figure 14**). Un des autres facteurs de transcription du champ visuel intervenant très tôt est *Six3*. *Six3* peut induire à lui seul de manière ectopique, la formation de la cupule optique au niveau du mésencéphale, il a donc un rôle très important dans la mise en place du champ oculaire en inhibant *Wnt1* et participant ainsi à la mise en place du gradient Wnt (Fujimura 2016).

Afin de permettre la séparation du champ oculaire en deux, le mésoderme axial induit la sécrétion de différents facteurs de croissance indispensables comme FGF, sonic hedgehog (Shh) et TGF- β . Le premier à intervenir est Shh, qui est normalement exprimé dans le cerveau antérieur ventral (Echelard et al. 1993). Shh est lui-même régulé en amont par le facteur Nodal, appartenant à la superfamille TGF- β (Kumar et al. 2001). Ces deux facteurs en interaction participent à l'inhibition de *Pax6* dans la ligne médiane, ce qui entraîne la formation des deux champs optiques (Choy et Cheng 2012; Gallardo et Bovolenta 2018). L'expression de Shh est directement induite par *Six3* au niveau de la ligne ventrale du diencephale. Ces facteurs de croissance ainsi que *Six3* sont indispensables pour l'établissement d'une vision binoculaire (Spence et al. 2004; Zhao, Wang, et Temple 2017).

L'expression des gènes *Pax6* et *Lhx2* sont d'importants régulateurs pour la progression de la vésicule optique vers le stade de cupule. Ces deux gènes coopèrent de manière synergique afin de permettre l'expression de *Six6* (Craenen et al. 2020; Roy et al. 2013).

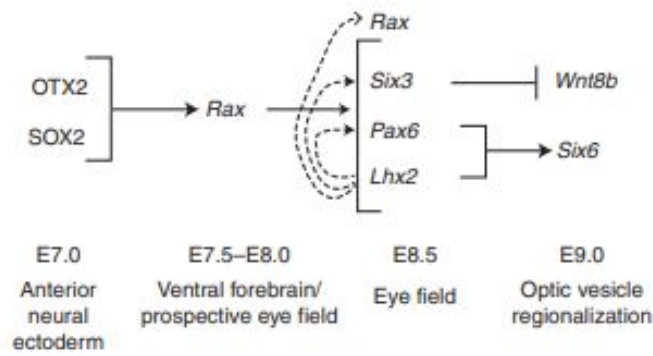


Figure 14 : Réseau des facteurs de transcription établissant le champ visuel ou « Eye field » chez la souris. Les facteurs de transcription *Otx2* et *Sox2* activent *Rax*. *Rax* est lui-même requis pour l'activation de *Lhx2*, *Pax6*, *Six3*. *Lhx2* peut moduler l'expression de *Rax*, *Pax6* et *six3*. Extrait de Heavner et Pevny, 2012 (Heavner et Pevny 2012).

2. La mise en place de la cupule optique

Dans les jours qui suivent, une croissance des deux champs optiques a lieu grâce à l'évagination des parois latérales du diencephale, ce qui conduit à la formation des vésicules optiques (**Figure 13**). Cette évagination s'effectue grâce à *RAX*. A la fin de la période embryonnaire (à la fin de la 8^{ème} semaine de développement chez l'homme), la rétine apparaît comme clairement structurée en deux parties distinctes, exprimant chacune des facteurs de transcription spécifiques. La partie la plus dorsale de la cupule optique, formera le futur EPR et commencera à exprimer *MITF* (*Microphthalmia-associated transcription factor*). La partie la plus distale de la cupule optique est composée par une couche de cellules beaucoup plus épaisses, qui formera la rétine neurale. Ces cellules expriment *Vsx2* (*Visual system homeobox 2*) (Liu et al. 1994). L'EPR apparaît grâce à l'activine A qui active l'expression du gène *Mitf*, lui-même activé par *Otx2*. De manière synergique, l'activation des voies Shh, BMP et Wnt permettent l'apparition et la maturation de l'EPR (Spence et al. 2004; Zhao, Wang, et Temple 2017). De l'autre côté, la rétine neurale émerge grâce au FGF (sécrété de manière adjacente par l'ectoderme de surface) qui induit l'expression de *Vsx2* (Reese 2011; Zhao, Wang, et Temple 2017; Zheng et al. 2010). Ces deux structures ne sont pas en contact directement l'une avec l'autre, il persiste un espace sous rétinien étroit, vestige de la cavité ventriculaire de la cupule optique. En effet, ces structures exercent une répression mutuelle grâce à la capacité de *VSX2* à réprimer *MITF*, permettant la délimitation entre la future rétine neurale et l'EPR (étude réalisée chez la souris, puis confirmée à l'aide des CSPhis) (Gamm et al. 2019; Horsford et al. 2005). Le TGF- β sécrété par le mésenchyme péri-oculaire inhibe l'expression de *VSX2* dans la région la plus dorsale et permet ainsi l'expression de *MITF* (Creuzet et Etchevers 2017; Heavner et Pevny 2012; Miesfeld et Brown 2019).

3. La neurogenèse de la rétine

La rétine primitive se compose d'une zone nucléaire, et d'une zone acellulaire intérieure. Les différentes couches de la rétine neurale se différencient de manière graduelle, en commençant au niveau du pôle postérieur jusqu'à l'intérieur de la rétine (Fuhrmann, Zou, et Levine 2014). Ce processus commence à la 7^{ème} semaine de développement chez l'homme. Deux couches apparaissent de

manières distinctes, séparées par une couche de cellules prolifératives, la couche transitoire de Chievitz (Smirnov et Puchkov 2004). La rétine neurale est constituée d'un certain nombre de cellules progénitrices rétiniennes (CPRs) capables de se différencier en chacun des sept types cellulaires constituant la rétine mature. Pour augmenter la quantité de CPRs, les cellules doivent se diviser un certain nombre de fois, avant de sortir du cycle cellulaire et de s'engager vers un destin cellulaire précis (Buenaventura, Ghinia-Tegla, et Emerson 2018; Wang et Cepko 2016). La population des CPRs se distingue en deux populations cellulaires : celle qui sort du cycle cellulaire pour devenir les premiers types cellulaires de la rétine ; et celle qui continue à proliférer pour être capable de générer en quantité suffisante les cellules de la rétine apparaissant plus tardivement (Donovan et Dyer 2005; Holt et al. 1988; Young 1985).

Au niveau de la face interne de la couche nucléaire, les premières cellules commençant à se différencier, sont les cellules ganglionnaires, leurs axones vont alors converger pour former le nerf optique (Hoshino et al. 2017; Martins et Pearson 2008). Après l'apparition de ces cellules, se différencieront plus tard, les cellules horizontales et les cônes. Les bâtonnets, les cellules bipolaires et les cellules gliales de Müller sont les cellules rétiniennes apparaissant en dernier (O'Hara-Wright et Gonzalez-Cordero 2020) (**Figure 15**).

De nombreux facteurs de transcription régulant l'apparition des différents types cellulaires ont été décrits. Ainsi, *Atoh7* est un des facteurs qui favorise l'apparition des cellules ganglionnaires au détriment des bâtonnets, s'il est surexprimé. De même, la répression de *Atoh7* est indispensable à l'apparition des cellules horizontales et amacrine (Brodie-Kommit et al. 2021; Jusuf et al. 2012).

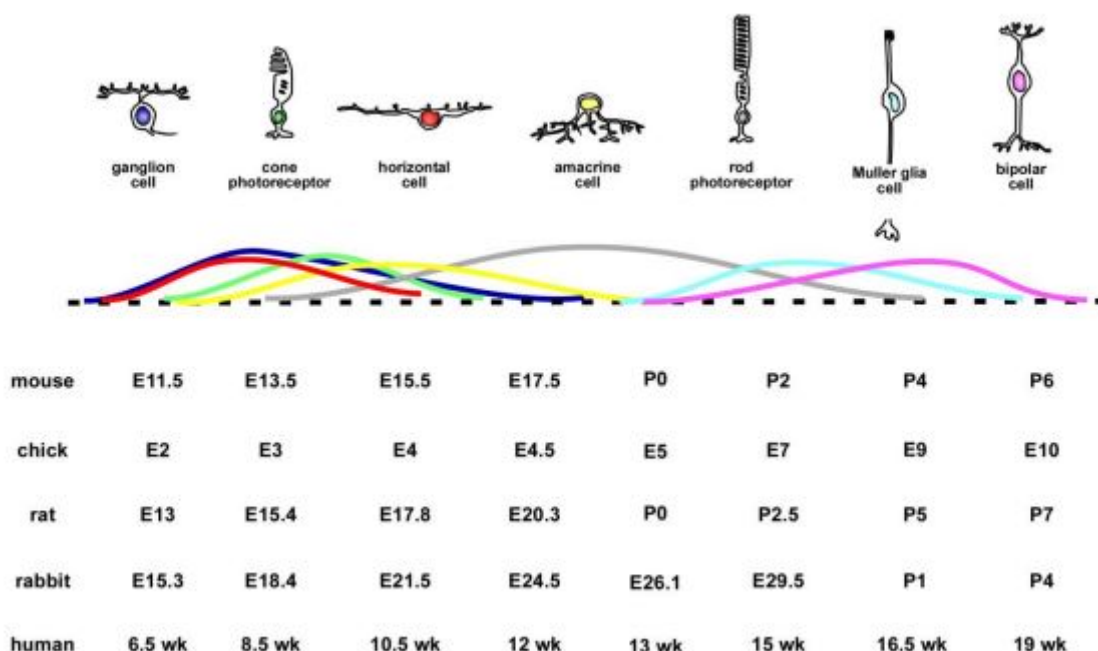


Figure 15 : Apparition séquentielle des cellules rétiniennes composant la rétine neurale chez différentes espèces (extrait de Martins and Pearson, 2008) (Martins et Pearson 2008).

Beaucoup de gènes sont impliqués dans la différenciation des photorécepteurs, comme *Notch1*, *Rax*, *Otx2*, *Blimp1*, *Vsx2*, *Foxn4* et *Oc1* (Wang et Cepko 2016). La perte de fonction de ces gènes induit la réduction du nombre de photorécepteurs. La différenciation terminale des photorécepteurs est régulée par plusieurs facteurs comme l'inhibition de Wnt qui est requise en continu pour permettre la différenciation depuis le stade de la vésicule optique jusqu'aux photorécepteurs (bâtonnets et cônes) (Fuhrmann 2008). L'expression de *CRX* est aussi indispensable, pour la différenciation des cônes et des bâtonnets.

Chez la souris, *Thrb* et *Oc1* sont des marqueurs précoces des cônes (Emerson et al. 2013; Ng et al. 2001). Les activités du récepteur de l'hormone thyroïdienne ($\text{Thr}\beta 2$) (positive puis négative) et de *Rxrg* (négative) sont aussi indispensables pour générer les cônes S et M (Figure 16) (Brzezinski et Reh 2015). L'activation de la voie de signalisation du FGF entre aussi en considération sur l'apparition des cônes (Hochmann et al. 2012), tandis que l'activation de la voie Shh permet la différenciation des bâtonnets (Levine et al. 1997). De manière plus tardive, les gènes caractéristiques des cônes sont *OPSINE* et *RXRG*. La répression de *Oc1* induit la formation des bâtonnets, car cela induit l'expression de la *Rhodopsine*. Chez le poulet, *Neural leucine zipper (Nrl)* permet la différenciation des bâtonnets (Mears et al. 2001). L'expression des gènes *Nrl*, *Rhodopsine* et *Nr2e3* sont indispensables pour la différenciation terminale des bâtonnets (Oh et al. 2008).

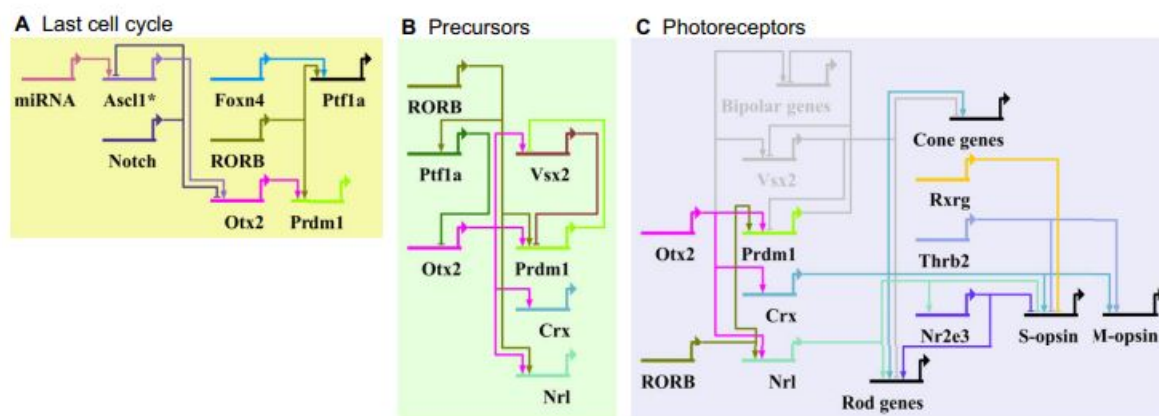


Figure 16 : Les réseaux de gènes impliqués dans le développement des photorécepteurs. A. Les gènes impliqués dans les cellules du champ visuel B. Les gènes impliqués dans les CPRs. C. Le réseau de gènes impliqué dans la génération des différents sous-types de photorécepteurs. Extrait de (Brzezinski et Reh 2015).

La maturation des photorécepteurs se poursuit au cours des mois suivant la naissance, les segments internes et externes s'allongent. Les bâtonnets finissent leur différenciation jusqu'à 4 mois après la naissance chez l'homme (O'Hara-Wright et Gonzalez-Cordero 2020)

4. Etablissement de l'EPR depuis le stade de la cupule optique

La partie la plus dorsale de la cupule optique formant le futur EPR, exprime déjà *Mitf* grâce à la présence antérieure de *Lhx2*, *Otx2* et *Rax*. La présence de *Lhx2* agit de manière passive en permettant

l'expression de *Mitf* (Yun et al. 2009). Ces éléments induisent la conversion de la couche dorsale pluristratifiée de la cupule optique en une couche monocellulaire. De plus, il a été montré que la présence du facteur de transcription *Pax6* tout au long de la différenciation de l'EPR est essentielle. L'activation des voies Wnt et β -caténine sont requises pour convertir les cellules progénitrices rétiniennes en des cellules de l'EPR. En effet, le facteur de croissance EGF (Epidermal Growth Factor) sécrété par les CPRs voisines permet grâce à l'activation de la β -Catenin, la prolifération des cellules de l'EPR (Steindl et al. 2010). De la même manière, le facteur de croissance TGF- β sécrété par le mésenchyme sous-jacent induit aussi la prolifération des cellules de l'EPR.

L'activation de la voie Wnt dans l'ectoderme de surface superposant la cupule optique induit l'activation de la voie BMP, indispensable pour la spécification et la pigmentation de l'EPR (Steinfeld et al. 2013). *PAX6* et *MITF* doivent aussi être exprimés en symbiose pour permettre la pigmentation et la mélanogenèse de l'EPR (Bharti et al. 2012). De nombreux facteurs de transcription et voies de signalisation sont requis pour induire la différenciation terminale de l'EPR : *PAX2*, *PAX6*, *PAX5*, *GAS1*, *COUPTF1/2*, *Shh*, *BMP* et l'acide rétinoïque (Fuhrmann et al. 2014; Gupta et al. 2023). L'actine corticale du cytosquelette des cellules de l'EPR est une structure dynamique qui permet la morphogenèse de l'EPR, et l'induction des microvillosités. Les microvillosités des cellules de l'EPR apparaissent peu de temps avant la naissance grâce à la présence de la protéine Ezrin. Deux semaines après la naissance, le niveau de protéique de l'Ezrin est multiplié par quatre afin d'induire la maturation finale des cellules de l'EPR et la formation des microvillosités (Bonilha, Finnemann, et Rodriguez-Boulan 1999).

Au final, la croissance du globe oculaire se poursuit jusqu'à l'âge de deux ans. Chez l'homme, la zone rétinienne a une aire de 600mm^2 à la naissance, et grandit jusqu'à 800mm^2 à l'âge de 2 ans (Creuzet et Etchevers 2017; Martins et Pearson 2008).

b. Différenciation des CSPhs en EPR *in vitro*

De nombreux protocoles (**Table 2**) ont été mis au point ces dernières années pour générer des cellules de l'EPR à partir de CSPhs. Deux stratégies de différenciations des cellules de l'EPR ont été développées : certaines différenciations sont dites « spontanées », et d'autres sont dites « dirigées ».

References	Type of hPSC	Culture conditions	Differentiation duration	Differentiation efficiency	Markers of RPE lineage (immunofluorescence)	Functional assays
3D aggregates / Suspension culture						
Osakada et al., 2008	hESCs	<i>Directed differentiation – SFEB culture</i> D0-D20: Dkk-1, Lefty-A <i>Adherent culture after D20</i>	60 days	30.6% MITF+/Pax6+ cells (D50) 34.7% ZO-1+ cells (D120)	Pax6, MITF (D50), ZO-1 (D120)	Phagocytosis
Meyer et al., 2009	hESCs, hiPSCs	<i>Spontaneous differentiation - 3D aggregates</i> D0-D6: neural induction medium (N2, heparin) <i>Adherent culture after D6 (B27)</i>	40 days	hESC: 25% MITF+ cells (D40) hiPSC: 19% MITF+ cells (D21-28)	Pax6, MITF, ZO-1 (D30-40)	No data
Idelson et al., 2009	hESCs	<i>Directed differentiation – Cluster floating</i> D0-D7: Nicotinamide <i>Adherent culture after D7</i> D21-D35: Nicotinamide, Activin A	6 weeks	33.4% of pigmented cells (6 weeks)	MITF, Pax6, ZO-1, RPE65, CRALPB, BEST1 (9-15 weeks)	Transplantation in dystrophic RSC rats, phagocytosis
Osakada et al., 2009	hESCs, hiPSCs	<i>Directed differentiation – SFEB culture</i> D0-D21 : CKI-7, SB431542 <i>Adherent culture after D21</i>	40-60 days	hESC: 22.8% MITF+ total cells (D30) hiPSC: 22.1% MITF+ total cells (D35)	Pax6, MITF (D35), ZO-1 (D90-100)	Phagocytosis
Hirami et al., 2009	hiPSCs	Same as Osakada 2008	40 day	29.8% MITF+/Pax6+ total colonies (D35)	Pax6, MITF (D35)	No data
Kokkinaki et al., 2011	hiPSCs	<i>Directed differentiation – EBs</i> D1-D21: Nicotinamide D21-D35: Nicotinamide, Activin A, SB431542 <i>Adherent culture on the 6th week (nicotinamide for 3-5 weeks)</i>	35 days	37% of pigmented clusters (4-6 weeks) >90% by the end of the 8 th week	ZO-1, Best1, RPE65 (10 weeks)	Phagocytosis, VEGF secretion, electrophysiology (D80)
Nakano et al., 2012	hESCs	<i>Directed differentiation – SFEB culture</i> D0-D18: Matrigel, IWR1e, FBS, SAG D15-D18: CHIR99021	25-40 days	No data	MITF	No data
Phillips et al., 2012	hiPSCs	<i>Spontaneous differentiation - 3D aggregates</i> D0-D6: neural induction medium (N2, heparin) <i>Adherent culture after D6 (B27)</i>	40-50 days	No data	MITF (D49), Ezrin, Best1, ZO-1 (D66),	No data
Singh et al., 2013	hiPSCs	<i>Spontaneous differentiation - 3D aggregates</i> D0-D6: neural induction medium (N2, heparin) <i>Adherent culture after D6 (B27)</i>	30-40 days	No data	ZO-1, Ezrin and BEST1 (P1/P3)	Phagocytosis, PEDF/VEGF secretion, TER measurements, calcium responses (P1/P2)
Zhu et al., 2013	hESCs, hiPSCs	<i>Directed differentiation – 3D aggregates</i> D0-D5: neural induction medium (N2B27) <i>Adherent culture after D5 (Activin A)</i>	30 days	hESC: 95.7% pigmented cells (D30) hiPSC: 48% pigmented cells (D30)	Pax6, MITF (D22), ZO-1 (D30), RPE65, BEST1 (D40)	Phagocytosis, TER measurements (D8-D50), transplantation in dystrophic RSC rats
Zhong et al., 2014	hiPSCs	<i>Spontaneous differentiation – 3D aggregates</i> D0-D6: neural induction medium (N2, heparin) <i>Adherent culture after D7 (B27; after D16: B27)</i>	30 days	19% MITF+ cells (D21-D28)	Pax6, MITF	No data
Adherent culture						
Vugler et al., 2008	hESCs	<i>Spontaneous differentiation</i> bFGF removal, manual enrichment	6-7 weeks	No data	OTX1/2, Pax6, PMEL17, MITF, CRALBP, RPE65, ZO-1, BEST1 (6-7 weeks)	Phagocytosis, transplantation into RCS rats
Carr et al., 2009	hESCs, hiPSCs	<i>Spontaneous differentiation</i> bFGF removal + manual enrichment	4-6 weeks	No data	OTX2, Pax6, RPE65, PMEL17, MITF (6-8 weeks)	Phagocytosis, transplantation into RCS rats
Zahabi et al., 2012	hiPSCs	<i>Directed differentiation</i> D0-D6: bFGF, Noggin or SB431542 D6-D12: bFGF, retinoic acid D12-D18: bFGF, SHH Manual enrichment (D30)	40-60 days	57.4% MITF+ cells 39.3% BEST1+ cells 39.7% RPE65+ cells 30.5% CRALBP+ cells (D60)	MITF, PAX6, OTX2, and ZO1 (D40), RPE65 (D60), BEST1	No data
Krohne et al., 2012	hiPSCs	<i>Directed differentiation</i> D0-D21: Nicotinamide D21-D35: Nicotinamide, activin A After D35: Nicotinamide Manual enrichment (D42)	6-10 weeks	No data	BEST1, CRALBP, RPE65, ZO-1 (8 weeks)	Phagocytosis, PEDF/VEGF secretion, transplantation into RCS rats
Buchholz et al., 2013	hESCs, hiPSCs	<i>Directed differentiation</i> D0-D2: Noggin, Dkk1, IGF1, Nicotinamide D2-D4: same with bFGF D4-D6: IGF1, Dkk1, Activin A	14 days	78.5% (hESC), 63% (hiPSC) PMEL17+ cells (D14)	Pax6, MITF, OTX2, PMEL17, ZO-1 (D14)	Phagocytosis (D44)

Maruotti et al., 2013	hESCs, hiPSCs	<i>Spontaneous differentiation</i> Progressive enrichment by serial passage	50-115 days	16% RPE65+ cells (D50) >96% MITF+, >97% RPE65+ cells (D115, hESC)	MITF, OTX2, BEST1, ZO-1, RPE65 (P1)	Phagocytosis, VEGF secretion, transplantation into albinos NOD-scid mice
Reichman et al., 2014	hiPSCs	<i>Spontaneous differentiation</i> bFGF removal + manual enrichment (D14)	30 to 45 days	No data	MITF, ZO-1 (D45)	Phagocytosis
Leach et al., 2015	hESCs	<i>Directed differentiation</i> D0-D2: Noggin, IGF1, Dkk1, Nicotinamide D2-D4: same with bFGF D4-D6: IGF1, Dkk1, Activin A D6-D8: Activin A, SU5402 D8-D14 : CHIR99021, Activin A, SU5402	14 days	97,77% PMEL+ cells (D14)	OTX2, MITF, PMEL17, RPE65, ZO-1 (D134)	Phagocytosis, PEDF/VEGF secretion (D134)
Maruotti et al., 2015	hESCs, hiPSCs	<i>Directed differentiation</i> D0-D14: nicotinamide, chetomin	35-63 days	45-60% PMEL17+ cells (D35) >95% MITF+, >92% PMEL17+ cells (D63)	MITF, PMEL17, ZO-1 (D65), BEST1, RPE65 (D95)	Phagocytosis, VEGF/PEDF secretion, transplantation into NOD-SCID albino mice
Lidgerwood et al., 2016	hESCs, hiPSCs	<i>Directed differentiation</i> Taurine, hydrocortisone, triiodothyronine, IGF1, Dkk1, Noggin, bFGF	40-60 days	>90% PMEL17+ cells (D90)	MITF, PMEL17, RPE65, BEST1, ZO-1 (D90)	Phagocytosis, functional K+ transport
Choudhary et al., 2017	hESCs, hiPSCs	<i>Directed differentiation</i> (passage D9 and D28) D2-D6: LDN-193189, SB-431542 D6-D9: BMP4-7 D9-D28: Activin A	45 days	>90% CRALBP+ cells (D48)	PMEL17, Best1, ZO-1, MERTK, CRALBP (D42)	Phagocytosis, VEGF/PEDF secretion (7-10 weeks)
Régent et al., 2019	hESCs	<i>Directed differentiation</i> D0-D7: Nicotinamide D7-D14: Activin A D14-D42: CHIR99021	42 days	82.2% (D42), 94.7% (D83) Pax6+/MITF+ cells 96.8% TYRP1+ cells (D83)	MITF, Pax6, Ezrin, ZO-1, BEST1, MERTK (D83)	Phagocytosis, VEGF secretion
Michelet et al., 2020	hESCs, hiPSCs	<i>Directed differentiation</i> - passage around D30-35 D7-D18/21: activin A	60-90 days	35-40% pigmented cells (D30-35)	ZO-1	Phagocytosis, VEGF secretion, TER measurements (D65-75)

Table 2 : Liste des protocoles utilisés pour générer des cellules de l'EPR à partir de CSPhs, avec les références des protocoles utilisés, la source des cellules, les conditions de cultures, les durées des différenciations, les rendements obtenus, les marquages obtenus en fluorescence et les expériences effectuées déterminant la fonctionnalité de l'EPR (extrait de (Morizur et al. 2020)).

Les premières différenciations spontanées des CSPhs en cellules de l'EPR ont été réalisées en retirant simplement le FGF2 présent dans les milieux de cultures spécifiques à la maintenance des caractères pluripotents des CSPhs (Carr et al. 2009; Klimanskaya et al. 2004; Vugler et al. 2008). Environ 4 semaines après le retrait du FGF2, des régions pigmentées visibles à l'œil nu commencent à apparaître à la surface du tapis cellulaire et les cellules adoptent une morphologie hexagonale. Après 8 à 12 semaines de différenciation, ces zones sont assez grosses pour être isolées manuellement (à l'aide d'un scalpel sous une loupe binoculaire), puis elles sont amplifiées afin d'obtenir une population pure de cellules de l'EPR (Ben M'Barek et al. 2017; Buchholz et al. 2009; Ferguson et al. 2015).

Cependant, les différenciations dites spontanées sont longues (entre 2 et 3 mois) et fastidieuses, elles présentent des variabilités inter opérateurs et ne permettent pas de produire de larges banques de cellules car elles présentent un pourcentage faible d'environ 3 % des CSPhs qui se différencient en cellules de l'EPR co-exprimant PAX6 et MITF après 42 jours de différenciation (Regent et al. 2019). Afin de pallier ces limitations, d'autres protocoles ont été développés pour mieux diriger la différenciation en cellules de l'EPR en ajoutant des petites molécules et/ou cytokines connues pour orienter la différenciation vers l'EPR en suivant les étapes du développement embryonnaire. Ainsi, ces protocoles sont dits dirigés. Certains de ces protocoles permettent également d'éviter la phase de sélection et d'amplification manuelle (Regent et al. 2019).

La formation de corps embryoïdes (amas de cellules cultivées en suspension) est nécessaire dans certains protocoles dirigés. Ces corps embryoïdes sont ainsi cultivés dans un milieu d'induction

neurale, supplémenté de N2, puis ceux-ci sont remis en adhérence dans des plaques de culture recouvertes de matrigel ou de laminine avec un milieu contenant du B27 (Meyer et al. 2009; Phillips et al. 2012; Singh et al. 2013; Zhong et al. 2014). L'ajout d'antagonistes aux voies Wnt (DKK1) et Nodal (Lefty A) sur des corps embryoides sans ajout de sérum a permis d'améliorer les protocoles et d'obtenir un rendement de 30/35% de différenciation en cellules de l'EPR (co-expression de PAX6 et MITF) après 40 jours de différenciation (Hirami et al. 2009; Osakada et al. 2009). De la même manière, l'addition de nicotinamide et d'Activin A permet d'obtenir environ 40% de cellules de l'EPR en seulement 6 à 8 semaines de différenciation (Idelson et al. 2009; Kokkinaki, Sahibzada, et Golestaneh 2011). La nicotinamide fait partie de la famille de la vitamine B, elle a été reconnue comme jouant un rôle essentiel dans la différenciation des cellules de l'EPR, ce qui souligne l'importance du métabolisme dans la différenciation des cellules de l'EPR (Buchholz et al. 2013). D'autres équipes ont également rapporté la présence de cellules de l'EPR au sein de la partie la plus externe des organoïdes de rétine (Nakano et al. 2012). L'étude de Nakano et al., 2012 a généré ces structures en utilisant un milieu de culture contenant du sérum de veau foetal et des molécules modifiant la signalisation des voies BMP et Wnt. Ces protocoles ont permis de générer, à des rendements très bas, des populations de cellules de l'EPR pures et capables de proliférer.

D'autres protocoles utilisent d'autres types de cytokines et des petites molécules directement sur le tapis cellulaire, sans passer par une étape de corps embryoides. Dans un premier temps, les protocoles furent développés en utilisant Noggin et SB431542 afin d'inhiber les voies Activine et BMP pour engager la différenciation neuroectodermique (Buchholz et al. 2013). Puis des molécules connues pour inhiber la voie Wnt/ β -caténine comme DKK-1 furent utilisées car elles permettent de promouvoir le devenir des cellules au niveau où se forme le champ oculaire sur le tube neural (Buchholz et al. 2009). Au contraire, un autre protocole démontre une meilleure différenciation en activant la voie Wnt/ β -caténine grâce à l'addition de petites molécules comme le CHIR99021 (Leach et al. 2015). L'IGF-1 a aussi été utilisée car sa modulation induit la formation de structures oculaires en 3D (**Table 2**) (Lamba et al. 2006; Mellough et al. 2015). Ces protocoles dirigés sont marqués par l'ajout de plusieurs cytokines, permettant d'obtenir des protocoles à très haut rendement de cellules de l'EPR (environ 80%) et de manière plus rapide en environ 40 jours par rapport à la différenciation dite spontanée (Buchholz et al. 2013; Leach et al. 2015; Regent et al. 2019).

Afin d'augmenter la quantité de cellules de l'EPR pouvant être produite, mais aussi pour pouvoir produire de larges banques de cellules dans une visée thérapeutique, notre équipe et d'autres ont récemment développé des protocoles complètement automatisés permettant de produire plusieurs milliards de cellules de l'EPR (Matsumoto et al. 2019; Regent et al. 2019; Truong et al. 2021). Les protocoles dirigés sont particulièrement adaptés à la mise en place de systèmes automatisés. L'étude de Crombie et al., 2017 a permis de mettre en lumière que le maintien à long terme et le passage des CSPhis peut être fait par une plateforme automatisée, et a suggéré la faisabilité de différenciation des cellules de l'EPR de cette manière (Crombie et al. 2017). Puis, Matsumoto et al. 2019 a montré que les cellules de l'EPR peuvent être différenciées à partir de CSPhis dans un système complètement automatisé et fermé de culture cellulaire (Matsumoto et al. 2019). De la même manière, notre équipe a récemment développé un processus entièrement automatisé permettant la production à grande échelle de cellules RPE (16 milliards) à partir de CSPhis complètement fonctionnelles et matures en seulement 12 semaines en un seul cycle de production (Regent et al. 2019). Une autre étude a montré

qu'il est possible d'utiliser un système automatisé couplé à une intelligence artificielle. Celui-ci a permis de tester 143 conditions différentes en 111 jours parmi les 200 millions possibles afin d'améliorer les protocoles de génération de l'EPR à partir de CSPHis (Kanda et al. 2022).

Plusieurs contrôles qualité peuvent être réalisés afin d'assurer la qualité et la maturation optimale de l'EPR nouvellement différencié. L'identité morphologique des cellules de l'EPR peut être déterminée visuellement : l'EPR doit être pigmenté grâce à la présence de mélanine et ses cellules doivent avoir une forme hexagonale, comme décrit dans la **partie I.1.1.d.** précédente. Dans un second temps, la pureté de l'EPR doit être également évaluée, à l'aide de techniques comme la cytométrie en flux, la qPCR ou l'immunofluorescence. Dans un dernier temps, la fonctionnalité de l'EPR doit être prouvée.

L'expression protéique des gènes de l'EPR peut être quantifiée grâce à la cytométrie en flux ou en immunofluorescence afin d'évaluer la pureté de l'EPR nouvellement produit (Regent et al. 2019). Comme mentionné dans la **partie I. 1. 4.** les gènes de l'EPR exprimés sont *PAX6*, *MITF*, *RPE65*, *CRALBP* et *BEST1* et sont mesurés par RT-qPCR et par PCR. L'immunofluorescence permet de visualiser les protéines précédemment citées, mais aussi de démontrer la localisation apicale des protéines EZRIN, ZO-1 ou MERTK, et la localisation basale de BESTROPHIN (Regent et al. 2019). Pour évaluer la fonctionnalité de l'EPR, plusieurs tests peuvent être réalisés, comme la mesure de la résistance trans-épithéliale. Cette technique consiste à assurer que l'EPR présente des jonctions serrées entre les cellules le composant. Un voltmètre mesure la différence de potentiel entre les deux faces de l'épithélium placé sur un insert de culture en mettant une électrode de chaque côté. Si cette différence est nulle, l'EPR présente des jonctions perméables. En revanche, plus les valeurs sont élevées, plus l'EPR est jointif (Cao et al. 2018). Le test ELISA permet, quant à lui, de quantifier de manière précise, dans le milieu d'une culture à deux compartiments, la sécrétion polarisée de « vascular endothelial growth factor » (VEGF) par l'EPR, celle-ci doit être plus importante du côté basal que du côté apical lorsque l'EPR est mature. Une autre des fonctions de l'EPR est sa capacité à phagocyter les débris de segments externes usagés des photorécepteurs. Afin de démontrer cette fonction, l'EPR peut être exposé en culture à des segments externes de photorécepteurs de cochon marqué avec un fluorophore (FITC). Une fois le composé phagocyté, la fluorescence est retrouvée à l'intérieur des cellules et elle peut être quantifiée. Généralement, ce sont ces paramètres biologiques qui sont utilisés afin d'établir le contrôle qualité d'un EPR. Actuellement, aucun test standardisé ne permet pour le moment de contrôler les paramètres biomécaniques de la surface de l'EPR durant sa maturation (module de Young, variation de hauteur). Les propriétés mécaniques des cellules sont déterminées par le cytosquelette sous-jacent (le réseau d'actine) et ces paramètres dépendent de l'organisation des cellules (Fabian et al. 2019). Ainsi, évaluer ces propriétés pourrait être complémentaire des autres tests classiquement utilisés et précédemment décrits.

De manière générale, seulement des cultures très pures de cellules de l'EPR peuvent être transplantées, ou dans le cas échéant, il faut que les autres cellules non désirées, qui ne sont pas des cellules de l'EPR, ne mettent pas en danger la santé du patient. Ainsi, lorsque les protocoles conduisent à produire des cellules EPR qui ne sont pas à 100% pures, il faut être capable d'identifier les autres types cellulaires générés au cours de la différenciation (évaluer par des approches de qPCR, ou d'immunofluorescence). Par ailleurs, il faut également contrôler la présence de cellules CSPHis

résiduelles par les mêmes approches. Enfin, la stabilité génomique est évaluée le plus souvent à différentes étapes de la différenciation cellulaire par des approches d'analyse caryotypique.

Une fois que l'EPR a été complètement caractérisé et qu'il est fonctionnel, les cellules nouvellement différenciées en EPR peuvent être amplifiées jusqu'à 5 passages avant de subir la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Regent et al. 2019). Ce phénomène intervient lorsque les cellules perdent leurs morphologies hexagonales au profit de morphologies allongées (Croze et al. 2014; Singh et al. 2013). Cependant, ce nombre de passage sans subir la TEM peut être étendu grâce à l'ajout de ROCK inhibiteur dans le milieu de culture (Croze et al. 2014). Les cellules obtenues peuvent être « banquées », c'est-à-dire que les cellules peuvent être dissociées, puis congelées afin de pouvoir être utilisées plus tard, soit dans le cadre de recherches futures ou dans un cadre thérapeutique (Reichman et al. 2017).

Dans une visée thérapeutique, plusieurs équipes ont cherché à obtenir un EPR fonctionnel et le plus pur possible avec des conditions de fabrication compatible avec une utilisation clinique. Cependant, plusieurs conditions doivent être remplies pour adapter ces protocoles. Les facteurs exogènes comme les produits d'origine animale ou le matrigel initialement présents dans les protocoles de recherche doivent être idéalement remplacés par d'autres, car leurs compositions peuvent ne pas être précisément connues, et peuvent générer des contrôles coûteux pour évaluer la présence de virus de l'espèce dont est issu le produit selon les directives des agences réglementaires et/ou peuvent varier d'un lot à l'autre, ce qui peut entraîner des problèmes dans la différenciation. Ainsi, des protocoles compatibles avec une application clinique ont été mis au point, certains sans aucun produit d'origine animale introduit dans le procédé de différenciation, d'autres avec des produits issus d'animaux dont l'origine et la sécurité virale sont documentées (Ben M'Barek et al. 2017; Reichman et al. 2017). Par exemple, le protocole de Reichman et al. 2014 utilisait de la gélatine porcine dans la différenciation de l'EPR. Lors de la mise au point de leur nouveau protocole dit xeno-free (exempt de produit d'origine animale), publié en 2017, ils s'en affranchissent complètement (Reichman et al. 2017).

c. Production de photorécepteurs *in vitro*

La différenciation des CSPhs en photorécepteurs est rythmée par la transition entre différentes populations cellulaires intermédiaires caractérisées par des pools de gènes spécifiques (**Figure 17**). Le passage d'une étape de développement à une autre peut se faire spontanément en culture ou peut être induit par des cytokines et /ou petites molécules. Ces cultures sont réalisées en 2 dimensions (2D) ou en 3D ou en une combinaison des deux.

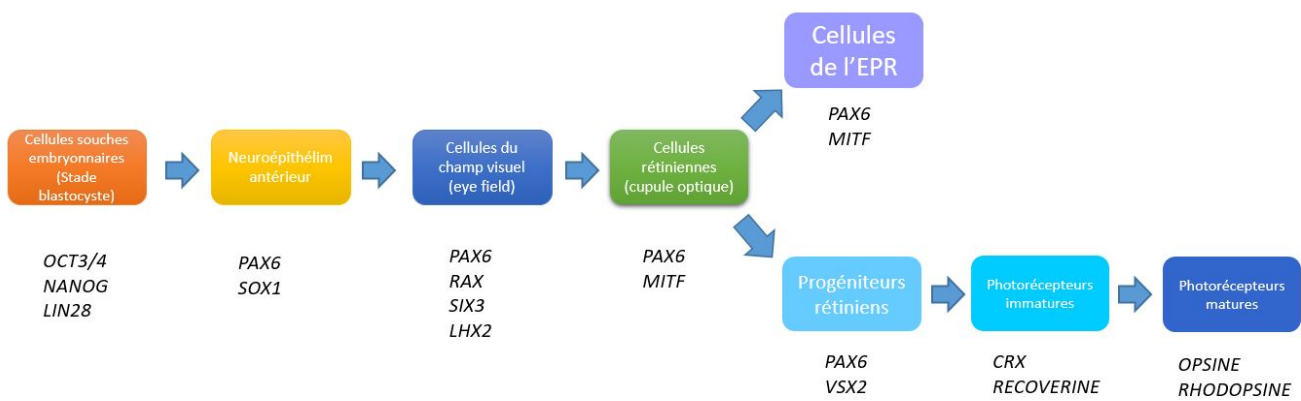


Figure 17 : Séquence développementale depuis le stade blastocyste menant à la différenciation terminale des photorécepteurs et de l'EPR. Chacun de ces stades de développement est caractérisé par un pool unique de gène qui lui est propre (adapté de (Meyer et al. 2009)).

Les premières expériences ayant permis de générer des progéniteurs de photorécepteurs à partir de CSEhs *in vitro* fut par l'équipe de Thomas Reh, en 2006 (Lamba et al. 2006). Dans un premier temps, de manière similaire à la différenciation de l'EPR, des antagonistes aux voies BMP et Wnt sont utilisés afin de diriger la différenciation cellulaire de sorte que les cellules s'orientent vers la voie d'une différenciation de type neurale. En effet, l'ajout de la protéine Noggin, agit comme un inhibiteur de la voie BMP et l'apport de la protéine Dkk1 agit comme un antagoniste de la voie Wnt/ β -catenin. Puis, l'ajout de la protéine IGF-1 permet de promouvoir l'apparition de progéniteurs rétiniens (PAX6+/VSX2+) en induisant l'expression des facteurs de transcription EFTF du champ visuel, après 3 semaines de culture avec un rendement de 86% (**Figure 18**) (Lamba et al. 2006). En dépit du haut rendement de progéniteurs rétiniens obtenus avec ce protocole, seulement 12% deviendront des photorécepteurs immatures, exprimant CRX. Une proportion quasiment nulle ($\leq 0.1\%$) de ces photorécepteurs immatures sera capable de donner seulement des photorécepteurs matures des types S-Opsine ou Rodopsine après 100 jours de culture (Lamba et al. 2006). Quelque temps plus tard, l'équipe de Masayo Takahashi, a généré des corps embryoides (culture 3D) avec des antagonistes des voies Wnt et Nodal (Lefty-A et Dkk1) durant 20 jours avant de passer sous forme de cultures adhérentes grâce à l'addition de molécules connues comme induisant la différenciation des bâtonnets (l'acide rétinoïque, la taurine, FGF2 et Shh) (Osakada et al. 2008). Seulement 35% des cellules ainsi produites en 35 jours sont des progéniteurs rétiniens, par contre environ 20% de ces cellules générées deviendront des photorécepteurs immatures CRX+ après 170 jours de culture, et parmi elles, 8,5% exprimeront la protéine Rhodopsine après 200 jours de culture. Ils ont aussi montré que les cellules nouvellement synthétisées après 200 jours de différenciation expriment les protéines des photorécepteurs matures comme opsine M/L (avec un rendement de 8,9%) et l'opsine S (avec un rendement de 9,4%) (Osakada et al. 2008, 2009). Même si le protocole de Osakada est moins efficace que celui de Lamba pour produire des progéniteurs rétiniens, il a mis en lumière que certaines molécules comme l'acide rétinoïque ou la taurine induisent la différenciation terminale des progéniteurs rétiniens en photorécepteurs (Osakada et al. 2008). De plus, ils ont montré que l'inhibition de Notch *in vitro* à l'aide de DAPT induit la sortie du cycle cellulaire des progéniteurs rétiniens, menant à l'apparition de cellules ganglionnaires et de photorécepteurs immatures exprimant la protéine CRX (Osakada et al. 2008).

Ces protocoles ont ouvert la voie à la création de structures rétiniennes en 3D : les organoïdes rétiniens. Ce type de différenciation récapitule assez fidèlement *in vitro* le développement de la rétine *in vivo* et ont la capacité de synthétiser tous les types cellulaires de la rétine dont l'EPR et les photorécepteurs. Ce type de structure a été réalisé pour la première fois en 2011 par l'équipe du Dr Sasai avec des cellules de souris (Eiraku et al. 2011). Cette étude a montré que lorsque des corps embryoïdes de souris sont placés dans un milieu de différenciation contenant du matrigel, ils sont capables de s'auto-organiser formant une structure ressemblant à une vésicule optique. Le matrigel sert à soutenir la formation de la structure en 3D (Eiraku et al. 2011). Peu de temps après, ce protocole fut adapté par la même équipe à des CSEhs, et des résultats similaires ont été obtenus, ainsi que l'obtention de cônes et de bâtonnets (Nakano et al. 2012). Cependant, quelques modifications notables ont été apportées au protocole. Bien que le milieu de différenciation était composé de seulement 2% de sérum de remplacement (knock out serum ou KSR), sans aucune cytokine lorsqu'il était appliqué à des cellules de souris, celui-ci a dû être supplémenté de 20% de KSR et de petites molécules comme l'IWR1 (inhibiteur de la voie Wnt) et le SAG (agoniste de SHH), lorsqu'il a été appliqué à des cellules humaines (Nakano et al. 2012). Cette nouvelle méthode a permis de grandes avancées en terme de maturation rétinienne, car ces structures ont permis l'émergence des organoïdes de rétine, possédant la capacité de s'organiser en plusieurs couches laminées contenant tous les types de la rétine neurale (Meyer et al. 2011; Phillips et al. 2012). De plus, le protocole de Meyer développé en 2011 a démontré que l'obtention de structures en 3D de type « Optic vesicle like-structure », permet un enrichissement en cellules CRX+. En effet, un ratio de 56% de cellules CRX+ est obtenu après 80 jours de culture (Meyer et al. 2011). D'autres équipes ont souhaité développer des protocoles permettant la production de photorécepteurs plus matures grâce aux organoïdes (Zhong et al. 2014). Ils ont démontré pour la première fois la capacité des CSPhs à se différencier en quelques photorécepteurs matures (au sein des organoïdes de rétines) capables de répondre à un stimuli lumineux *in vitro* après 27 semaines de culture, grâce à l'addition d'acide rétinoïque à un moment précis, en plus de la taurine (Zhong et al. 2014). L'équipe du Dr. Goureau à l'institut de la vision a développé un protocole sur lequel la différenciation rétinienne est initiée sur des CSPhs adhérentes, puis les organoïdes de rétine générés à partir de ces cultures adhérentes sont sélectionnés et mis en suspension (Reichman et al. 2014, 2017). Dans un premier temps, le milieu supplémenté en N2 permet aux cellules de se différencier en des structures neuro-épithéliales auto-organisées. Ces structures expriment les facteurs de transcription PAX6, RAX, VSX2 et MITF (Reichman et al. 2014, 2017). La mise en culture en suspension de ces structures 28 jours après le début de la différenciation permet la croissance et la maturation des organoïdes de rétine. Les organoïdes âgés de 28 à 42 jours contiennent majoritairement des progéniteurs rétiniens en prolifération. Tandis que après 35 jours de différenciation, l'organoïde s'organise en deux couches, la couche la plus externe contient les futurs photorécepteurs alors que la couche la plus interne contient les futures cellules ganglionnaires et les neurones internes (Reichman et al. 2017).

Lorsqu'il est utilisé à des stades tardifs de différenciation, l'acide rétinoïque permet la génération d'organoïdes de rétine hautement stratifiés avec la présence d'une population de photorécepteurs contenant principalement des bâtonnets (expression de la protéine RHODOPSINE à J120) (Sanjurjo-Soriano et al. 2022). Au contraire, l'absence d'acide rétinoïque permet une plus grande génération de cônes au sein d'organoïdes moins stratifiés (expression de la protéine ARRESTINE à J120) (Sanjurjo-

Soriano et al. 2022). Un autre protocole très récent, s'est aussi affranchi d'utiliser l'acide rétinoïque et obtient des organoïdes présentant une large population de photorécepteurs exprimant les protéines CRX et ARRESTINE à J180 (Watari et al. 2023). Certaines études plus récentes ont également réussi à démontrer la fonctionnalité de quelques photorécepteurs obtenus dans des différenciations organoïdes après 200 jours de culture à l'aide de la méthode du patch-clamp (Gagliardi et al. 2018; Li et al. 2021).

Très récemment, une autre étude a démontré que l'acide rétinoïque induit un retard dans les premières étapes de différenciation des organoïdes, en revanche, son utilisation permet de générer des organoïdes très structurés après 200 jours de maturation, très riches en bâtonnets avec une meilleure maturation et morphologie des photorécepteurs (Sanjurjo-Soriano et al. 2022).

D'autres protocoles originaux ont utilisé des molécules comme le COCO, décrit comme ayant la capacité de bloquer simultanément les voies WNT, BMP, Activine et Nodale. L'utilisation de COCO a permis à Zhou et ses collaborateurs d'obtenir un rendement très élevé de 70% de cellules exprimant l'opsine S après 5 semaines de culture sur une différenciation en adhérence (Zhou et al. 2015).

Bien que les organoïdes de rétine représentent une avancée scientifique majeure, un grand nombre de challenges restent à surmonter. Bien souvent, seulement quelques photorécepteurs obtenus par des organoïdes démontrent une fonctionnalité. De plus, les protocoles de différenciation présentent une grande variabilité de rendement d'une différenciation de photorécepteurs à une autre. Ils sont aussi manipulateurs dépendants et les cultures sont extrêmement longues (8 à 12 mois) (Capowski et al. 2019). Pour essayer de standardiser les différenciations en organoïdes de rétine, Capowski et ses collaborateurs ont défini trois stades de différenciation distincts, correspondant à une composition cellulaire et une lamination spécifique à son stade de différenciation par lesquels toutes les lignées CSPhs passent lors de la différenciation en organoïdes. Ces résultats ont été validés à partir de 16 lignées de CSPhs (Capowski et al. 2019).

De la même manière que pour la production de cellules EPR, les protocoles pour obtenir des photorécepteurs ont été adaptés pour une application clinique. Les protocoles xeno-free (sans produit d'origine animale) et feeder-free (sans la présence d'un autre type cellulaire présent pour nourrir les CSPhs) ont été développés. Le cas échéant, quand un produit d'origine animale ne peut être substitué, le produit est contrôlé pour les risques virologiques spécifiques de l'espèce dont est issu le produit. Ainsi, plusieurs protocoles ont été développés dans cet objectif : le protocole de Reichman et al, 2017, Choudhary et al, 2017 et celui de Wiley, 2016 (Choudhary et al. 2017; Reichman et al. 2017; Wiley et al. 2016). Ils ont la particularité de ne pas utiliser de matrigel, dont la composition n'est pas toujours connue, ni de sérum animal, ni de cellules nourricières. Le protocole de Reichman publié en 2017 a la particularité de s'affranchir complètement de l'utilisation de matrigel et de cytokines additionnels. Les organoïdes ainsi synthétisés permettent, en passant par le stade de progéniteurs rétiniens, de générer tous les types cellulaires de la rétine de manière séquentielle. Les cellules ganglionnaires, amacrines et horizontales sont les premières à apparaître. Elles sont suivies par les précurseurs de photorécepteurs après 30 jours de culture, puis vient l'émergence des photorécepteurs matures exprimant l'opsine ou la rhodopsine après 75 jours de culture (Reichman et al. 2014, 2017). Un autre protocole permettant la génération d'organoïdes de rétine a été publié très

récemment, il est utilisé dans le cadre d'une application clinique et nécessite de multiples cytokines (SAG, taurine, T3, SU, SVF, CHIR) (Watari et al. 2023).

Les organoïdes sont composés de plusieurs types cellulaires rétiens, difficiles à isoler. Une des stratégies est de trier les cellules composant les organoïdes. Le tri cellulaire à l'aide de la cytométrie en flux, permet de sélectionner le type cellulaire d'intérêt grâce à l'expression des marqueurs de surface. Cette technique permet d'isoler une population rétienne spécifique puis de la remettre en culture. Ainsi, une sélection en double négatifs de CD29/SSEA-1 a pour but d'accroître les cellules CRX+ et RECOVERINE+ de 16% à 61% après 200 jours de culture (Lakowski et al. 2018). La sélection en négatifs CD29/SSEA-1 est choisie car la plupart des cellules non photoréceptrices sont retirées par ces deux marqueurs, ainsi que les cellules Ki67+ (marqueur de cellules en prolifération et donc pas des photorécepteurs qui sont post-mitotiques) (Lakowski et al. 2018; Ranaei Pirmardan et al. 2018). De la même manière, un ensemble de marqueurs de surface normalement exprimé par les cônes CD26, CD147, CD133 permet de sélectionner ces derniers tandis que la sélection négative de SSEA-1 permet de retirer les cellules indésirables et d'obtenir ainsi une population de cônes L et S de 30 à 50% à partir d'une rétine fœtale et d'échantillons rétiens dérivés de CSEhs âgés de 17 à 18 semaines de différenciation (Welby et al. 2017). Une autre stratégie est d'utiliser des billes magnétiques spécifiques à CD73 pour isoler une population de précurseurs de photorécepteurs transplantables à J120 (Gagliardi et al. 2018).

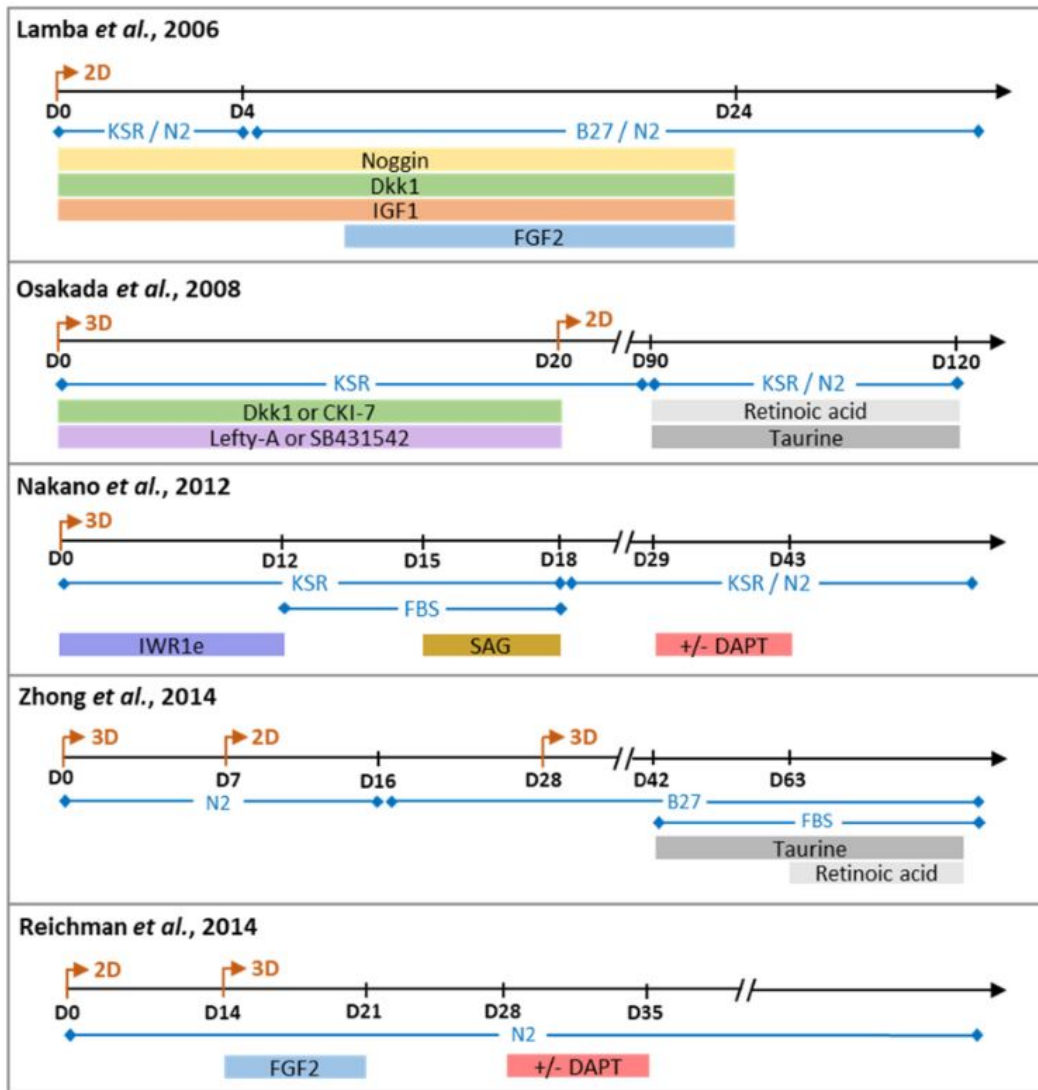


Figure 18 : Principaux protocoles permettant la différenciation des photorécepteurs à partir de CSPhs (extrait de Morizur et.,al (Morizur et al. 2020)).

Une fois que les cellules EPR et les photorécepteurs ont été produits à partir des CSPhs, leur fonctionnalité doit être vérifiée pour une application de thérapie cellulaire. Pour cela, les cellules sont greffées sur des modèles animaux de RP afin de démontrer leur sécurité et leur activité thérapeutique avant d'envisager d'être greffées sur des patients.

5 Transplantation sous-rétinienne

a. Les modèles animaux modélisant les maladies rétinienne

Les espèces animales utilisées pour modéliser les maladies rétinienne sont le plus souvent les souris et les rats. Plus rarement, de plus grands animaux peuvent aussi être utilisés comme les cochons, les lapins, les chiens et les primates non humains.

Les différents modèles d'animaux utilisés peuvent être classés en deux catégories : les modèles de dégénérescences aiguës (induite par une toxine ou une lésion) et les modèles génétiques (mutation ou ajout d'un transgène) (Pozdnyakov et al. 2008; Shah et al. 2015; Zhang et al. 2021).

Les modèles de dégénérescences aiguës peuvent se faire de plusieurs manières, à l'aide d'un laser ou d'une injection de chlorure de cobalt. L'utilisation d'un laser *in vivo* va entraîner l'apoptose des cellules exposées, dont les photorécepteurs et les cellules ganglionnaires (Marc et al. 2008). Le laser peut être utilisé sur le cochon Yucatan afin de modéliser différents stades de la dégénération rétinienne. En fonction de l'intensité du laser, différents degrés de dommages sont obtenus sur l'EPR, les photorécepteurs ou la choroïde (Barone et al. 2023). Egalement, une injection en intravitréen de chlorure de cobalt peut être réalisée sur des rats et des souris afin d'induire la dégénérescence des photorécepteurs. En effet, le chlorure de cobalt va induire une fragmentation de l'ADN au niveau de la CNI (Matsumoto et al. 2003). La morphologie rétinienne retrouvée deux semaines après l'injection de chlorure de cobalt est la même que celle retrouvée sur les rats *rd*, ce qui suggère que la dégradation des photorécepteurs dans les deux cas (modèle de dégénérescence induite et modèle génétique) partagent certains processus pathophysiologiques (Niwa et al. 2016). Ces deux méthodes (laser et traitement chimique) sont aussi pratiquées sur certains primates non humains comme le macaque rhésus et le macaque crabier (*cynomolgus* et *rhesus monkeys* en anglais) (Shirai et al. 2016). Les primates non humains sont de très bons modèles grâce à notre proche parenté dans l'arbre phylogénétique des êtres vivants. Les primates non humains ont des yeux avec une taille comparable à la nôtre, une macula, une fovéa, beaucoup de gènes et de nombreux mécanismes pathologiques partagés avec l'humain (Jones et al. 2017).

Il existe plusieurs modèles génétiques, listés ci-dessous, de manière non exhaustive, en fonction des espèces.

La souris *rd1* a été choisie pour modéliser et comprendre le remodelage de la rétine dans les cas de dégénérescences rétinienne mais aussi comme modèle pour des approches de thérapie cellulaire et d'optogénétique. Cette souris porte une mutation sur la sous unité β de la phosphodiesterase 6 (PDE6), ce qui induit l'accumulation du cGMP et provoque la mort des photorécepteurs (Pennesi et al. 2012). A trois semaines de vie, il ne lui reste plus que 5% de ses photorécepteurs par rapport à une souris sauvage (Lv et al. 2021).

La souris transgénique S334ter présente une RP autosomale dominante sur le gène de la *Rhodopsine* (Lee et Flannery 2007). Cette souris a une protéine Rhodopsine tronquée sans ses 15 derniers acides aminés suite à la génération d'un codon stop sur la position 334 (S334ter) (LaVail et al. 2018). La souris transgénique Pro23His (P23H) présente aussi une mutation sur la *Rhodopsine* ce qui induit une dégénérescence de ses photorécepteurs à partir de 1 mois de vie (Olsson et al. 1992).

Les RPs autosomales récessives sont souvent modélisées grâce à la souris *Rpe65* qui présente une mutation sur ce gène (Leu450Met), elle est aussi utilisée pour modéliser la déficience de la vitamine A. Cette souris souffre d'une dégénérescence de ses cônes après 2 à 3 mois de vie, due à la dysfonction des cellules de l'EPR, mais la perte de ses bâtonnets survient seulement 6 mois après sa naissance (Chen et al. 2006). L'utilisation de souris comme modèles animaux présente de nombreux avantages, cependant, la rétine des souris comporte quelques différences non négligeables comparée à la rétine humaine. Elles n'ont pas de macula, ni de cône -L (vision dans le rouge). De plus, leur globe oculaire est très petit, ce qui rend la procédure chirurgicale difficile. Les rats sont aussi un modèle d'étude intéressant car ils ont un globe oculaire d'environ 6 mm de diamètre, soit deux fois plus grand que celui des souris (Ramkumar, Zhang, et Chan 2010) (Charbel Issa et al. 2015; Karan et al. 2005). Le chien *RPE65* présente le même génotype que la souris *RPE65* (Rolling et al. 2006).

Le rat le plus utilisé comme modèle pour les RPs est le rat Royal College of Surgeons (RCS). Ce rat a une délétion de plusieurs nucléotides sur le gène *Mertk*, tout comme certains patients atteints de RPs, ce qui induit une modification du cadre de lecture induisant la présence d'un codon stop de manière prématurée, ce qui conduit à la traduction d'une protéine tronquée et dysfonctionnelle. Le gène *Mertk* est connu pour coder dans l'EPR un récepteur tyrosine kinase permettant la phagocytose des segments externes des photorécepteurs. L'EPR perd alors sa capacité à phagocyter, ce qui provoque l'accumulation de débris entre l'EPR et les photorécepteurs induisant la mort des photorécepteurs à seulement quelques semaines de vie (D'Cruz et al. 2000). Il existe également une version immunodéficiente de ces rats, issus d'un croisement entre un rat nude (absence de thymus et donc de lymphocytes T) et un rat RCS, ce qui permet aux utilisateurs de s'affranchir de l'utilisation d'immunosuppresseurs lors des greffes (Thomas et al. 2016).

De la même manière que la souris transgénique S334ter, il existe le rat transgénique S334ter (mutation sur le gène *Rhodopsine*) (Lee et al. 2017). Ce rat transgénique porte les mêmes mutations que celles des patients induisant un dysfonctionnement de la protéine Rhodopsine, il est caractérisé par la dégénérescence rapide de ses photorécepteurs, il est aussi immunodéficient (rat nude) et peut être utilisé dans les études de xénogreffe (Seiler et al. 2014). Le rat P23H est un rat transgénique créé par l'incorporation du transgène muté de la Rhodopsine d'une souris chez le rat Sprague Dawley. Les électrorétinogrammes effectués sur ces rats montrent qu'ils perdent tous leurs photorécepteurs après 6 mois de vie, et que la structure de leur rétine est grandement altérée (Orhan et al. 2015).

En dépit du fait que les rats sont d'excellents modèles d'études, il est important de prendre en considération qu'ils sont des animaux nocturnes (ils possèdent un rythme circadien différent) et que leur anatomie diffère beaucoup de celle des humains.

b. Stratégies de transplantations

1. La formulation

Les stratégies de transplantations de l'EPR

Pour greffer le produit de thérapie cellulaire au niveau de la rétine qu'il s'agisse des cellules de l'EPR ou des photorécepteurs, plusieurs stratégies de transplantations ont été mises au point. La première est l'injection des cellules EPR sous forme d'une suspension et la seconde est sous la forme

de feuillet. La grande différence entre ces deux préparations est que sous la forme d'une suspension, les cellules sont désorganisées et séparées les unes des autres au moment de l'injection. Sous forme de feuillet monocouche, les cellules sont organisées et jointives entre elles. Sous forme de suspension cellulaire, les cellules sont facilement manipulables et transportables d'un lieu à un autre. En effet, le transport des cellules en suspension peut être effectué de manière simplifiée dans de la carboglace, et une fois sur place, les cellules peuvent être décongelées pour être directement injectées sans culture préalable.

Lorsque les cellules de l'EPR issues de CSPhs sont transplantées sous forme de suspension cellulaire, celles-ci permettent de ralentir la dégénérescence des photorécepteurs des rats RCS. Leur fonction visuelle a par conséquent été préservée suite à cette injection (Ben M'Barek et al. 2017; Carr et al. 2009; Idelson et al. 2009; Lu et al. 2009; Lund et al. 2006). Cependant, lorsque les cellules sont injectées sous forme d'une suspension, elles auront des difficultés à se reformer *in vivo* sous la forme d'un épithélium à cause de l'altération de la membrane de Bruch et du stress oxydatif régnant dans un contexte de DMLA ou de RP. En effet, les cellules de l'EPR sont plus résistantes à ces contraintes lorsqu'elles sont déjà organisées sous la forme d'un feuillet au moment de l'implantation (Hsiung, Zhu, et Hinton 2015). Une étude a aussi démontré que la sécrétion des cytokines de l'EPR est possible seulement lorsque les cellules de l'EPR sont organisées sous forme d'un feuillet (Sonoda et al. 2009). Par ailleurs, lorsque les cellules de l'EPR dérivées de CSEhs sont transplantées dans l'espace sous-rétinien de rats nude sous la forme d'un feuillet (sans aucune étape de congélation), ces cellules présentent une meilleure survie (Diniz et al. 2013). Ces résultats ont été confirmés sur des rats RCS et des porcs lorsque des feuillets de cellules de l'EPR dérivées de CSPhs ont été greffés, les sujets ont même présenté une amélioration de leur fonction visuelle (Ben M'Barek et al. 2017; Sharma et al. 2019).

Le groupe du Pr. Mandai a proposé une stratégie alternative limitant le besoin d'outils complexes d'implantation qui consiste à produire et à injecter des bandes polarisées d'EPR dérivées de CSPhis. Après leur transplantation sur un rat nude, les bandes sont en capacité de s'orienter *in vivo* du bon sens apical/basal sur l'EPR hôte (Nishida et al. 2021). Cependant, le résultat de cette étude a montré que les bandes de l'EPR ainsi injectées ne s'orientent pas forcément de manière polarisée, et les bandes ont tendance à s'agréger et à former des sphéroïdes (Nishida et al. 2021).

La transplantation de l'EPR sous la forme d'un feuillet complique le transport, la greffe et le stockage. Pour pallier à ces difficultés, notre équipe a développé un conditionnement spécifique pour le stockage et le transport des greffons permettant une stabilité de 48h à 4°C dans une formulation de gélatine (Ben M'Barek et al. 2020). Une équipe japonaise a quant à elle mis au point un système automatisé de culture qui permettrait de cultiver les cellules EPR en épithélium directement à l'hôpital (sans nécessité de savoir faire spécifique ou d'autres équipements que ce système automatisé) (Matsumoto et al. 2019). Enfin une troisième stratégie consiste à congeler le feuillet EPR pour le stocker et le transférer à l'hôpital à la demande. Ainsi, Clegg et collaborateurs ont développé un procédé de congélation compatible avec une application clinique, où 95% des cellules de l'EPR sous forme d'une monocouche confluente survivent après décongélation (Pennington et al. 2021).

De plus, une membrane faite d'un polymère ou d'une substance naturelle est nécessaire pour permettre la reformation *in vitro* de l'EPR, mais aussi pour servir de support lors de la greffe (Ben

M'Barek et al. 2018). Pour la greffe, des outils spécifiques ont été développés afin de délivrer le feuillet d'EPR dans l'espace sous rétinien (Ben M'Barek et al. 2017, 2020; da Cruz et al. 2018; Fernandes et al. 2017; Stanzel et al. 2014).

L'autre aspect majeur de la thérapie cellulaire rétinienne est de déterminer précisément le site d'action des cellules greffées. Les cellules greffées ne peuvent pas couvrir la totalité de la rétine, et même si la rétine périphérique est aussi atteinte, la macula est privilégiée comme site d'implantation. Elle est choisie afin de maximiser les chances de restauration de l'acuité visuelle comme elle dépend principalement de la macula (Morizur et al. 2020).

Les stratégies de transplantations des photorécepteurs

De la même manière que les cellules de l'EPR, les photorécepteurs à des stades différents de différenciation issus de CSPhs peuvent être transplantés de deux manières, sous forme d'une suspension cellulaire ou sous la forme d'un feuillet. Dans ce contexte de médecine régénérative, les photorécepteurs transplantés doivent intégrer le circuit rétinien de l'hôte et doivent être en mesure de mûrir en formant un segment externe sensible à la lumière. En 2006, un groupe a transplanté une suspension de cellules rétiniennes dérivées de CSEhs enrichies à 80% sur des souris *Crx*^{-/-}. Les photorécepteurs ainsi transplantés ont survécu durant 6 semaines *in vivo* à travers l'expression de la protéine fluorescente verte, la GFP. Environ 3 semaines après l'injection en sous rétinien, une amélioration de la fonction visuelle en réponse à la lumière a été enregistrée à l'aide d'un ERG, comparativement aux yeux contrôles non injectés chez le même animal (Lamba, Gust, et Reh 2009). D'autres études ont fait le même constat, les précurseurs de photorécepteurs peuvent s'intégrer dans la rétine de l'hôte, survivre et se différencier afin d'acquies les caractéristiques des photorécepteurs matures. La vision des modèles murins porteurs d'une dégénérescence rétinienne a été améliorée de manière modérée à la suite de cette greffe (Barber et al. 2013; Bartsch et al. 2008; MacLaren et al. 2006; Pearson et al. 2012). L'interprétation de ces études avait mené à tort à la conclusion que les précurseurs de photorécepteurs injectés étaient en capacité de s'intégrer dans la rétine de l'hôte et de permettre la restauration partielle des fonctions visuelles.

Cependant, des études effectuées en 2016 ont démontré que la majorité des précurseurs de photorécepteurs injectés ne se sont jamais intégrés à la rétine de l'hôte, mais ils sont restés dans l'espace sous rétinien de l'hôte, là où ils avaient été injectés. A cet endroit, ils échangent leur matériel cytoplasmique avec les photorécepteurs restants de la rétine de l'hôte. Ce processus a été mis en évidence par l'injection de précurseurs de photorécepteurs exprimant la protéine fluorescente GFP dans l'espace sous rétinien de souris où les photorécepteurs restants expriment une protéine fluorescente rouge. Après l'injection, les photorécepteurs de la rétine de l'hôte se mettent à exprimer les deux protéines fluorescentes, révélant ainsi le processus de transfert cytoplasmique (Pearson et al. 2016; Santos-Ferreira et al. 2016; Singh et al. 2016). Pour confirmer cette théorie, de la thymidine analogue EdU a été injectée dans des souris *Nrl*-GFP pour marquer indépendamment le noyau et le cytoplasme des cellules. Tandis que la majorité des cellules du donneur GFP exprimaient aussi EdU, aucune cellule EdU+ n'a été observée avec de la GFP dans la rétine du donneur. Cela suggère que les cellules injectées et les cellules de l'hôte échangent seulement leur matériel cytoplasmique, et pas leur

noyau (Pearson et al. 2016; Santos-Ferreira et al. 2016; Singh et al. 2016). Suite à ces nouvelles interprétations, les anciennes études ont été réinterprétées. La plupart des précurseurs de photorécepteurs injectés n'ont pas été en mesure d'intégrer la rétine de l'hôte, en revanche, à l'aide du processus de transfert bidirectionnel du matériel cytoplasmique, les photorécepteurs résiduels de la rétine hôte ont été en mesure d'exprimer des protéines des cellules injectées comme la rod α -Transducine, la Peripherin-2 et la Rhodopsine. C'est par ce mécanisme que les modèles murins de dégénérescence rétinienne ont été en mesure de recouvrir partiellement la vision. Ce processus a été décrit comme spécifique des photorécepteurs (pHORécepteurs de l'hôte/pHORécepteurs injectés) entre eux (Pearson et al. 2016). Seulement une étude a émis l'hypothèse que ce processus peut aussi avoir lieu avec les autres types neuraux de la rétine comme les cellules bipolaires ou de Müller (Ortin-Martinez et al. 2017). Le transfert de matériel cytoplasmique a aussi été mis en évidence sur des primates non-humains (Aboualizadeh et al. 2020). De récentes études chez la souris ont montré que les échanges cytoplasmiques entre les cellules injectées et les photorécepteurs endogènes se font à l'aide de structures rigides de type nanotubes (composées d'actine et de microtubules) par lesquelles transitent les protéines et les organelles (Kalargyrou et al. 2021; Ortin-Martinez et al. 2021). Il reste à déterminer si les échanges cytoplasmiques réalisés par les nanotubes se font par diffusion passive et/ou par un transporteur actif de protéines (Henderson et Zurzolo 2021). Une récente étude a aussi montré que les échanges cytoplasmiques ont aussi lieu depuis des cônes endogènes vers les bâtonnets endogènes. Ce processus a été mis en lumière par l'utilisation d'une lignée de souris dont les cônes expriment la GFP. De manière intéressante, les bâtonnets se sont mis aussi à exprimer la GFP. Après une analyse avec « Stellaris® single-molecule RNA-FISH », ils ont mis en lumière que seules les protéines transitent des cônes vers les bâtonnets, et pas l'ARNm. Ce mécanisme de transfert cytoplasmique entre les photorécepteurs s'effectue grâce à l'établissement des microtubes mais aussi grâce à la proximité des axones des cônes vers les corps cellulaires des bâtonnets (à une distance d'environ 1 μ m) (Heisterkamp et al. 2022). Il reste à déterminer le rôle physiologique de ce phénomène endogène, mais aussi s'il est seulement cône-bâtonnet ou s'il est aussi cône-cône et bâtonnet-bâtonnet.

Néanmoins, plusieurs études récentes ont montré que lorsque des suspensions pures de cônes sont injectées dans la macula de souris portant une dégénérescence rétinienne, les cellules bipolaires remodelent leurs dendrites pour venir interagir avec les photorécepteurs nouvellement greffés. Les photorécepteurs injectés, même s'ils peinent à s'organiser dans l'espace car ils forment un agrégat de cellules dans l'espace sous rétinien de la souris, certains parviennent tout de même à murer *in vivo* avec la formation d'un segment externe naissant 26 semaines après la transplantation. Les cônes isolés d'organoïdes âgés de 250 jours s'intègrent le mieux dans l'espace sous-rétinien que ceux qui ont été isolés d'organoïdes âgés de 200 jours (Gasparini et al. 2022). Ces données ont été confirmées à l'aide un ERG (Gasparini et al. 2022; Ribeiro et al. 2021).

Une alternative à l'injection de photorécepteurs sous forme de suspension cellulaire est la transplantation de feuillets rétiens, car ils permettraient de donner une structure aux photorécepteurs. Les feuillets rétiens ont été obtenus à partir d'organoïdes de rétine dérivés de CSPhs et coupés en morceaux avant d'être transplantés dans différents modèles d'animaux (rongeurs, primates) (Watari et al. 2023). Lorsque les feuillets sont issus d'organoïdes de rétine, ils sont transplantés avec d'autres sous types rétiens autres que des photorécepteurs, cela peut limiter et

perturber la reformation de connexions synaptiques avec les cellules rétinienne de l'hôte. Il est aussi important de noter que les photorécepteurs contenus dans les feuillets issus d'organoïdes risquent de former des rosettes avec le segment externe des photorécepteurs à l'intérieur, ce qui ne permet plus à l'EPR d'être en contact avec ces derniers (Iraha et al. 2018; McLelland et al. 2018; Tu et al. 2019). En dépit de cette contrainte, des connexions synaptiques avec la rétine hôte ont été observées ainsi qu'une amélioration de l'acuité visuelle (ces informations ont été collectées à l'aide d'électrodes et du test de comportement visuel de l'animal) (Iraha et al. 2018; McLelland et al. 2018; Shirai et Mandai 2016; Tu et al. 2019). C'est pour cela que l'équipe du Pr. Mandai a mis au point une lignée de CSEhs présentant la délétion du gène *Islet-1 (ISL1)*. Les organoïdes dérivés de cette lignée ont une population réduite en cellules bipolaires ON, et ainsi, les morceaux d'organoïdes transplantés montrent une meilleure intégration dans la rétine de l'hôte avec la formation de synapses ainsi qu'une meilleure réponse à la lumière des cellules ganglionnaires de l'hôte (Yamasaki et al. 2022).

2. Les voies d'accès

La transplantation des feuillets et des suspensions peut s'effectuer par plusieurs voies d'accès en fonction de l'animal greffé. Lors d'une transplantation chez les rongeurs, après incision de la choroïde, les cellules sont injectées dans l'espace sous rétinien, en utilisant une aiguille passant sur la face la plus dorsale de la sclère (Wu et al. 2018). Lorsque les primates non-humains sont transplantés, le feuillet rétinien est délivré par la méthode en 3 ports en « pars plana ». Il s'agit d'une procédure chirurgicale en 3 points qui permet de retirer l'humeur vitrée par la « pars plana » à l'aide d'aiguilles (Hu et al. 2021). Ensuite, un gaz est injecté dans l'espace sous-rétinien pour décoller la rétine. Puis, la sclère est incisée de manière antérieure, pour permettre l'introduction de la canule. La rétine est incisée (rétinotomie) pour que le feuillet puisse être implanté (Ben M'Barek et al. 2020). Une des stratégies est d'enrouler le feuillet dans une canule avant de le déposer dans l'espace sous rétinien (Ben M'Barek et al. 2020). L'avantage de greffer un patch enroulé est qu'il peut être manipulé dans une plus petite canule, mais parfois il apparaît plus difficile de le positionner et de le dérouler correctement au sein de la rétine (da Cruz et al. 2018; Kashani et al. 2018; Mandai, Watanabe, et al. 2017; Sharma et al. 2019). Cette technique est la même que celle employée lors de l'essai clinique actuellement en cours dans notre équipe (ClinicalTrials NCT03963154). Cependant, ces techniques sont invasives, car elles ne peuvent pas s'affranchir d'une vitrectomie qui présente de potentiels effets indésirables comme la cataracte, l'uvéïte, d'éventuelles déchirures et décollements rétinien, un pli maculaire, un trou maculaire ou encore une endophtalmie (Ducloyer et al. 2020).

Récemment, un autre système de transplantation chez l'humain a été mis au point, un système de délivrance sous-rétinien par l'orbite des cellules rétinienne. Il est actuellement évalué en un essai clinique de phase I/II chez des patients atteints d'une DMLA de stade avancé (ClinicalTrials.gov identifier, NCT02286089). Ce système est composé d'une canule flexible, créée pour contourner le globe oculaire et ainsi accéder facilement à l'espace sous-rétinien. A l'intérieur de cette canule se trouve une aiguille utilisée pour pénétrer la choroïde. Le principal avantage de cette technique est qu'elle permet d'atteindre le pôle postérieur de l'œil tout en s'affranchissant de la vitrectomie et de la rétinotomie qui étaient jusque-là des procédures incontournables pour accéder à l'espace sous rétinien (de Smet et al. 2018).

Tous les protocoles et stratégies de transplantation actuellement développés ne permettent pas l'organisation optimale des photorécepteurs transplantés. Les cellules injectées en suspension présentent les limitations précédemment évoquées tandis que les feuillets de photorécepteurs issus d'organoïdes sont bien trop petits pour recouvrir une région significative de la macula et sont aussi compliqués à orienter correctement dans la rétine.

6 Membranes biocompatibles

Les biomatériaux sont utilisés pour organiser les cellules de l'EPR et les photorécepteurs, ils doivent servir de support de culture à ceux-ci. Ainsi, ils vont permettre la création d'un tissu prêt pour l'implantation *in vitro*.

Pour être utilisés en thérapie cellulaire, les biomatériaux doivent répondre à des caractéristiques spécifiques : être bien tolérés par l'organisme en ne provoquant pas ou peu d'inflammation, allergie, infection ou rejet. Par ailleurs, ils ne doivent pas contenir de substance toxique et répondre à des caractéristiques mécaniques adaptées. Les biomatériaux sont de plus en plus couramment utilisés aujourd'hui dans de nombreux domaines, comme la cardiologie, l'orthopédie, le dentaire et l'ophtalmologie (Nii et Katayama 2021).

Les biomatériaux peuvent être d'origine biologique ou être composés de polymères synthétiques. Ils peuvent être simplement des supports pour la culture cellulaire (biomatériaux inertes) ou peuvent au contraire avoir une activité biologique (biomatériaux bioactifs) sur les cellules cultivées ou sur les tissus/cellules du site d'implantation. Enfin, certains biomatériaux peuvent être biodégradables dans l'organisme.

a. Les biomatériaux utilisés pour la transplantation de l'EPR

Les biomatériaux peuvent être utilisés pour fournir à l'EPR une membrane sur laquelle il peut se développer et créer un épithélium fonctionnel *in vitro*, mais aussi pour être compatible afin d'être transplanté sous la forme d'un feuillet *in vivo*. La membrane doit permettre l'adhésion, la survie et le maintien de la fonctionnalité de l'EPR sur le long terme, imiter la porosité de la membrane basale, être fine (entre 5-90 μ m) afin de ne pas changer la distance focale de l'œil, et résister à la procédure chirurgicale (Rizzolo, Nasonkin, et Adelman 2022). En effet, elle doit être assez solide pour ne pas se déchirer durant l'implantation chirurgicale et en même temps être assez malléable pour ne pas détruire les autres tissus environnants de la rétine lors de la transplantation (Liu et al. 2021; White et Olabisi 2017). Elle doit ainsi respecter l'élasticité de la rétine qui a un module de Young de 0.02MPa (Rizzolo, Nasonkin, et Adelman 2022).

Les biomatériaux d'origine biologique décrits dans la littérature sont nombreux et de sources variées allant de biomatériaux d'origine humaine jusqu'à des sources issues d'insectes.

Les membranes amniotiques, les membranes limitantes internes et les membranes de Descemet ont démontré leurs capacités à supporter et à maintenir la fonctionnalité de l'EPR (dérivé de CSPHis, ou de cultures primaires) (Ben M'Barek et al. 2017; Beutel et al. 2007; Capeáns et al. 2003; Ohno-Matsui et al. 2006; Thumann et al. 1997). L'étude de Thumann et de ses collaborateurs a montré que lorsqu'une culture primaire de cellules de l'EPR estensemencée sur une membrane de Descemet, les cellules sont capables de reformer une monocouche cellulaire et présentent des microvilli (Thumann et al. 1997). Les études de Capeáns *et al.*, et de Ohno-Matsui *et al.*, ontensemencé des cultures primaires de cellules EPR sur des membranes amniotiques humaines et ont montré que ces cellules sont capables de former une monocouche et des jonctions intracellulaires (Capeáns et al. 2003; Ohno-Matsui et al. 2006). L'utilisation de membranes biologiques a l'avantage de contenir leurs propres

ultrastructures (porosité, malléabilité, résistance), et de présenter des propriétés biologiques utiles aux cellules EPR (par exemple, grâce à la présence de différentes protéines, protéoglycanes et glycoprotéines). La présence de ces composés biologiques permet d'induire une meilleure fonctionnalisation une fois la membrane implantée *in vivo* (Walkden 2020).

D'autres équipes de recherche ont développé des membranes fabriquées à partir de polymères naturels. Par exemple, le collagène I a été présenté comme un bon candidat pour servir de support à la culture de l'EPR. Lu et ses collaborateurs ont ainsi mis au point une méthode originale pour produire une membrane fine de collagène de l'ordre de 2µm (Lu et al. 2007). Cette épaisseur est comparable à celle de la membrane de Bruch. Lorsque des cellules ARPE-19 ont été cultivées sur celle-ci, les auteurs ont démontré que les cellules se polarisaient correctement (présence de ZO-1 à la membrane) et étaient fonctionnelles (activité de phagocytose) (Lu et al. 2007). La membrane de collagène est réalisée à l'aide d'anneaux acryliques, puis la membrane est réticulée à l'aide d'une lampe UV (Lu et al. 2007). D'autres matériaux d'origine biologique ont aussi été utilisés : la gélatine (mélange composé de collagène, d'os et de cartilage), la fibrogène réticulée, la cellulose bactérienne et les cryoprécipités (fines membranes issues de cryoprécipités isolés à partir d'échantillons de sang humain et utilisées comme substrat pour l'EPR) (Farrokh-Siar et al. 1999; Gonçalves et al. 2016). Dans l'étude de Farrokh et al., les auteurs ontensemencé des cellules fœtales de l'EPR sur des membranes issues de cryoprécipités. Les cellules de l'EPR ont proliféré sur ce support et sont devenues fonctionnelles (test 5-bromo-2'-deoxy-uridine, présence de phagocytose, de microvilli, d'une structure hexagonale). Les cryoprécipités ainsi obtenus comportent un certain nombre de protéines de fibrogène et de fibronectine essentielles à l'adhésion des cellules de l'EPR. L'avantage de ces membranes issues de cryoprécipités est qu'elles sont constituées à partir des propres cellules du patient, ce qui supprime les risques d'une trop grande réponse immunitaire et de rejets (Farrokh-Siar et al. 1999). Des membranes fabriquées à partir de fibrogène et de gélatine ont été testées *in vivo*, chez des cochons et des lapins. Cependant, ce type de membrane a induit une trop grande inflammation chez ces animaux (à noter qu'il est question dans ce cas de xénogreffe), induisant la mort des cellules transplantées (les animaux n'ont pas été immunosupprimés) (Del Priore, Tezel, et Kaplan 2004). La fibre de soie est aussi un autre type de matériel naturel pouvant être utilisé comme un substrat. La soie peut être obtenue à partir d'insectes comme le *Bombyx mori* et le *Antheraea pernyi*. Une étude a montré que ce type de membrane faite de soie permet de maintenir la morphologie hexagonale et les jonctions serrées des cellules ARPE-19. Cependant, les lignées primaires de cellules de l'EPRensemencées sur des membranes de soie prennent plus de temps à retrouver les caractéristiques d'un EPR mature (Shadforth et al. 2012).

Beaucoup de polymères synthétiques ont été étudiés pour être utilisés comme membranes de support pour l'EPR. Ces polymères synthétiques sont le poly(L-lactic acid) (PLLA), poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), PLLA-PLGA (qui sont des systèmes de copolymères), le poly(caprolactone) (PCL), le polydimethylsiloxane (PDMS), poly(triméthylène) carbonate (PTMC), le polytéréphtalate d'éthylène (PET) et le parylène-C. Dans un premier temps, dès 1997, plusieurs groupes ont créé des membranes composées de PLGA et de PLLA. Celles-ci ont démontré qu'elles permettaient la survie de l'EPR en culture, tout en maintenant la morphologie et le phénotype de ces cellules (Giordano et al. 1997; Lu, Yaszemski, et Mikos 2001; Thomson et al. 1996). Dans un second temps, la structure de ces membranes a été repensée. Ainsi, la porosité de membrane en PCL a été induite à l'aide d'un procédé

de photolithographie. Cette membrane nouvellement créée améliore la maturité de l'EPR cultivé dessus comparé à des membranes non poreuses faites de PCL, ou comparé à l'utilisation des inserts de culture classiques (McHugh et al., 2014). Les membranes faites de PCL ont l'avantage de mieux répondre aux besoins de cellules grâce à la création de pores réguliers et homogènes. Une autre membrane composée du biodégradable et non poreux PTMC a démontré sa capacité à permettre la survie, la formation d'une monocouche cellulaire confluyente et la maturation d'un EPR dérivé de CSPhs (Sorkio et al. 2017).

Les membranes synthétiques fabriquées à partir de parylène-C, en 2013, grâce à la lithographie, ont démontré d'excellentes capacités à maintenir l'EPR *in vitro* et *in vivo*. Avec cette approche, l'EPR greffé sous forme d'une monocouche polarisée, présente une meilleure survie cellulaire et une meilleure fonctionnalité au sein de la rétine greffée, comparé à des cellules en suspension (Diniz et al. 2013b). La membrane en parylène-C a été choisie car elle est biocompatible, très fine (0,15 à 0,30 μm), elle possède une perméabilité similaire à la membrane de Bruch humaine. Une fois implantée chez le rat immunodéprimé, cette membrane a été bien tolérée, sans signe de rejet, ni formation de tératome (Diniz et al. 2013a; Lu et al. 2012).

Ilmarinen et ses collaborateurs ont commencé à créer des membranes poreuses non-biodégradables à base de PET. De façon originale, les auteurs ont directement différencié sur celles-ci un EPR à partir de CSEhs (Ilmarinen et al. 2019). Les cellules de l'EPR se sont correctement différenciées et sont devenues jointives et fonctionnelles (processus de phagocytose, présence polarisée des protéines ZO-1 et claudin-19 et présence de protéines impliquées dans cycle visuel RPE65 et CRALBP). Puis, des lapins ont été greffés et suivis seulement 4 semaines après la greffe. Les cellules de l'EPR ont montré une bonne fonctionnalité et intégration dans la rétine de l'animal greffé (Ilmarinen et al. 2019). Cependant, l'utilisation du PET est très largement discutée car il génère des composés toxiques comme le formaldéhyde et l'acétaldéhyde (Bach et al. 2013).

Certaines membranes utilisées sont une combinaison des membranes naturelles et synthétiques. La combinaison hybride de ce type de membrane présente l'avantage de contrôler les propriétés physiques de la partie synthétique tout en utilisant les propriétés biologiques présentes dans les composés d'origine biologique comme les protéines ou les protéoglycanes (Xiang et al. 2014). Une équipe a créé une membrane nanofibreuse poreuse de soie de *Antheraea pernyi*, de PCL et de gélatine. Cette membrane hybride a permis d'obtenir une meilleure prolifération cellulaire, et une meilleure expression des gènes caractéristiques des cellules de l'EPR, comparée aux résultats obtenus sur une membrane de PCL ou de soie-PCL. L'implantation *in vivo* de cette membrane sans EPR a démontré une biocompatibilité sans aucun signe de rejet ni d'inflammation (Xiang et al. 2014). Une autre équipe avait précédemment synthétisé et greffé une membrane fibreuse de PCL/gélatine, et avait démontré que l'EPR cultivé sur ce support est fonctionnel et de qualité suffisante (Chen et al. 2011).

Toutes ces membranes nouvellement synthétisées et/ou utilisées peuvent recevoir un traitement chimique ou physique pour augmenter leur caractère hydrophile afin de favoriser l'adhésion et la prolifération cellulaire. Parfois, les membranes reçoivent un traitement pour ajouter les groupements chimiques $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, et $-\text{NH}_2$. Sur d'autres membranes sont greffés des polymères hydrophiliques, car cela permet d'améliorer l'attachement cellulaire (Martins et al. 2009). De la même manière, un

traitement à l'oxygène sur des membranes faites de poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalérate) favorise l'attachement cellulaire et une meilleure répartition des cellules de l'EPR sur la membrane (Zhu, Ji, et Shen 2004). Cependant, ces modifications chimiques peuvent créer des résidus toxiques, et peuvent générer des effets secondaires. Les membranes sont immergées dans une solution contenant des molécules adhésives, et des molécules permettant de créer des interactions de surface (liaisons électrostatiques, hydrophobiques, van der Waals et des liaisons hydrogènes). La laminine est un "coating" très utilisé sur les membranes, car il permet d'accroître l'adhésion et la prolifération cellulaire, et aussi de permettre une meilleure différenciation cellulaire (Treharne et al. 2011). D'autres études ont montré que d'autres "coatings" comme le collagène, la vitronectine, ou la gélatine peuvent être utilisés de la même manière (Calejo et al. 2017; da Cruz et al. 2018; Lu et al. 2012).

L'ensemble des différents biomatériaux utilisés sont récapitulés dans la **Table 3**.

type de biomatériaux	Nature	EPR encencencé	biocompatibilité in vivo	fonctionnalité dans un essai clinique	Essai clinique	références
naturels	collagène	ARPE-19	non	/	/	Lu et al. 2007
	gélatine	Feuillet d'EPR de porc	forte réponse immunitaire chez le porc et le lapin	/	/	Del Priore, Tezel, et Kaplan 2004
	cellulose bactérienne	hTERT-RPE1	/	/	/	Gonçalves et al. 2016
	membrane de cryoprécipité	EPR foetal	/	/	/	Farrokh-Siar et al. 1999
	membrane de Descement	EPR foetal	/	/	/	Thumann et al. 1997
	membrane amniotique	EPR dérivé de CSEhs	oui sur des rat RCS	en cours sur les patients	NCT03963154	
	soie	ARPE-19	/	/	/	Shadforth et al. 2012
	membrane limitante interne	EPR dérivé de CSEhs	oui	pas d'amélioration sur les patients	UMIN000011929	
synthétiques	PDMS	EPR dérivé de CSPhis	/	/	/	Lin et al. 2019
	PLLA	EPR foetal	/	/	/	Giordano et al. 1997; Thomson et al. 1996
	PCL	EPR foetal	/	/	/	McHugh et., 2014
	PTMC	EPR dérivé de CSEhs	/	/	/	Sorkio et al. 2017
	PET	EPR dérivé de CSEhs	oui	acuité visuelle augmentée chez les patients	NCT01691261	
	Parylène	EPR dérivé de CSPhis	oui	acuité visuelle augmentée chez les patients	NCT02590692	Diniz et al. 2013; Lu et al. 2012; Kashani et al. 2018
hybrides	PLGA	EPR dérivé de CSPhis	/	en cours sur les patients	NCT04339764	
	soie/PCL/gélatine	EPR adulte	oui chez le lapin	/	/	Xiang et al. 2014

Table 3 : Tableau récapitulatif des biomatériaux utilisés pour la culture d'EPR.

b. Les biomatériaux utilisés pour la maturation des photorécepteurs en vue d'une transplantation

Les biomatériaux pour ces applications ont différentes structurations : sous forme de membranes planes poreuses ou à l'inverse microstructurées. De même que pour les biomatériaux utilisés pour l'EPR, ces membranes utilisées doivent permettre l'ensemencement d'une densité importante de cellules, mais aussi l'élongation, la polarisation et la maturation des photorécepteurs dans des espaces dédiés (Jung et al. 2018; Lee et al. 2021). Les cellules doivent aussi être capables d'adhérer complètement à l'intérieur du biomatériau. Les membranes doivent être faites de manière à être implantées dans l'espace sous-rétinien et à ce que les photorécepteurs transplantés soient en interaction avec les cellules de l'EPR (présence de pores par exemple) (Jones, Warner, et Stevens 1992; Jung et al. 2018; Lee et al. 2021).

Souvent, les membranes utilisées dans le cadre des transplantations rétiniennes sont composées des mêmes matériaux que celles utilisées dans le cas des transplantations de l'EPR.

La plupart du temps, les membranes mises au point ont surtout été faites à partir de polymères synthétiques. La première membrane destinée à recevoir des progéniteurs de photorécepteurs en vue d'une transplantation pour induire leur maturation a été créée en 2005 (Lavik et al. 2005). Cette membrane est biodégradable, poreuse et fabriquée à partir de PLGA. Les cellules rétinienne cultivées sur ce support ont été capables d'adhérer et de survivre 14 jours après l'ensemencement (Lavik et al. 2005). Peu de temps après, une étude a évalué la survie et la différenciation de progéniteurs rétiens ensemencés sur des substrats de PLLA/PLGA, puis ils ont greffé ce feuillet dans l'espace sous rétinien de souris (Tomita et al. 2005). Cette stratégie sous forme de feuillet fut une première par rapport aux traditionnelles injections en suspension de progéniteurs rétiens. Les résultats obtenus ont démontré que le nombre de cellules survivantes après la greffe était 10 fois supérieur par rapport à une intégration sous forme de suspension cellulaire (Tomita et al. 2005). En 2007, une autre membrane biodégradable faite d'une substance poreuse a été mise au point, faite de poly(glycerol-sebacate) (PGS), avec une épaisseur de 45 μm (Neeley et al. 2008). Le PGS est biocompatible avec la rétine, sa dégradation *in vivo* est connue (entre 30 et 60 jours) et il possède un module de Young de 1,88 à 1,66 MPa environ, ce qui lui permet d'être assez solide pour être transplanté, et en même temps assez malléable pour s'adapter à la morphologie de l'œil. Le PGS a pour résidu l'acide sébacique et le glycérol qui sont des métabolismes naturels chez les mammifères et sont complètement éliminés par le métabolisme (Lee et al. 2021). Les résultats de l'étude ont montré que les cellules rétinienne adhèrent et survivent sur ce type de membrane (Neeley et al. 2008). Les membranes synthétiques biodégradables faites de PLA, PLGA, PCL ou de PGS ont la capacité de fournir aux photorécepteurs un environnement extracellulaire stable à court terme, le temps de leur maturation terminale, puis elles se solubilisent. Leurs biodégradabilités sont complètement documentées et caractérisées *in vivo* et *in vitro*. En fonction de leur environnement, la vitesse de dégradation n'est pas la même, mais il a été étudié que le PLGA et le PCL se dégradent plus vite *in vivo* que *in vitro*. *In vitro*, la masse du PCL passe à 73% et celle du PLGA à 56% en 28 jours. *In vivo*, la masse du PCL décroît à 39% et celle du PLGA à 46% en 28 jours (Sung et al., 2004). Contrairement aux autres types de membranes, la membrane de PCL a permis l'adhésion cellulaire des progéniteurs rétiens à la surface de celle-ci, et les progéniteurs rétiens ont été capables de continuer leur différenciation *in vitro* en des photorécepteurs plus matures (expression de CRX, NRL, RHODOPSINE) (Baranov et al. 2014). Cependant, comparée aux temps de différenciation des photorécepteurs, la dégradabilité de ces composés est relativement courte. Cela pourrait compromettre la fonctionnalité des photorécepteurs une fois greffés.

Worthington et ses collaborateurs ont élaboré une membrane microstructurée à l'aide de la technique de la lithographie à deux-photons. Elle est composée de motifs horizontaux et verticaux. Les motifs verticaux ont pour objectif d'accueillir des photorécepteurs tandis que les motifs horizontaux ressemblent à des canaux destinés à permettre l'échange cellulaire entre les photorécepteurs ensemencés. Des progéniteurs rétiens issus d'organoïdes sont ensemencés après 30 jours de maturation. Deux jours après l'ensemencement, les cellules expriment TUJ1 et forment des prolongements neuronaux à l'intérieur des motifs (Worthington et al. 2017). Cependant, cette technique est longue et fastidieuse à mettre en place, et ne peut produire qu'une seule membrane à la fois. Quelque temps plus tard, ce même groupe a développé une membrane biodégradable faite de PCL, ainsi qu'une matrice extracellulaire composée d'acide hyaluronique et de gélatine pour permettre la maturation des photorécepteurs (Shrestha et al. 2020; Thompson et al. 2019). Après

transplantation chez le rat, la membrane faite de PCL n'a montré aucun signe de toxicité, mais aucune étude de fonctionnalité n'a été effectuée.

En 2018, la membrane faite de PDMS ou de PGS en forme de « verre de vin » a été fabriquée afin de contenir le plus possible de photorécepteurs immatures (produits à partir d'organoïdes de rétine dérivés de CSPhs à J80 exprimant la RECOVERINE) dans le haut de son motif, puis de guider la polarisation axonale plus profondément à l'intérieur de la membrane. Cette membrane de PDMS a l'avantage de faciliter l'adhésion cellulaire (elle peut contenir une à deux cellules par motif) et, de permettre la différenciation et la polarisation des photorécepteurs immatures. Trois mois après l'ensemencement *in vitro*, les cellules ont développé une extension et expriment la protéine CRX, caractéristique des photorécepteurs immatures. Cependant, il est important de prendre en considération que le PDMS n'est pas biodégradable et la micro-structuration de cette membrane ne permet pas la communication cellulaire des photorécepteurs entre eux (Jung et al. 2018).

Très récemment, une membrane biodégradable a été développée en forme de « bac à glaçons ». Cette nouvelle forme de membrane microstructurée a l'avantage de permettre une augmentation de la densité cellulaire pouvant êtreensemencée et de réduire la quantité de matière nécessaire pour générer une membrane. Pour ce modèle de membrane, les auteurs ont choisi d'utiliser du PGS. L'étude montre qu'après l'ensemencement de photorécepteurs issus organoïdes à J120, après deux jours sur la membrane, la morphologie des cellules semblent présenter une polarisation à l'intérieur des motifs (Lee et al. 2021).

Tous les types de membranes utilisés pour l'organisation et la maturation des photorécepteurs sont récapitulés dans la **Table 4**. Les membranes microstructurées présentent des résultats prometteurs pour l'avenir de la thérapie cellulaire, car elles ont la particularité de pouvoir être complètement modulables et conceptualisables en fonction des besoins et des contraintes liées à la greffe et aux cellules. Cependant, aucune étude n'a apporté une preuve de concept et une fonctionnalité des photorécepteurs contenus dans une membrane microstructurée *in vivo* pour le moment.

type de membrane	biomatériaux	type de cellulesensemencées	marqueurs de polarisation	références
poreux/biodégradable	PLGA	Progéniteurs rétiniens de souris isolés 1 jour après la naissance	survie des cellules 14 jours après ensemencement	Lavik et al. 2005
poreux/biodégradable	PGS	Progéniteurs rétiniens de souris isolés le jour de la naissance	Recoverine/Rhodopsine (1 semaine après ensemencement)	Neeley et al. 2008
poreux/biodégradable	PCL	Progéniteurs rétiniens de fœtus humain isolés après 16 semaines de gestation	CRX, NRL, RHODOPSINE, ROM1 (1 semaine après ensemencement)	Baranov et al. 2014
microstructuré	PDMS/PGS	Précurseurs de photorécepteurs issus d'organoïdes après 80 jours de différenciation dérivés de CSPhs	CRX (3 mois après l'ensemencement)	Jung et al. 2018
microstructuré		Progéniteurs rétiniens issus d'organoïdes après 30 jours de différenciation dérivés de CSPhs	TUJ1 (2 jours après l'ensemencement)	Worthington at al. 2017
poreux/biodégradable	composé de gélatine, d'acide hyaluronique, chondroïtin sulfate	Corps embryonnaires issus de CSEh ensemencés après 7 jours de différenciation	RECOVERINE (35 jours après ensemencement)	Singh et al. 2018
microstructuré/biodégradable	PCL	Progéniteurs rétiniens issus d'organoïdes dérivés de CSPhs	OTX2, Recoverine (9 jours après l'ensemencement)	Thompson et al. 2019
microstructuré/biodégradable	PGS	Précurseurs de photorécepteurs issus d'organoïdes après 120 jours de différenciation dérivés de CSPhs	Expression du marqueur presynaptique VGLUT1, ARR3, NR2E3, PRPH2 (5 jours après l'ensemencement),	Lee et al. 2021

Table 4 : Tableau récapitulatif des biomatériaux utilisés pour la maturation des photorécepteurs.

7 Les essais cliniques de thérapie cellulaire

a. Les stratégies d'immunosuppression

De la même manière que pour la transplantation d'organe, la thérapie cellulaire implique de greffer du matériel biologique d'un être humain à un autre. A cet égard, il faut prendre en compte le risque de réponse immunitaire pouvant conduire à un rejet éventuel. Ce risque est modulé de différentes manières : en appliquant un traitement immunosuppresseur au patient receveur, en sélectionnant des cellules donneuses compatibles avec le patient ou en modifiant génétiquement les cellules.

1. Les essais en cours

L'œil est considéré comme un espace immunoprivilégié grâce à la barrière hémato-rétinienne (Zhou et Caspi 2010). Pourtant, il est important de prendre en considération que les approches de thérapie cellulaire ont lieu dans un contexte d'inflammation où la barrière hémato-rétinienne est fragilisée. De plus, il faut considérer que la plupart des cellules rétiniennes dérivées de CSPhs sont greffées dans un contexte xénogénique où il a été nécessaire de recourir à une forte immunosuppression avant la greffe (Ben M'Barek et al. 2020; Gagliardi et al. 2018; Iraha et al. 2018; Shirai et Mandai 2016). Excepté lors d'étude impliquant des greffes avec un CMH compatible entre le donneur et le receveur, tous les patients reçoivent un traitement immunosuppresseur. La meilleure stratégie pour immunosupprimer le patient est toujours en débat en fonction des essais cliniques actuellement en cours. Dans tous les cas, les stratégies d'immunosuppression vont de l'immunosuppression locale à l'aide de corticaux locaux à une immunosuppression systémique élevée (da Cruz et al. 2018; Kashani et al. 2021; S. D. Schwartz et al. 2012; Schwartz et al. 2015, 2016).

Lorsque les cellules de l'EPR en suspension ont été transplantées dans l'étude de Schwartz et de ses collaborateurs en 2015, ils ont eu recours à une immunosuppression forte, en utilisant du tacrolimus et du mycophenolate mofetil et 5 des 18 patients ont eu des effets secondaires importants directement liés à l'immunosuppression : de la cataracte (4 patients) et une inflammation dans le vitrée (1 patient) (Schwartz et al. 2015). Dans l'étude de Kashani et de ses collaborateurs, pour greffer l'EPR en feuillet exprimant un CMH différent de celui du receveur, aucune immunosuppression n'a été réalisée sur le long terme, mais les 5 patients ont reçu une courte immunosuppression systémique de 0.075mg/kg/jour de tacrolimus du jour 8 au jour 42 après la transplantation et aucun effet secondaire majeur n'a été rapporté 2 ans après la transplantation (Kashani et al. 2022). Dans l'étude de Da Cruz et ses collaborateurs, sur les 2 patients qui ont été transplantés d'un feuillet d'EPR, le patient qui avait du diabète a dû être supplémenté en insuline à cause de l'utilisation des stéroïdes comme immunosuppresseur local (da Cruz et al. 2018). Ces études cliniques montrent qu'une immunosuppression forte n'est pas souvent nécessaire et qu'une immunosuppression locale est suffisante.

2. l'autologue (ips)

Les CSPhis autologues peuvent être obtenues à partir des cellules du patient lui-même, puis être différenciées à nouveau dans le type cellulaire d'intérêt et être greffées chez ce même patient.

Ceci permet donc de dépasser les problèmes d'immunocompatibilité rencontrés lors des thérapies cellulaires réalisées avec des CSPhs (Takahashi et Yamanaka 2006). Cependant, la génération de CSPhs et la différenciation en cellules rétinienne prend énormément de temps. Il faut aussi corriger la mutation génétique associée à la pathologie du patient RP avant de produire les cellules rétinienne. De plus, pour réaliser cette application, chaque banque de cellules doit subir de nombreux contrôles qualité (pureté et intégrité génomique des cellules). Produire ce type de banque demande énormément de temps, de travail et d'argent pour seulement greffer un seul patient. Cette approche ne semble pas réalisable à grande échelle pour traiter tous les patients atteints de dégénérescence rétinienne avec les méthodes de production actuelle.

3. la haplobanque

Afin de pallier cette difficulté, la stratégie à l'étude pour éviter l'immunosuppression du patient est la création de banques basées sur les principaux complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) présents dans les populations. Il s'agit d'identifier des donneurs homozygotes pour les allèles les plus fréquents dans les différentes populations en fonction des aires géographiques. Ainsi, plusieurs études, effectuées au Royaume-Uni, au Japon, en Chine et en Amérique du Nord ont estimé qu'il faudrait produire environ 50 à 150 lignées cellulaires homozygotes CMH pour couvrir 50 à 90% des populations respectives (Barry et al. 2015; Yoshida et al. 2023).

Récemment, une haplobanque de CSPhs avec un CMH compatible avec 40% de la population japonaise a été développée avec un grade clinique (Yoshida et al. 2023). Cette haplobanque a été utilisée dans 10 essais cliniques allant de la transplantation de cellules rétinienne (EPR en suspension, photorécepteurs et EPR en feuillet) aux chondrocytes dans l'arthrose (Yoshida et al. 2023).

4. La manipulation génétique des cellules donneuses

D'autres stratégies pour éviter l'immunosuppression du patient consistent à modifier génétiquement des lignées de CSPhs afin de les rendre hypoimmunogénique au système immunitaire inné et adaptatif. Pour cela, différents gènes impliqués dans le CMH sont modifiés à l'aide de CRISPR-Cas9 ou d'autres techniques de modification du génome. Par exemple, il a été proposé d'induire l'inactivation des gènes Beta-2 Microglobulin (*B2M*) et CMH II transactivator (*CIITA*) pour que les cellules n'expriment plus les molécules CMH de classe I et II (Mattapally et al. 2018; Wang et al. 2020). Ces cellules ont montré chez le singe qu'elles ont la particularité de réduire la réponse immunitaire des lymphocytes T, B et des cellules Natural Killer. Avec le même objectif, d'autres équipes ont généré des lignées n'exprimant plus les CMH-A et CMH-B (qui font partie du CMH de classe I), ces lignées seraient compatibles avec 90% de la population mondiale (Han et al. 2019; Hong et al. 2017; Kitano et al. 2022; Xu et al. 2019). En plus de ces modifications, la surexpression de PD-L1, HLA-G et CD47 au sein de ces lignées permet de mieux contrôler la réponse des lymphocytes T, des cellules Natural Killer et des macrophages, et ainsi d'obtenir de meilleurs résultats (Frederiksen et al. 2021; Han et al. 2019). Bien que l'utilisation de ces lignées semble très prometteuse pour l'avenir de la médecine régénérative, il est important de constater que l'utilisation des cellules CMH déficientes, présente des risques car les molécules CMH de classe I sont normalement impliquées dans la reconnaissance des

antigènes tumoraux. En cas de transformation cancéreuse, les cellules pourraient plus facilement échapper au système immunitaire. Pour pallier cela, certaines études préconisent d'introduire dans les lignées un gène suicide. Par exemple, l'expression inductible du gène de l'*herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK)* confère aux cellules une sensibilité létale à l'antibiotique anti-herpès ganciclovir, car elles se mettent à produire la thymidine kinase (Shi et al. 2020). Le ganciclovir agit comme une prodrogue, il est métabolisé par la thymidine kinase en un triphosphate hautement toxique qui bloque la synthèse de l'ADN. Les cellules cyclantes y sont sensibles et subissent ainsi une inhibition de la réplication de l'ADN puis rentrent en apoptose cellulaire (Greco et al. 2015).

b. Les essais cliniques ciblant l'EPR

Les essais cliniques utilisant les cellules de l'EPR dérivées de CSPhs sont essentiellement des essais de sécurité (phase I) avec éventuellement la recherche de premiers signes de fonctionnalité en critères secondaires (phase I/II).

Les premiers essais cliniques ont utilisé des cellules EPR en suspension dérivées de CSEhs pour le traitement de patients atteints de DMLA atrophique (9 patients) et de la maladie de Stargardt (9 patients). Ce type d'approche a permis de montrer que les cellules de l'EPR ainsi greffées, après une immunosuppression systémique des patients, n'induisent pas de signe de rejet, et ne compromettent pas la sécurité du patient. Quelques effets secondaires ont été relevés, mais ils sont dus à la procédure chirurgicale et à l'immunosuppression. Le premier essai clinique de phase I/II réalisé dans ce sens a commencé en 2011, sur des patients ayant des formes avancées de la maladie de Stargardt ou une forme atrophique de la DMLA (ClinicalTrials NCT01345006 (pour les patients souffrant de la maladie de Stargardt) et NCT01344993 (pour les patients souffrant de la DMLA atrophique) (Schwartz et al. 2015). Il a consisté à injecter des cellules de l'EPR dérivées de CSPhs (50 000 à 150 000 cellules) dans l'espace sous-rétinien des patients. Cet essai avait pour objectif d'évaluer la sécurité et la tolérance des cellules injectées. Aucun effet indésirable majeur en rapport avec la greffe n'a été rapporté 4 ans après, et certains patients (13/18) ont constaté une augmentation mineure de leur acuité visuelle dans l'année qui a suivi l'injection (S. D. Schwartz et al. 2012; Schwartz et al. 2015, 2016). Des résultats similaires ont été rapportés par l'étude de Song et al. en 2015 qui a utilisé les mêmes cellules sur d'autres cohortes de patients (Song et al. 2015). De nombreux autres essais cliniques du même genre ont vu le jour peu de temps après (ClinicalTrials NCT02445612/ NCT02463344/NCT02563782) (S. Li et al. 2021; Lu et al. 2009; Mehat et al. 2018; Schwartz et al. 2015, 2016). Un autre essai clinique (UMIN-CTR number: UMIN000026003) a injecté en suspension des cellules l'EPR dérivés de CSPhis ayant un CMH homozygote appartenant à une haplobanque (250 000 cellules injectées) à 5 patients souffrant de DMLA néovasculaire ayant un CMH compatible avec celui des cellules injectées et n'ayant pas reçu d'immunosuppression forte (Sugita et al. 2020). Un an après l'injection, même si quelques effets secondaires ont été observés (œdème, pression intraoculaire élevée, infiltration du système immunitaire contré à l'aide de corticoïdes locaux), cette étude a montré une bonne survie des cellules transplantées et la sécurité des patients n'a pas été compromise. Leur acuité visuelle n'a pas été mesurée après la transplantation (Sugita et al. 2020).

Plus tard, des feuillets d'EPR dérivés de CSPhs ont été utilisés en essais cliniques. Le groupe de M. Takahashi a développé une approche visant à greffer un feuillet d'EPR dérivé de CSPhs sans membrane : du collagène a été utilisé pour permettre la maturation de l'EPR. Une fois l'EPR mature, le collagène est dissocié avec de la collagénase. Une greffe autologue d'un feuillet utilisant cette approche a été réalisée sur une patiente atteinte de DMLA néovasculaire (Clinical Trial UMIN000011929). Avant d'entamer la procédure, la patiente avait eu 13 injections d'anti-VEGF en intraoculaire durant 29 mois, sans qu'aucune amélioration ne soit visible. Malgré cela, son acuité visuelle a diminué passant de 0.15 à 0.09. La patiente ayant reçu le feuillet a maintenu son acuité visuelle durant les 25 mois qui ont suivi son opération. Cet essai clinique de phase I s'est arrêté en 2015 à cause d'un changement de législation (Mandai et al. 2017).

D'autres équipes ont récemment démarré des essais cliniques en dérivant un feuillet d'EPR à partir de CSPhs sur différents substrats avant de le greffer dans l'espace sous-rétinien des patients. Dans l'étude de Da Cruz et al. l'EPR dérivé de CSEhs a été aussi transplanté en feuillet en utilisant une membrane synthétique de Polytéréphtalate d'éthylène (PET). Un an après la greffe, les deux patients atteints de DMLA néovasculaire aiguë présentent une amélioration très significative de leur vision malgré quelques effets secondaires non liés à la présence du greffon (liés à la chirurgie et au traitement immunosuppresseur) (ClinicalTrial NCT01691261) (da Cruz et al. 2018). Une approche similaire a été réalisée dans l'étude de Kashani et al. où 4 patients souffrant de DMLA atrophique progressive ont été greffés avec un feuillet d'EPR dérivé de CSEhs sur une membrane de parylène-C. 6 mois après la procédure, 1 seul patient a montré une augmentation de son acuité visuelle, et aucun effet secondaire dû à la présence du greffon n'a été observé (ClinicalTrial NCT02590692) (Kashani et al. 2018). La différence majeure entre ces deux études (Da Cruz et al. 2018 et Kashani et al. 2018) est que les patients dans l'étude de Kashani *et al.*, présentaient une forme de DMLA atrophique et progressive où la majorité des photorécepteurs étaient déjà morts ou dysfonctionnels, c'est donc pour cela que la fonctionnalité à l'issue de cette étude a été très faible. A l'inverse, les patients traités dans l'étude de Da Cruz *et al.*, souffraient d'une forme de DMLA néovasculaire avec une perte récente et aiguë de la vision, certains photorécepteurs restent fonctionnels, c'est donc probablement pour cela que l'étude a engendré de meilleurs résultats.

Notre équipe a aussi développé un patch comprenant un EPR fonctionnel dérivé de CSEhs sur une membrane amniotique humaine. Ce projet est actuellement en essai clinique de phase I/II, il implique 12 patients souffrant de RP portant des mutations les gènes de l'EPR : *LRAT*, ou *MERTK*. Les résultats sont attendus pour décembre 2026 (ClinicalTrials NCT03963154).

L'ensemble des essais cliniques sont reportés dans la **Table 5**.

Auteurs	N	type de transplantation	membrane	effets secondaires	améliorations	study IDa
Schwartz et al. 2018	18	cellules de l'EPR en suspension dérivées de CSEh	aucune	imflammation du vitrée, cataractes	15 lettres dans 4 yeux; 11-14 lettres dans 3 yeux; moins de 10 lettres dans 3 yeux	NCT01345006
Riemann et al. (poster)	16	cellules de l'EPR en suspension dérivées de CSEh	aucune	hémorragie, oedème	10-22 lettres	
Kashani et al. 2018	4	EPR en feuillet dérivé de CSEh	Parylène C		17 lettres chez un patient; rien chez les 3 autres	NCT02590692
Tezel et al. 2007	12	EPR humain allogénique	aucune	3 détachements rétinien; une fibrose	aucune	
Binder et al. 2004	53 (39 transplantés et 14 contrôles)	EPR autologue en suspension	aucune	aucun	meilleure capacité à lire et meilleure reponse ERG chez les sujets transplantés	
Mandai et al. 2017	1	EPR obtenu à partir de CSPHi autologue issus de fibroblastes	aucune	aucun	aucune	UMIN000011929
Da Cruz et al. 2018	2	EPR en feuillet dérivé de CSEh	PET	1 détachement rétinien	29 et 21 lettres sur les 2 patients	NCT01691261
Sugita et al. 2020	5	EPR en suspension dérivés de CSPHi	aucune	2 rejets benins	aucune	UMIN000026003
Mehat et al. 2018	12	cellules de l'EPR en suspension dérivées de CSEh	aucune		aucune	NCT01469832
Li et al. 2021	7	cellules de l'EPR en suspension dérivées de CSEh	aucune	2 pressions intraoculaires augmentées	7 yeux montrent une amélioration et 2 yeux montrent aggravation	NCT02749734
Sung et al. 2021	3	cellules de l'EPR en suspension dérivées de CSEh	aucune		1 œil montre une augmentation et 1 œil est stable	NCT01625559
Ben m'barek et al. 2017	12	EPR en feuillet dérivé de CSEh	membrane amiotique humaine		étude en cours	NCT03963154
Sharma et al. 2019	20	EPR en feuillet dérivé de CSPHi autologues	PLGA		étude en cours	NCT04339764

Table 5 : Récapitulatif des essais cliniques visant à restaurer l'EPR.

c. Les essais cliniques visant à restaurer les photorécepteurs

La plupart des essais cliniques de thérapie cellulaire actuellement en cours vise surtout à restaurer l'EPR, et très peu d'entre eux sont destinés à restaurer la fonction des photorécepteurs lorsqu'ils sont morts.

Historiquement, des essais cliniques de greffe de rétine fœtale ont posé les bases de possibilité de restauration de la fonction visuelle par thérapie cellulaire. Ainsi, l'équipe du Dr Seiler a initié un essai clinique de phase II en 2008 (ClinicalTrials NCT00345917, NCT00346060) consistant à transplanter des feuillets rétinien fœtaux allogéniques (10 à 15 semaines de gestation) comportant les CPR et l'EPR sur 10 patients souffrant de dégénérescences rétinien (6 patients RP et 6 patients DMLA). Sept des patients (3 patients RP et 1 patient DMLA) ont montré une amélioration de leur acuité visuelle 6 mois après greffe avec la perception de quelques lettres supplémentaires sur le test BCVA, mais cette amélioration n'a pas été visible sur l'ERG. Test BCVA ou Best Corrected Visual Acuity en anglais est une mesure de l'habilité à distinguer des formes et des détails d'un objet à une distance donnée à l'aide de lentilles correctives (Lee et al. 2022). Les patients n'ont pas reçu d'immunosuppresseur, et aucun rejet n'a été observé. Néanmoins, une dépigmentation du feuillet a été remarquée, remettant en cause la survie des cellules transplantées (Radtko et al. 2008). A l'inverse, aucune récupération de la fonction visuelle n'a été observée en greffant des feuillets de photorécepteurs obtenus à partir de

cadavres humains. Ce dernier essai clinique avait été réalisé sur 8 patients atteints de RPs en 2003 et sans traitement immunosuppresseur (Berger et al. 2003).

Actuellement, il existe un seul essai clinique de thérapie cellulaire visant à restaurer les photorécepteurs à partir de CSPhs sous forme d'un feuillet organisé. Cet essai a commencé en 2020, grâce aux études de l'équipe du Pr. Takahashi au Japon (Japan Registry of clinical trials, jRCTa050200027). La stratégie développée consiste à greffer un feuillet issu d'organoïdes de rétine dérivés de CSPhis sur des patients atteints de RPs à des stades avancés. La greffe s'est déroulée avec succès sur les deux premiers patients, et aucun effet secondaire n'a été relevé. Aucune fonctionnalité n'a été démontrée, car, les feuillets greffés sont très petits, ils mesurent environ 1mm de diamètre. Cependant, une fois les questions de sécurité validées, de plus grands feuillets pourraient être implantés en combinant plusieurs organoïdes (Maeda et al. 2022).

II. Objectifs

L'objectif de ma thèse a consisté à élaborer et à caractériser un produit de thérapie cellulaire. Celui-ci est un tissu rétinien cultivé *in vitro* et composé de différentes couches cellulaires organisées. Les cellules utilisées ont été différenciées à partir de CSPhs en photorécepteurs et en cellules EPR. Mon travail s'est organisé en 3 axes principaux : (i) caractériser les cellules EPR organisées en épithélium ; (ii) différencier les CSPhs en photorécepteurs ; (iii) recréer *in vitro* un tissu rétinien organisé avec des photorécepteurs et des cellules EPR.

Notre laboratoire a déjà développé une thérapie cellulaire EPR actuellement en essai clinique de phase I/II permettant de restaurer un EPR dysfonctionnel (patients porteurs de mutations sur les gènes *MERTK* et *LRAT*). La formulation du produit de thérapie cellulaire destinée à être greffée est sous forme de tissu épithélial. Cette formulation rend plus difficile la caractérisation de celui-ci pour en définir les propriétés intrinsèques et ainsi développer des contrôles qualité nécessaires à la sélection des greffons à transplanter. Nous avons donc cherché à développer une stratégie de contrôle qualité originale basée sur l'analyse des propriétés biophysiques de l'EPR qui restent encore méconnues.

Le second axe de ma thèse a été de développer un protocole de différenciation des CSPhs en photorécepteurs. Bien que différents protocoles via la formation d'organoïdes de rétine existent, ceux-ci conduisent à la production d'autres types cellulaires de la rétine neurale. Les photorécepteurs peuvent ensuite être isolés par des techniques de tri magnétiques complexes. Nous avons donc cherché à contourner ces étapes en développant une méthode de différenciation en 2D en appliquant une approche d'analyse systématique des facteurs (cytokines, petites molécules) pouvant permettre un enrichissement de la différenciation en photorécepteurs.

Le troisième axe de ma thèse a été de développer un tissu rétinien *in vitro* constitué de l'assemblage de photorécepteurs sur un EPR. Il a fallu développer des approches innovantes pour permettre l'organisation des photorécepteurs sur cet épithélium. Pour ce faire, nous avons mis au point des membranes microstructurées originales que nous avons évaluées pour leur capacité à permettre cette organisation caractéristique.

III. Résultats

1 Caractérisation biomécanique des cellules de l'EPR en utilisant un microscope à force atomique

a. Introduction

L'EPR joue un rôle crucial dans la survie et l'homéostasie des photorécepteurs. Cependant, cet EPR est atteint dans certaines formes de DMLA et de RPs, affaiblissant la barrière hémato-rétinienne, garante de l'intégrité de la rétine (Campbell et Humphries 2012). La barrière hémato-rétinienne est constituée de la choroïde, de la membrane de Bruch et de l'EPR (Guymer, Bird, et Hageman 2004). L'altération des jonctions serrées de l'EPR, qui sont les structures clés de son étanchéité, mène à la formation d'oedèmes dans la plupart des dégénérescences rétiniennes (O'Leary et Campbell 2023).

Plusieurs thérapies cellulaires visant à remplacer l'EPR dégénéré ou dysfonctionnel sont en développement. Dans le cadre de la thérapie cellulaire, les cellules EPR destinées à être transplantées sont issues de la différenciation des CSPhs. La formulation finale du produit de thérapie cellulaire est le feuillet EPR dans la majorité des études, ce qui nécessite des contrôles qualité adaptés. Les contrôles qualité effectués pour garantir la fonctionnalité et la sécurité de l'EPR à greffer sont surtout utilisés sur des cellules EPR en suspension (RT-qPCR, cytométrie en flux). Les autres contrôles qualité utilisés sur l'EPR sous forme d'épithélium sont les immunofluorescences, afin de déterminer les expressions des protéines d'intérêt, la TEER (Trans Epithelial Electrical Resistance) permettant d'évaluer l'étanchéité de l'épithélium, le test ELISA qui permet de mesurer la sécrétion de cytokines, et la microscopie électronique qui permet de visualiser la structure cellulaire et épithéliale. Cependant, toutes ces techniques sont longues et peu adaptées. En effet, le produit thérapeutique final a une durée de vie courte avec les méthodes actuelles (il s'agit d'un matériel vivant) et il doit donc être implanté rapidement. Idéalement, les résultats des contrôles qualité doivent être obtenus avant la libération du produit (conformité du produit avant sa sortie de l'établissement pharmaceutique).

Peu d'études se sont intéressées aux paramètres mécaniques régissant l'épithélium EPR (Fabian et al. 2019; Ni et al. 2017; Wiktor et al. 2018). Pourtant, les propriétés mécaniques des cellules EPR contribuent à une part importante des fonctions épithéliales et de la fonction de la barrière hémato-rétinienne (Fabian et al. 2019). Une étude réalisée sur des fragments de tissus de l'EPR de porc a montré que les cellules contenant des granules de mélanine sont plus rigides (16,01 kPa) que celles qui n'en contiennent pas (0,17kPa) (Sarna et al. 2017). L'étude a conclu que les granules de mélanine contenues principalement à la surface des cellules EPR sont principalement responsables de la rigidité de la barrière hémato-rétinienne (O'Leary et Campbell 2023; Sarna et al. 2017). La majorité des études décrivant les propriétés biomécaniques de l'EPR ont été réalisées sur des cellules non humaines ou sur des cellules ARPE-19, une lignée EPR adulte isolée en 1996 (Dunn et al. 1996). Considérée comme une lignée représentative de l'EPR, la lignée ARPE-19 est malheureusement souvent décrite comme ayant une faible valeur de résistance trans-épithéliale, perdant l'expression de ses gènes spécifiques à l'EPR, souvent utilisée avec un trop haut nombre de passages, et parfois comme présentant un défaut de pigmentation (Klimanskaya et al. 2004; Pfeffer et Fliesler 2022). Ainsi, les propriétés biomécaniques de cellules plus proches de l'EPR humain *in vivo* restent encore méconnues.

Par ailleurs, ces propriétés mécaniques peuvent être un indicateur de stress précoce subléthale (Lee et Lim 2007; Wiktor et al. 2018). La morphologie des cellules et leurs propriétés mécaniques sont déterminées par le cytosquelette, car il a été reconnu comme étant un indicateur sensible aux changements cellulaires (Fuchs et Cleveland 1998; Jin et al. 2014). Beaucoup de maladies humaines sont aussi caractérisées par une modification de la rigidité des cellules, comme le cancer, la fibrose, le vieillissement, les maladies cardiovasculaires et les maladies chroniques telles que le diabète (An et al. 2006; Martinez-Vidal et al. 2021; Plodinec et al. 2012).

Dans cette étude, nous avons utilisé un microscope à force atomique (AFM pour atomic force microscope) afin d'investiguer les propriétés mécaniques et structurales de la surface apicale de plusieurs épithéliums EPR à des temps de maturation différents. Car contrairement à d'autres méthodes, l'AFM est une technique de haute résolution topographique et il a été très utilisé pour caractériser les propriétés mécaniques d'un grand nombre de tissus (Thomas et al. 2013). Trois lignées de cellules EPR ont été différenciées à partir de CSPhs tandis qu'une 4ème est issue d'une lignée adulte ARPE-19. Après la caractérisation biologique des épithéliums obtenus, nous avons analysé la surface de l'épithélium, point par point, par AFM au moyen d'un balayage via une sonde locale, similaire à une pointe effilée.

Ces résultats font l'objet d'un manuscrit soumis à ***Stem Cells Translational medicine*** (présenté dans la section suivante).

b. Publication scientifique

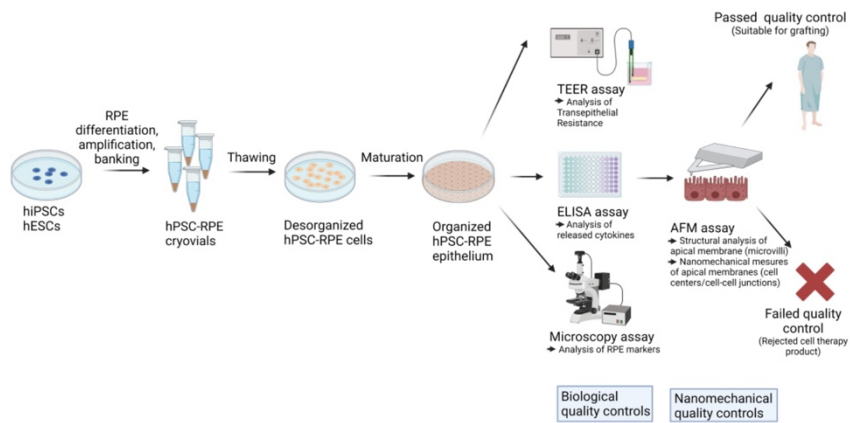


Biomechanical characterization of retinal pigment epitheliums derived from hPSCs using atomic force microscopy

Journal:	<i>Stem Cells Translational Medicine</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript type:	Original Research
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Herardot, Elise; I-Stem, CENTRE D ETUDE DES CELLULES SOUCHES; INSERM U861, retinopathies Liboz, Maxime; LAMBE Lamour, Guillaume; LAMBE Malo, Michel; LAMBE Plancheron, Alexandra; I-Stem, CENTRE D ETUDE DES CELLULES SOUCHES; INSERM U861, retinopathies Habeler, Walter; I-Stem, CENTRE D ETUDE DES CELLULES SOUCHES; INSERM U861, retinopathies Geiger, Camille; I-Stem, CENTRE D ETUDE DES CELLULES SOUCHES; INSERM U861, retinopathies Frank, Elie; I-Stem, CENTRE D ETUDE DES CELLULES SOUCHES; INSERM U861, retinopathies Campillo, Clément; LAMBE Monville, Christelle; I-Stem BEN M'BAREK, Karim; INSERM U861, retinopathies; I-Stem
Keywords:	Cellular therapy, induced pluripotent stem cells (iPSCs), retinal pigmented epithelium, Retina, Tissue Engineering, Transplantation
Journal Section:	Manufacturing for Regenerative Medicine
Cell Types:	Embryonic Stem Cells , Induced Pluripotent stem cells
Diseases/Processes/Areas:	Cell Delivery Strategies, Mechanobiology

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



645x452mm (236 x 236 DPI)

Biomechanical characterization of retinal pigment epitheliums derived from hPSCs using atomic force microscopy

Elise Herardot^{1,2}, Maxime Liboz³, Guillaume Lamour³, Michel Malo³, Alexandra Plancheron^{1,2,4}, Walter Habeler^{1,2,4}, Camille Geiger^{1,2,4}, Elie Frank^{1,2}, Clément Campillo^{3,5}, Christelle Monville^{1,2*} and Karim Ben M'Barek^{1,2,4*}

¹INSERM U861, I-Stem, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases;

²Université Paris-Saclay, Université d'Évry, U861, 28, Rue Henri Desbruères 91100 Corbeil-Essonnes, France;

³LAMBE, Université d'Évry, CNRS, CEA, Université Paris-Saclay, Évry-Courcouronnes 91025, France

⁴Centre d'Etude des Cellules Souches, AFM, 28, Rue Henri Desbruères 91100 Corbeil-Essonnes, France;

⁵ Institut Universitaire de France (IUF).

*Correspondence: cmonville@istem.fr and kbenmbarek@istem.fr

Running title:

Retinal pigment epithelium biomechanics

Abstract

The retinal pigment epithelium (RPE), a multifunctional cell monolayer located at the back of the eye, plays a crucial role in the survival and homeostasis of photoreceptors. Dysfunction or death of RPE cells leads to retinal degeneration and subsequent vision loss, such as in Age-related macular degeneration and some forms of Retinitis Pigmentosa. Therefore, regenerative medicine that aims to replace RPE cells by new cells obtained from the differentiation of human pluripotent stem cells, is the focus of intensive research. However, despite their critical interest in therapy, there is a lack of biomechanical RPE surface description. Such biomechanical properties are tightly related to their functions. Herein, we used atomic force microscopy (AFM) to analyze both the structural and mechanical properties of RPEs obtained from four cell lines and at different stages of epithelial maturation. To characterize mature epitheliums, we used apical markers in immunofluorescence and showed the increase of transepithelial resistance, as well as the ability to secrete cytokines with an apico-basal polarity. Then, we used AFM to scan the apical surface of living or fixed RPE cells. We show that RPE monolayers underwent softening of apical cell center as well as stiffening of cell borders over epithelial formation. We also observed apical protrusions that depend on actin network, suggesting the formation of microvilli at the surface of mature RPE epitheliums. These RPE cell characteristics are essential for their functions into the retina and AFM studies may improve the characterization of the RPE epithelium suitable for cell therapy.

Significance statement

RPE cells differentiated from human pluripotent stem cells were able to form *in vitro* a cohesive functional epithelium. Nanomechanical properties of these cells were evaluated using an atomic force microscope. Stiffness at the apical surface of hPSC-RPE cells was inversely correlated with epithelial maturation and cell density. At a subcellular level, cell-cell junctions in 2-week old RPE epitheliums appeared more stiffer than cell centers. Finally, high-resolution images revealed the presence of microvilli on top of the apical membrane. Taken together, nanomechanics can be used as a readout of the quality and maturity of hPSC-RPE epithelium suitable for cell therapy.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Introduction

Retinal degenerative diseases engender the death of photoreceptors, which are the light sensing cells essential for vision. These diseases may be caused by genetic alterations or dysfunctions of photoreceptors and/or retinal pigment epithelium cells (RPE cells), such as in age-related macular degeneration (AMD) and retinitis pigmentosa (RP) ¹⁻³. To date, no effective treatment has been proposed for the majority of patients. RPE cell dysfunctions participate to AMD pathology and represent 5% of RP cases ⁴. Hence, replacement of dysfunctional or dead RPE cells by new cells generated *in vitro* is an attractive strategy to restore RPE cell functions and prevent photoreceptor loss.

Current cell therapy approaches rely on the differentiation of human pluripotent stem cells (hPSCs) into RPE cells. Several laboratories as well as our group have developed such protocols to generate RPE cells, to characterize these cells and set up transplantation strategies to deliver the cell therapy in rodents and primates ^{4,5}. First-in-man clinical trials aiming to evaluate safety of the cell therapy were launched with some early positive safety results already published ⁶⁻⁹.

These first generations of cell therapies still need to be further optimized to be more effective (through improved epithelial organization prior to implantation), to be scaled-up to address the target patient population and to identify controls informative of the quality of the cells to be used for cell therapy. Indeed, as living biological products, RPE cells have more variability compared to chemicals with well-characterized properties. Thus, understanding RPE cell structure and normal functions appears necessary for the efficient development of a cell therapy that will produce donor cells with controlled characteristics. For example, Ye and collaborators recently proposed a machine-learning-based model to predict cell quality, based on microscopic images of epithelium obtained from human induced pluripotent stem cells (hiPSC)-derived RPE cells ¹⁰.

Here, we pursue this effort of characterizing hPSC-RPE sheets by measuring the mechanical properties of RPE cells. A few studies have addressed the mechanics of adult RPE cells ¹¹⁻¹³; yet, none has investigated the mechanics of cells derived from hPSCs. Mechanical properties are critical to the epithelial functions of RPE cells, that are an important part of the blood-retina barrier (BRB) separating the choriocapillaris from the neural retina ¹¹. Indeed, tight junctions interconnecting RPE cells ensure the sealing of the BRB by preventing paracellular

1
2
3 permeability. BRB disruption may have irreversible consequences to neural retina as observed
4
5 in several diseases such as AMD, inflammation or metabolic diseases ¹⁴. In addition,
6
7 mechanical properties of RPE cells can be altered by hyperosmotic stress, a phenomenon
8
9 observed in macular edema ¹¹. Thus, external cues could affect the mechanical properties of
10
11 cells forming an epithelium. Changes in the cytoskeleton organization and subsequent
12
13 mechanical properties can be viewed as an early and sensitive indicator of sub-lethal stress
14
15 ^{12,15,16}. Moreover, several human diseases are correlated with abnormal cell stiffening or
16
17 softening ^{17,18}. Therefore, characterizing hPSC-RPE cell mechanical properties will help setting
18
19 up quality controls for cell therapy products.

20
21 In this study, we differentiated three hPSC lines into RPE cells to evaluate their quality and the
22
23 functions of newly formed epitheliums. Based on these characteristics, we compared their
24
25 performance according to the cell lines. We then evaluated mechanical characteristics at a
26
27 nanometric scale of these hPSC-RPE cells using an atomic force microscope (AFM). We
28
29 observed that nanomechanical properties of RPE cells were modified after epithelial
30
31 formation. Our results lay the foundation of a better understanding of epithelial mechanical
32
33 characteristics of RPE epitheliums derived from hPSCs.
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Methods

Cell culture

The clinical grade hESC line RC-9 (referred as hESC) has been derived by Roslin Cells (Edinburgh, Scotland) and was described in ²¹. hiPSC-GFP (referred as hiPSC1) was obtained from Coriell Institute (USA ; AICS-0036 cell line). hiPSC PC-1432 (referred as hiPSC2) was reprogramed (OSKM episomes) by Phenocell (Grasse, France) and was already described ³². hPSCs were cultured with Stempro hESC medium (Thermo Fischer scientific, USA) supplemented with FGF2 (Miltenyi Biotec, Germany). Culture dishes were coated with L7 hPSC matrix (Lonza Bioscience, USA) and culture medium was change 3 times a week.

RPE cells were differentiated from hPSCs according to our previously published protocol ²¹. Briefly, the differentiation medium was composed of Dulbecco's modified Eagle's medium (high glucose, Thermo Fisher Scientific, USA) with 20% knockout serum replacement (KSR, Thermo Fisher Scientific), supplemented with 50 μ M β -mercaptoethanol and 1% nonessential amino acids supplement (Thermo Fisher Scientific, USA). KSR concentration was then reduced to 4% following pigmented patches manual isolation and amplification. Culture dishes were coated with L7 hPSC matrix (Lonza Bioscience, USA) all along the differentiation process. Cells were detached and dissociated with TrypLE during the amplification process (Thermo Fisher Scientific, USA). hPSC-RPE cells were banked at passage 1 (P1) in Cryostor CS10 medium (BioLife Solutions Inc., USA) and stored in liquid nitrogen. hPSC-RPE cells were thawed at 500 000 cells per cm^2 for the different experiments. ARPE-19 cells (CRL-2302 cell line from ATCC, USA) correspond to an adult RPE cell line and were cultured with Dulbecco's modified Eagle's medium: nutrient mixture F-12 (DMEM/F12) supplemented with 10% fetal bovine serum (Thermo Fischer scientific, USA). When indicated in the text, Latrunculin A (L12370, Thermo Fisher Scientific, USA) was applied at 1 μ M at least one hour on hPSC-RPE and ARPE-19 cells cultured for 14 days.

VEGF ELISA assay

hPSC-RPE and ARPE-19 cells were grown on Transwell membrane (Corning) coated with L7TM hPSC matrix (Lonza Bioscience, USA). Culture media from apical and basal compartments were collected every week. VEGF measurements were performed using the human VEGF Quantikine ELISA kit (R&D System, USA) according to manufacturer instruction.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Immunostaining and image acquisition

Immunofluorescence staining was performed on hPSC-RPE and ARPE-19 cells cultured on Transwell membrane (Corning, USA). Cells were blocked with 10% normal goat serum (NGS) in PBS 0.1% triton x100. Primary antibodies used in this study were MERTK (ab5968, Abcam, UK) and EZRIN (E8897, Merck, Germany). Cells were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in PBS 0.1% triton X100 with 5% NGS. Specific antibodies coupled to Alexa Fluor 488 and 555 were used as secondary antibodies. Phalloidin-AF647 (A22287, Thermo Fischer scientific, USA) was incubated at the same time as secondary antibodies. Nuclei were counterstained with either DAPI (Cell Signaling) and mounted in Fluoromount G (Southern Biotech, USA). Images were acquired with an inverted confocal microscope (Zeiss). For zx images, xy stacks covering cell width were resliced in zx then followed by a maximal projection using ImageJ software. For xy images, a maximal projection was realized around cell width.

Measurement of transepithelial electrical resistance

hPSC-RPE and ARPE-19 cells were cultured on transwell membranes. TEER was measured using an EVOM2 epithelial Voltohmmeter (World Precision Instruments, USA) with STX2 hand held electrodes. To obtain TEER values of a target sample, output value of the blank (transwell insert without cells) was subtracted from the sample output. Values are expressed as ohm.cm².

Atomic Force Microscopy

hPSC-RPE and ARPE-19 cells were cultured in 6 cm of diameter culture dishes. Topography and mechanical mapping was obtained using the Quantitative Imaging™ (QI) mode of the Nanowizard 4 Bioscience AFM from JPK/Bruker. In QI mode, the AFM tip is driven vertically to collect a force-distance curve for each pixel of the image. During the downwards approach, the AFM tip contacts the cell and indents it. When it reaches the force setpoint, that is, the maximum force applied by the tip to the sample (300–600 pN in our experiments), the AFM tip moves upwards and retract from the cell, before moving laterally and starting a new approach-retract cycle corresponding to a new pixel. PeakForce QNM-Live Cell cantilevers (PFQNM-LC-A-CAL; Bruker AFM Probes) with 65 nm tip radius were used. In all experiments, cantilever sensitivity was obtained by collecting a force curve on a stiff glass surface. The spring constant of the cantilever was then calibrated using the thermal tune method. The

1
2
3 spring constant was in a range of 0.06–0.10 N/m. Force-indentation curves were collected
4 with 100 $\mu\text{m/s}$ probe velocity over a variable area (10–100 μm^2) with a resolution of 64×64
5 and up to 256×256 pixels. AFM experiments were performed at 30°C under air flow
6 containing 5% CO_2 and within 2 hours after the cells were taken out of the incubator. In some
7 experiments, cells were fixed using 4 % formaldehyde for 30 min at room temperature and
8 rinsed with PBS before AFM imaging.
9

10 **Analysis of AFM force-distance curves**

11 To quantify the cell stiffness, we calculated the Young's modulus E by fitting a Hertz-Sneddon
12 model to the force-distance curves : $F=0.8887 E/(1-\nu^2) \tan\alpha \delta^2$, where F is the measured
13 force, α the half opening angle of the tip, ν the Poisson ratio, assumed to be 0.5 in our
14 experiments, and δ the indentation. Curve fitting was performed using the JPK Data Processing
15 software (version 6.3.49). Fitting a Hertz model to the data provides the location of the contact
16 point, that is, the altitude at which the AFM tip contacts the cell. In addition, we also collected
17 topography maps in which each pixel corresponds to the precise vertical position the tip has
18 at a specific force, that we refer to as height at (a given force) maps. These maps better reflect
19 the structural details present inside the cell, as they exhibit better contrast between soft
20 cytoplasmic areas and stiffer cytoskeletal filaments such as actin stress cables, for instance. In
21 this paper, the AFM images in **Figure 4C** show the contact point height. All other AFM images
22 display the height at ~ 300 pN.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 **Statistical Analysis**

41 GraphPad Prism 9.3.1 (GraphPad Software, Inc., USA) was used for statistical analysis.
42 Significant two-way ANOVAs were followed up with Bonferroni posttest. Mann Whitney test
43 was used when two groups unpaired were analyzed. When more than two groups, Kruskal-
44 Wallis non-parametric test was used followed by Dunn's multiple comparisons test; * $p < 0.05$,
45 ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Results

RPE cells differentiated from hPSCs form a cohesive and mature epithelium following *in vitro* cell culture

RPE cells can be obtained from the differentiation of both human embryonic stem cells (hESCs) and human induced pluripotent stem cells (hiPSCs), with equivalent visual outcomes following transplantation *in vivo*¹⁹ and both cell sources are currently evaluated in clinical trials²⁰. Therefore, we differentiated three hPSCs (1 hESC line and 2 hiPSC lines) into RPE cells using an established protocol²¹. Briefly, hPSCs were seeded and grown to confluence before withdrawal of fibroblast growth factor 2 (FGF2; used to maintain the pluripotency, **Figure 1A**). After 6-8 weeks of culture, pigmented patches appeared in culture dishes and were collected manually using a scalpel. We further amplified these patches for three additional weeks and froze cells in cryovials for future use on demand. The different cell lines were thawed and grown in culture dishes for two months to form a mature epithelium. hPSC-RPE epitheliums from the three lines exhibited a classical RPE cobblestone morphology and formed an epithelial monolayer. Immunofluorescence assays revealed the polarization of key epithelial markers (**Figure 1B-D**), which localized at the apical side of monolayers. First, we labelled MER proto-oncogene tyrosine-protein kinase (MERTK) protein (an apical marker) that is involved in phagocytosis function of RPE cells. Second, EZRIN indicated the presence of microvilli on top of RPE cells^{22,23}. We also observed actin microfilaments at the apical side of the cells, with a clear local enrichment at cell-cell borders (**Figure 2A-B**). These data suggest the formation of a cohesive, mature epithelium, with tight junctions for the three hPSC-RPE lines. We also evaluated the formation of an epithelial monolayer from an adult RPE line (ARPE-19 line) that is classically used as an immortal adult RPE cell line. As observed in other studies^{24,25}, ARPE-19 cells have lost some typical RPE characteristics such as pigmentation and do not form a complete mature epithelium. Indeed, some epithelial markers are missing, such as MERTK or cortical actin in the apical side (**Figure 1-2**). Nevertheless, we used this adult RPE line as a RPE line lacking some crucial maturation markers for comparison with hPSC-RPE cell lines.

Functionality of hPSC-RPE increases upon epithelial maturation *in vitro*

Upon maturation of RPE sheets, tight junctions start to appear and the paracellular diffusion of molecules becomes limited. This barrier function, essential in the BRB can be assayed by

1
2
3 measuring the resistance to an electrical current (transepithelial electrical resistance (TEER))
4
5 ²⁶. We evaluated the rise of TEER upon epithelial maturation of the four RPE lines during 37
6
7 days (**Figure 3A-B**). TEER increased over time for all conditions, suggesting epithelial
8
9 maturation and effective barrier function. However, hESC-RPE and hiPSC1-RPE cells had a
10
11 significantly higher TEER than hiPSC2-RPE and ARPE-19 cells. At D37, hESC-RPE and hiPSC1-
12
13 RPE cells had a TEER of 115 and 114 ohm.cm², respectively, similar to living human RPE values
14
15 (150 ohm.cm² ²⁵). hiPSC2-RPE and ARPE-19 cells had a lower TEER of 54 ohm.cm² (a typical
16
17 low value observed in other ARPE-19 studies ^{24,27}). These data suggest that the different RPE
18
19 cell lines can all produce a mature epithelium, with varying levels of quality/performance as
20
21 indicated by differences in TEER.

22 We then evaluated the release of vascular endothelial growth factor (VEGF), another critical
23
24 function of mature RPE. VEGF is released preferentially in the basal side of RPE (toward the
25
26 choroid *in vivo* to ensure the maintenance of the choriocapillaris ²⁸). The four RPE cell lines
27
28 were cultured on Transwell permeable supports to monitor VEGF release on apical and basal
29
30 compartments over time, using VEGF ELISA assays. We observed an increased secretion of
31
32 VEGF over time in all compartments for all RPE cell lines (**Figure 3C**). A significantly higher
33
34 basal secretion at D23 was observed for the three RPE lines derived from hPSCs, when
35
36 compared to corresponding apical compartments. Such increased basal secretion was not
37
38 observed with ARPE-19 cells up to 23 days. In addition, VEGF secretion amounts were different
39
40 according to the RPE cell lines. Similar to TEER measures, hESC-RPE and hiPSC1-RPE cells were
41
42 more performant, with higher amounts of secreted VEGF compared to hiPSC2-RPE and ARPE-
43
44 19 cells. Taken together, TEER and VEGF secretion assays provide strong support for the
45
46 formation of functional epitheliums *in vitro* from hPSC-RPE cells.

47 **Mechanical properties of hPSC-RPE cells change upon epithelial formation**

48
49 To further characterize functional epitheliums, we measured mechanical properties of living
50
51 RPE cells derived from hPSCs with force-indentation experiments using an atomic force
52
53 microscope (AFM) (**Figure 4A**). Thanks to a small tip (radius < 100 nm) interacting with samples
54
55 at piconewton forces, AFM simultaneously provides nanoscale topography and mechanical
56
57 measurements of soft matter materials *in situ*, such as living cells or tissues ¹⁸ or biomimetic
58
59 materials ²⁹. The cell stiffness is quantified by the Young's modulus (in N.m⁻² or pascals), and
60
a higher or lower modulus corresponds to a stiffer or softer material, respectively.

1
2
3 For the three RPE cell lines derived from hPSCs, cell stiffness measured on the apical surface
4 significantly diminished upon epithelial maturation from day 2 to day 16 (**Figure 4B**). During
5 this time period, RPE cells derived from hPSCs proliferated to reach confluence from 6.4×10^4
6 (\pm SEM 8.1×10^3) cells per cm^2 to 8.4×10^5 (\pm SEM 6.8×10^4) cells per cm^2 . As a result, stiffness
7 inversely correlates with cell density and epithelial maturation.
8
9

10
11
12 Next, we measured the stiffness of cell junctions between two cells to compare it to cell
13 centers after 2 weeks of epithelial formation. A representative line was traced in each image
14 and was plotted in a graph to show the height and stiffness along the cross-section
15 corresponding to that line (**Figure 4C**). In some instances, cell junctions appeared stiffer than
16 cell centers (case of hiPSC1-RPE, bottom graph), but not all cell junctions had this specific
17 pattern. Collectively, these results suggest that cell stiffness is an indicator of both RPE
18 epithelial reformation and apparition of tight junctions.
19
20
21
22
23
24
25

26 **Stiffness of RPE cells forming an epithelium depends on actin networks**

27
28 Actin microfilaments play an essential role in mechanotransduction and in shaping cell
29 architecture as a response to force signals³⁰. Hence, the structure of actin assemblies has a
30 direct effect on cell stiffness³¹. Force-indentation experiments revealed differences in the
31 structure and mechanical properties of hESC-RPE and ARPE-19 cells (**Figure 5**). hESC-RPE
32 epitheliums exhibited a heterogeneous distribution of stiffness, with cell junctions being often
33 stiffer than cell centers (**Figure 5A** and **5C**). In ARPE-19 cells, a dense network of filamentous
34 structures formed nodes and bundles with high stiffness (up to 50 kPa). These mechanical
35 observations are consistent with the actin distribution observed using phalloidin labelling
36 (**Figure 2**). To estimate the effect of destabilizing actin cortical networks on apical membrane
37 stiffness of RPE cells, we treated hESC-RPE and ARPE-19 cells with Latrunculin A (LatA, 1mM),
38 just after a 2-week culture period allowing epithelial formation (**Figure 5A** and **5B**). LatA
39 induced a significant lowering of the cell stiffness on the apical side of living RPE cells for both
40 lines. Areas of high stiffness in hESC-RPE epitheliums (cell borders) and ARPE-19 cells
41 (filaments and bundles) disappeared; this supports the view that actin networks drive cell
42 stiffness in our experiments.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56

57 To gain insights into the tightening of cell junctions, we compared cell stiffness at the junctions
58 with cell stiffness at the centers of cells for both hESC-RPE and ARPE-19 cells. Although some
59
60

1
2
3 junctions were not stiffer than cell centers (**Figure 5C and C2**), the mean stiffness was
4 significantly higher at cell junctions than in cell centers for both ARPE-19 and hESC-RPE cells
5 (**Figure 5D**). Whereas this confirms the maturation of the RPE epithelium, it also suggests that
6 the monolayer can display heterogeneity in the strength of junctions.
7
8
9

10 11 **High-resolution topographic images reveal actin-based protrusions on apical membrane of** 12 **RPE epitheliums** 13

14
15 Next, we fixed cells using paraformaldehyde to image cells at a higher resolution using AFM.
16 Fixing cells implies freezing membranes at the cell surface; as a result, it allowed distinguishing
17 apical protrusions on top of the plasma membrane in topographical images (**Figure 6A-B**).
18 These apical protrusions were present in both cell lines (hESC-RPE and ARPE-19 cells).
19 Following LatA treatment, apical protrusions of the membrane almost disappeared from
20 topographical images in both conditions, suggesting an involvement of actin networks in these
21 structures and supporting the hypothesis that we directly observed by AFM the microvilli
22 marked by EZRIN on **Figure 1**. We next quantified the stiffness of the apical membrane
23 surrounding the apical protrusions in fixed cells. As shown both in stiffness maps (**Figure 6B**)
24 and in graphs representing the distributions of stiffnesses in apical protrusions vs. apical
25 membranes (**Figure 6C and 6D**), protrusions appeared softer than membranes both in hESC-
26 RPE and ARPE-19 cells. Taken together, these results indicate that apical protrusions
27 reminiscent of microvilli point outwards the cell membrane of RPE cell epithelium; moreover,
28 these structures are supported by actin networks.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Discussion

In this study, we differentiated three hPSC lines into RPE cells. These cells were then characterized for their ability to form a cohesive epithelium with the polarized expression of characteristic RPE markers. In addition, the obtained RPE epitheliums were fully functional (barrier function assessed by TEER and ability to release cytokines). We then probed for the first time the mechanical properties of hPSC-RPE cells using an AFM. We showed that stiffness of the apical surface of hPSC-RPE cells was inversely correlated with epithelial maturation and cell density. Moreover, at a subcellular level, cell-cell junctions in RPE epitheliums appeared more stiffer than cell centers. This higher stiffness observed in tight junctions is dependent on actin networks. Finally, we also observed apical protrusions supported by actin networks on top of RPE epitheliums with a lower stiffness compared to the corresponding apical membrane. Taken together, the mechanical parameters that we defined in this study could be used to evaluate the quality of RPE epithelium generated for cell therapy.

RPE cell therapy is a promising approach to prevent photoreceptor degeneration in AMD and in some forms of RP associated with a RPE dysfunction⁴. In particular, the production of RPE cells from hPSCs was developed extensively, with numerous differentiation protocols. This RPE production has recently been extended to reach an industrial scale through automation³³⁻³⁵. Our lab and others have improved the formulation of the final cell therapy product to enhance therapeutic outcomes, the RPE sheet formulation being the more potent^{21,36,37}. Finally, a number of clinical trials demonstrated the safety of these cell therapy products⁶⁻⁹. However, RPE sheets are living biological products and the quality controls required to efficiently address the functionality of RPE epitheliums suitable for transplantation (i.e. the final formulation of the cell therapy product) are scarce and time-consuming. We addressed this need by exploring for the first time the nanomechanics of hPSC-RPE sheets. The few studies that addressed so far the mechanical properties of RPE epitheliums used mainly an adult RPE cell line (ARPE-19 cells) as a model, whereas we used hPSC-derived RPE cells. Indeed, Wiktor and collaborators measured similar stiffnesses of ARPE-19 cells using an AFM¹². In this same study, ARPE-19 cells had a morphology and actin network similar to what we observed. Together with our results, this strongly supports the robustness and reproducibility of stiffness measurements across distinct laboratories.

1
2
3 However, the morphology of ARPE-19 cells is different from the morphology of primary
4 cultures of RPE cells ^{27,38}. ARPE-19 cells resemble more closely to RPE cells that have
5 undergone an epithelial-mesenchymal transition with the presence of actin stress fibers ³⁹. At
6 the opposite side of the spectrum, hPSC-RPE sheets adopt a morphology that resembles that
7 of a native RPE epithelium. Therefore, measuring the stiffness of hPSC-RPE cells is more
8 informative than measuring the stiffness of ARPE-19 cells. Here, we show for the first time
9 that hPSC-RPE have different mechanical properties according to the stage of epithelial
10 maturation. hPSC-RPE cell stiffness measured in the center of the cells decreased during the
11 maturation period. In addition, at a subcellular level, increased epithelial maturity was
12 associated with the apparition of tight junctions at the intersection between cells and with an
13 increased cell stiffness at hPSC-RPE cell borders. Therefore, nanomechanics of hPSC-RPE
14 epithelium informs on the maturity stage of the cells. It should be noted that not all individual
15 cell junctions have a higher stiffness compared to the nearest cell center. We speculate that
16 probably not all cells reached a complete maturation stage with tight junctions at the time of
17 analysis (2-week culture). Indeed, it takes several weeks to reach an advanced epithelial
18 maturation with hPSC-RPE cells ^{5,27}. Longer culture periods cannot be achieved in our AFM
19 setting; the epithelium had the tendency to detach from the culture dish after 2-3 weeks of
20 culture. Optimization of culture settings suitable for AFM may increase the culture duration.
21 Nevertheless, mean values of stiffness at cell borders were significantly higher compared to
22 cell centers, thus indicating that early detection of epithelial maturation can be obtained with
23 AFM measurements.

24
25 Functional analysis of RPE sheets revealed differences between the four different lines. Both
26 VEGF secretions and TEER values allowed distinguishing two groups: hiPSC1-RPE and hESC-
27 RPE in one hand; and hiPSC2-RPE and ARPE-19 cells in the other hand. However, these
28 differences were not observed when analyzing cell stiffness data. It suggests that the
29 nanomechanical data provides different types of information, which are complementary to
30 TEER or VEGF measures to characterize the cell therapy product. Conversely, VEGF and TEER
31 provide a similar characterization and we could speculate that only one of these may be
32 required as a quality control.

33
34 Upon maturation, RPE cells adopt an apico-basal polarity with the formation of microvilli.
35 These membrane protrusions are usually observed by electron microscopy, which requires

1
2
3 long preparation of the samples. At the opposite, using only the AFM and a simple fixation
4 process (15 minutes of PFA treatment) in a label-free approach, we were able to visualize
5 microvilli. Such microvilli were also observed using AFM on fixed adult primary human RPE
6 cells³⁹ or in other cellular contexts⁴⁰⁻⁴². Microvilli structures depend on actin microfilaments
7 rather than microtubules. Indeed, destabilization of actin networks altered microvilli as
8 observed by AFM and electron microscopy and decreased cell stiffness in Hela cells⁴³. At the
9 opposite, destabilization of microtubules did not affect neither microvilli nor mechanical
10 properties of these cells. Thus, our results following actin destabilization confirmed that we
11 actually observed microvilli on AFM structural images and that cell stiffness depends also on
12 actin networks in the context of RPE cells.
13
14
15
16
17
18
19
20

21
22 In the ARPE-19 cell model, treatments with lipofuscin and blue light irradiation induced a sub-
23 lethal stress or weakly lethal stress¹². As a result, the cell cytoskeleton was disrupted and cell
24 stiffness decreased. Similar observations were done on other cellular models¹⁵ or with other
25 types of lethal stress¹¹. At the opposite, treatment of ARPE-19 cells with a ROCK inhibitor
26 increased cell stiffness and reduced apoptosis¹³. Thus, probing cell stiffness in RPE cells may
27 inform on the global health of the cell culture prior to cell death. In this study, we did not
28 evaluate the impact of sub-lethal or lethal stress on the nanomechanical properties of hPSC-
29 RPE epitheliums. We only evaluated the impact of cytoskeletal destabilization on cell stiffness.
30 Future studies may be required to measure elasticity on hPSC-RPE epitheliums after triggering
31 a sub-lethal or weekly lethal stress. It will allow specifying a range of acceptable values of
32 mean elasticity to set up a quality control of the global health of hPSC-RPE epitheliums.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 **Conclusion**

44 In this study we demonstrated that label-free nanomechanical measurements on hPSC-RPE
45 sheets provide information regarding epithelial maturation stage and structural organization
46 of apical membranes. These AFM measurements can be implemented as quality control to
47 evaluate the suitability of RPE sheets produced for cell therapy. Information collected with
48 AFM is complementary and different from other standard quality controls (cytokine release,
49 TEER measurements). The exploration of new approaches to characterize in a simple manner
50 cell therapy products, in particular the ones that are formulated as a tissue or a sheet is
51 essential for the success of cell therapy. Indeed, a better understanding of the biology and/or
52 the physiological state (including normal range of physiological variations) of a biological
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

product will allow predicting the ones that are suitable for transplantation and ultimately will potentiate *in vivo* functionality. Therefore, such AFM mechanical studies can be extended to other cell therapy products to improve their therapeutic outcomes *in vivo*.

For Peer Review

Acknowledgments

Figures 1A and 3A panels and graphical abstract were created with BioRender.com. We greatly acknowledge the staff from I-Stem facilities for help and members of I-Stem and LAMBE for helpful comments.

Funding

This work was supported by grants from the ANR [RebuildingRETINA: ANR-19-CE18-0004] and the Fondation pour la Recherche Medicale (Transplantation and cell therapy - PME201906008797) to KB. This work was also supported by UNADEV (Union Nationale des Aveugles et Déficiants Visuels) in association with ITMO NNP / AVIESAN (alliance nationale pour les sciences de la vie et de la santé) for retinal disorders' research (to KB). The IRRP association (Information Recherche Rétinite Pigmentaire) provided also a valuable financial support (to CM). I-Stem is part of the Biotherapies Institute for Rare Diseases supported by the Association Française contre les Myopathies-Téléthon.

Conflict of Interest

CM, WH and KB are inventors of a patent (FR3078712) related to medical devices for the preparation of retinal tissues for regenerative medicine. EH, CM and KB are inventors of a pending patent related to retinal tissue engineering for cell therapy (FR2107934). CM and KB are inventors of a pending patent related to the automated differentiation of hPSCs into RPE cells (EP3754014). The other authors declared no potential conflicts of interest.

Author Contributions

E.H.: Collection and/or assembly of data, Data analysis and interpretation, Manuscript writing, Final approval of manuscript; M.L.: Collection and/or assembly of data, Data analysis and interpretation, Final approval of manuscript; G.L.: Collection and/or assembly of data, Data analysis and interpretation, Manuscript writing, Final approval of manuscript; M.M.: Provision of study material, Final approval of manuscript; A.P.: Collection and/or assembly of data, Final approval of manuscript; W.H.: Collection and/or assembly of data, Final approval of manuscript; C.G.: Collection and/or assembly of data, Final approval of manuscript; E.F.: Collection and/or assembly of data, Final approval of manuscript; C.C.: Conception and design, Data analysis and interpretation, Final approval of manuscript; C.M.: Conception and design,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Financial support, Data analysis and interpretation, Manuscript writing, Final approval of manuscript; K.B.: Conception and design, Financial support, Collection and/or assembly of data, Data analysis and interpretation, Manuscript writing, Final approval of manuscript.

Data Availability

The data that support the findings of this study are available from corresponding authors upon reasonable request.

For Peer Review

Figure Legend**Figure 1: RPE cells differentiated from hPSCs form a cohesive and mature epithelium.** (A)

Timeline of the differentiation protocol to produce RPE cells from hPSCs. This protocol is based on a spontaneous differentiation protocol. (B-C) Confocal images of 2-month old RPE epithelium from the four cell lines, after immunostaining with antibodies against MERTK (B) and EZRIN (C). Images correspond to maximal projections of z stacks. (D) Confocal images corresponding to maximal projections in zx plans from stacks of images on B-C. Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bar= 20 μ m.

Figure 2: Organization of Actin microfilaments in RPE epitheliums. (A) Confocal images of 2-

month old RPE epitheliums that were labelled with phalloidin-A647 to visualize actin networks and counterstained with DAPI. (B) Stack of images in A were resliced in the zx axis (maximal projections). Scale bar= 20 μ m.

Figure 3: Increased functionality of RPE epitheliums upon maturation *in vitro*. (A) Drawing

illustrating the system used to measure the TEER *in vitro*. (B) Quantification of the TEER according to the time of maturation in culture for the four RPE cell lines. (C) Quantification of the polarized secretion of VEGF by the four RPE cell lines during three weeks in cultures *via* ELISA assays. A: apical; B: basal. Values plotted are mean \pm SEM. Significant two-way ANOVA were followed up with Bonferroni post test. ***p < 0.001.

Figure 4: Mechanical properties of hPSC-RPE epitheliums are modified following epithelial

maturation. (A) Scheme depicting the AFM principle for the recording of nanomechanical characteristics of the apical side of RPE epitheliums. (B) Quantification of apparent Young's Modulus at the center of the cells (E_{cell}) for the three hPSC-RPE lines at day 2 (D2) and D16. Values plotted are mean \pm SD. Mann Whitney test was used for statistical comparisons. (C) AFM topographical images (height) and corresponding elasticity maps for the three hPSC-RPE lines after a 2-week culture period. A representative line was traced in images (red and blue lines) and plotted in right panels to show the distribution of stiffness according to the cell height measured by AFM. White arrows indicate cell junctions stiffer than cell centers.

Figure 5: Stiffness of RPE epitheliums is dependent on actin microfilaments. (A-B) AFM

topographical images and corresponding elasticity maps of 2-week old RPE cultures (hESC-RPE (A) and ARPE-19 cells (B)), before and after Latrunculin A treatment. (C) Two representative

1
2
3 areas in hESC-RPE topographical images and corresponding elasticity map were plotted on
4 graph in C1 and C2. (D) Quantification of apparent Young's Modulus at cell junctions, cell
5 centers and following Latrunculin A treatment (LatA) for hESC-RPE epitheliums and ARPE-19
6 cell cultures. Values plotted are mean \pm SEM. Significant Kruskal-Wallis tests were followed by
7 Dunn's multiple comparisons tests.
8
9
10
11

12
13 **Figure 6: High-resolution AFM topographical images and corresponding elasticity maps**
14 **revealed typical microvilli in the apical membrane of RPE cells.** (A-B) AFM topographical
15 images (height) and corresponding elasticity maps (stiffness) of hESC-RPE epitheliums (A) and
16 ARPE-19 cells (B) following a 2-week culture period. Cells were analyzed using an AFM without
17 treatment or after Latrunculin A exposition. (C-D) Histograms of the distribution of Young's
18 modulus at the apical membrane, obtained from elasticity maps at a threshold of 0.05 μ m
19 height. hESC-RPE (C) and ARPE-19 (D) Protrusion histograms correspond to apparent Young's
20 modulus distribution at height higher than this threshold. hESC-RPE (C) and ARPE-19 (D) Apical
21 membrane histograms corresponds to apparent Young's modulus below this threshold.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

1. Flaxman SR, Bourne RRA, Resnikoff S, et al. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. Dec 2017;5(12):e1221-e1234. doi:10.1016/S2214-109X(17)30393-5
2. Burton MJ, Ramke J, Marques AP, et al. The Lancet Global Health Commission on Global Eye Health: vision beyond 2020. *Lancet Glob Health*. Apr 2021;9(4):e489-e551. doi:10.1016/S2214-109X(20)30488-5
3. Pfeiffer RL, Marc RE, Jones BW. Persistent remodeling and neurodegeneration in late-stage retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res*. Jan 2020;74:100771. doi:10.1016/j.preteyeres.2019.07.004
4. Monville C, Goureau O, Ben M'Barek K. Photoreceptor Cell Replacement Using Pluripotent Stem Cells: Current Knowledge and Remaining Questions. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. Feb 1 2023;13(2)doi:10.1101/cshperspect.a041309
5. Ben M'Barek K, Bertin S, Brazhnikova E, et al. Clinical-grade production and safe delivery of human ESC derived RPE sheets in primates and rodents. *Biomaterials*. Feb 2020;230:119603. doi:10.1016/j.biomaterials.2019.119603
6. Qiu TG. Transplantation of human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelial cells (MA09-hRPE) in macular degeneration. *NPJ Regen Med*. 2019;4:19. doi:10.1038/s41536-019-0081-8
7. Kashani AH, Lebkowski JS, Rahhal FM, et al. A bioengineered retinal pigment epithelial monolayer for advanced, dry age-related macular degeneration. *Sci Transl Med*. Apr 4 2018;10(435)doi:10.1126/scitranslmed.aao4097
8. da Cruz L, Fynes K, Georgiadis O, et al. Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration. *Nat Biotechnol*. Apr 2018;36(4):328-337. doi:10.1038/nbt.4114
9. Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, et al. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med*. Mar 16 2017;376(11):1038-1046. doi:10.1056/NEJMoa1608368
10. Ye K, Takemoto Y, Ito A, et al. Reproducible production and image-based quality evaluation of retinal pigment epithelium sheets from human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep*. Sep 1 2020;10(1):14387. doi:10.1038/s41598-020-70979-y
11. Fabian E, Reglodi D, Horvath G, et al. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide acts against neovascularization in retinal pigment epithelial cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Nov 2019;1455(1):160-172. doi:10.1111/nyas.14189
12. Wiktor A, Sarna M, Wnuk D, Sarna T. Lipofuscin-mediated photodynamic stress induces adverse changes in nanomechanical properties of retinal pigment epithelium cells. *Sci Rep*. Dec 18 2018;8(1):17929. doi:10.1038/s41598-018-36322-2
13. Ni Y, Qin Y, Fang Z, Zhang Z. ROCK Inhibitor Y-27632 Promotes Human Retinal Pigment Epithelium Survival by Altering Cellular Biomechanical Properties. *Current molecular medicine*. 2017;17(9):637-646. doi:10.2174/1566524018666180316150936
14. Willermain F, Libert S, Motulsky E, et al. Origins and consequences of hyperosmolar stress in retinal pigmented epithelial cells. *Front Physiol*. 2014;5:199. doi:10.3389/fphys.2014.00199
15. Jin H, Liang Q, Chen T, Wang X. Resveratrol protects chondrocytes from apoptosis via altering the ultrastructural and biomechanical properties: an AFM study. *PLoS One*. 2014;9(3):e91611. doi:10.1371/journal.pone.0091611
16. Lee GY, Lim CT. Biomechanics approaches to studying human diseases. *Trends Biotechnol*. Mar 2007;25(3):111-8. doi:10.1016/j.tibtech.2007.01.005
17. An SS, Fabry B, Treppe X, Wang N, Fredberg JJ. Do biophysical properties of the airway smooth muscle in culture predict airway hyperresponsiveness? *American journal of respiratory cell and molecular biology*. Jul 2006;35(1):55-64. doi:10.1165/rcmb.2005-0453OC
18. Plodinec M, Loparic M, Monnier CA, et al. The nanomechanical signature of breast cancer. *Nature nanotechnology*. Nov 2012;7(11):757-65. doi:10.1038/nnano.2012.167

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

19. Riera M, Fontrodona L, Albert S, et al. Comparative study of human embryonic stem cells (hESC) and human induced pluripotent stem cells (hiPSC) as a treatment for retinal dystrophies. *Molecular therapy Methods & clinical development*. 2016;3:16010. doi:10.1038/mtm.2016.10
20. Morizur L, Herardot E, Monville C, Ben M'Barek K. Human pluripotent stem cells: A toolbox to understand and treat retinal degeneration. *Mol Cell Neurosci*. Sep 2020;107:103523. doi:10.1016/j.mcn.2020.103523
21. Ben M'Barek K, Habeler W, Plancheron A, et al. Human ESC-derived retinal epithelial cell sheets potentiate rescue of photoreceptor cell loss in rats with retinal degeneration. *Sci Transl Med*. Dec 20 2017;9(421)doi:10.1126/scitranslmed.aai7471
22. Berryman M, Franck Z, Bretscher A. Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells. *Journal of cell science*. Aug 1993;105 (Pt 4):1025-43.
23. Viswanatha R, Bretscher A, Garbett D. Dynamics of ezrin and EBP50 in regulating microvilli on the apical aspect of epithelial cells. *Biochemical Society transactions*. Feb 2014;42(1):189-94. doi:10.1042/BST20130263
24. Rizzolo LJ. Barrier properties of cultured retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res*. Sep 2014;126:16-26. doi:10.1016/j.exer.2013.12.018
25. Fronk AH, Vargis E. Methods for culturing retinal pigment epithelial cells: a review of current protocols and future recommendations. *Journal of tissue engineering*. Jan-Dec 2016;7:2041731416650838. doi:10.1177/2041731416650838
26. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *Journal of laboratory automation*. Apr 2015;20(2):107-26. doi:10.1177/2211068214561025
27. Bharti K, den Hollander AI, Lakkaraju A, et al. Cell culture models to study retinal pigment epithelium-related pathogenesis in age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*. Sep 2022;222:109170. doi:10.1016/j.exer.2022.109170
28. Saint-Geniez M, Kurihara T, Sekiyama E, Maldonado AE, D'Amore PA. An essential role for RPE-derived soluble VEGF in the maintenance of the choriocapillaris. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 3 2009;106(44):18751-6. doi:10.1073/pnas.0905010106
29. Lamour G, Allard A, Pelta J, Labdi S, Lenz M, Campillo C. Mapping and Modeling the Nanomechanics of Bare and Protein-Coated Lipid Nanotubes. *Physical Review X*. 02/11/2020;10(1):011031. doi:10.1103/PhysRevX.10.011031
30. Schwarz US, Gardel ML. United we stand: integrating the actin cytoskeleton and cell-matrix adhesions in cellular mechanotransduction. *Journal of cell science*. Jul 1 2012;125(Pt 13):3051-60. doi:10.1242/jcs.093716
31. Calzado-Martin A, Encinar M, Tamayo J, Calleja M, San Paulo A. Effect of Actin Organization on the Stiffness of Living Breast Cancer Cells Revealed by Peak-Force Modulation Atomic Force Microscopy. *ACS nano*. Mar 22 2016;10(3):3365-74. doi:10.1021/acsnano.5b07162
32. Domingues S, Darle A, Masson Y, et al. Clinical Grade Human Pluripotent Stem Cell-Derived Engineered Skin Substitutes Promote Keratinocytes Wound Closure In Vitro. *Cells*. Mar 29 2022;11(7)doi:10.3390/cells11071151
33. Crombie DE, Daniszewski M, Liang HH, et al. Development of a Modular Automated System for Maintenance and Differentiation of Adherent Human Pluripotent Stem Cells. *SLAS Discov*. Sep 2017;22(8):1016-1025. doi:10.1177/2472555217696797
34. Regent F, Morizur L, Lesueur L, et al. Automation of human pluripotent stem cell differentiation toward retinal pigment epithelial cells for large-scale productions. *Sci Rep*. Jul 23 2019;9(1):10646. doi:10.1038/s41598-019-47123-6
35. Matsumoto E, Koide N, Hanzawa H, et al. Fabricating retinal pigment epithelial cell sheets derived from human induced pluripotent stem cells in an automated closed culture system for regenerative medicine. *PLoS One*. 2019;14(3):e0212369. doi:10.1371/journal.pone.0212369

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

36. Diniz B, Thomas P, Thomas 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*. Jul 26 2013;54(7):5087-96. doi:10.1167/iovs.12-11239
37. Sharma R, Khristov V, Rising A, et al. Clinical-grade stem cell-derived retinal pigment epithelium patch rescues retinal degeneration in rodents and pigs. *Sci Transl Med*. Jan 16 2019;11(475)doi:10.1126/scitranslmed.aat5580
38. Pfeffer BA, Fliesler SJ. Reassessing the suitability of ARPE-19 cells as a valid model of native RPE biology. *Exp Eye Res*. Jun 2022;219:109046. doi:10.1016/j.exer.2022.109046
39. Chtcheglova LA, Ohlmann A, Boytsov D, Hinterdorfer P, Priglinger SG, Priglinger CS. Nanoscopic Approach to Study the Early Stages of Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) of Human Retinal Pigment Epithelial (RPE) Cells In Vitro. *Life*. Jul 30 2020;10(8)doi:10.3390/life10080128
40. Liu L, Wei Y, Liu J, et al. Spatial high resolution of actin filament organization by PeakForce atomic force microscopy. *Cell proliferation*. Jan 2020;53(1):e12670. doi:10.1111/cpr.12670
41. Franz J, Grunebaum J, Schafer M, et al. Rhombic organization of microvilli domains found in a cell model of the human intestine. *PLoS One*. 2018;13(1):e0189970. doi:10.1371/journal.pone.0189970
42. Schillers H, Medalsy I, Hu S, Slade AL, Shaw JE. PeakForce Tapping resolves individual microvilli on living cells. *Journal of molecular recognition : JMR*. Feb 2016;29(2):95-101. doi:10.1002/jmr.2510
43. Liu X, Wei Y, Li W, Li B, Liu L. Cytoskeleton induced the changes of microvilli and mechanical properties in living cells by atomic force microscopy. *Journal of cellular physiology*. May 2021;236(5):3725-3733. doi:10.1002/jcp.30110

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

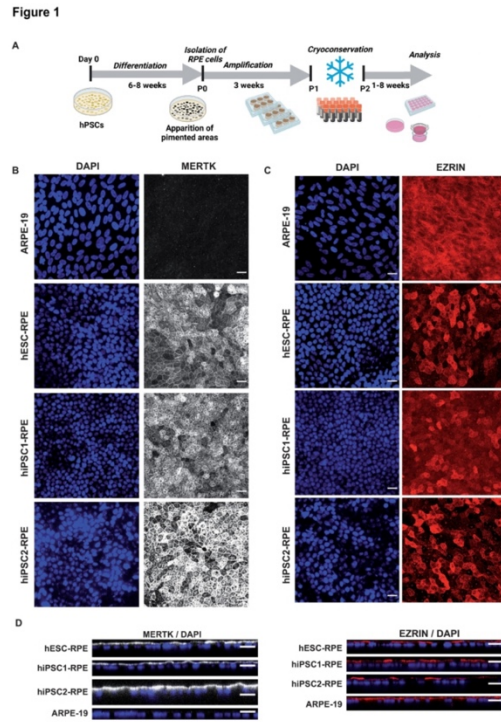
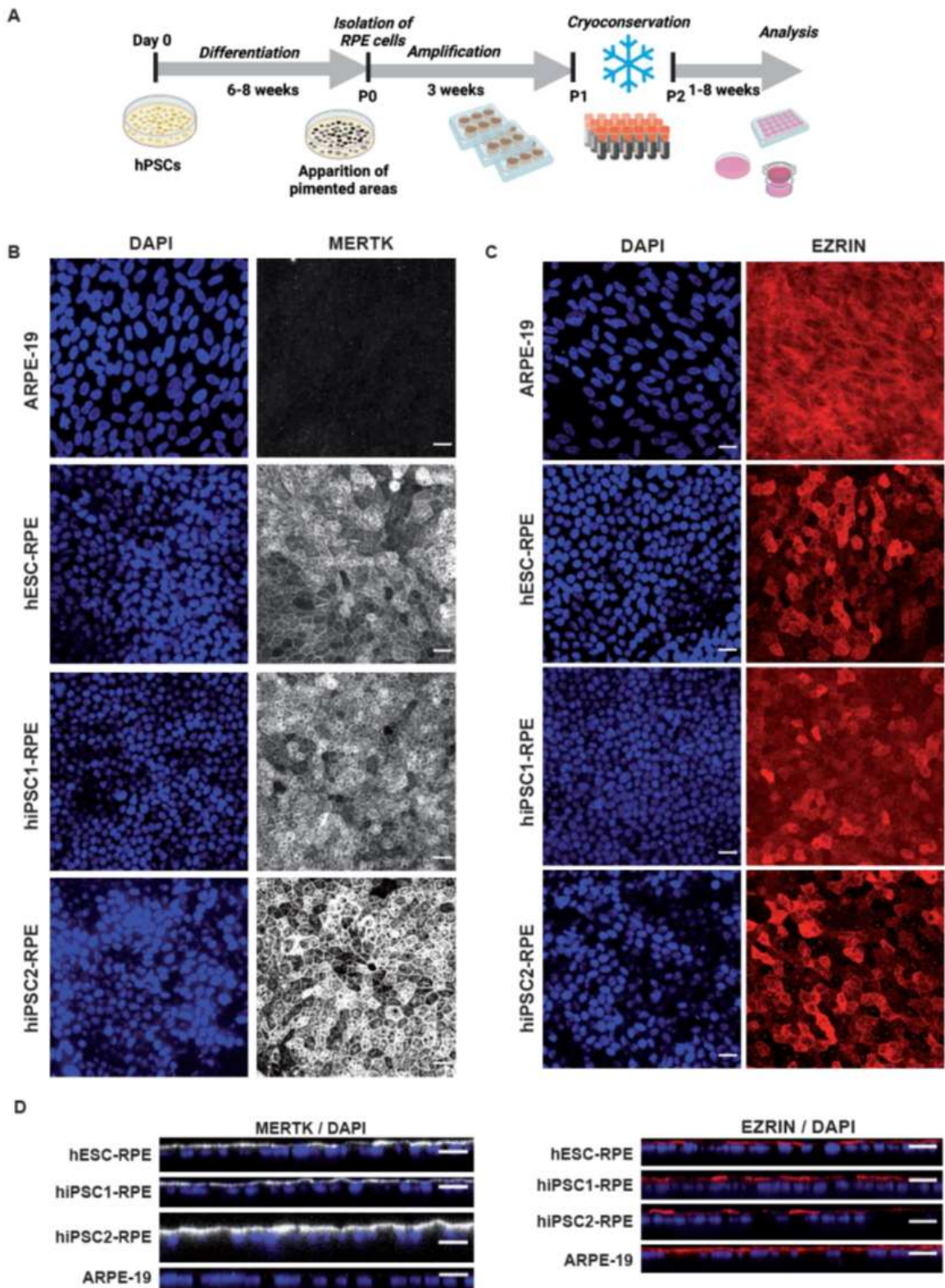


Figure 1: RPE cells differentiated from hPSCs form a cohesive and mature epithelium. (A) Timeline of the differentiation protocol to produce RPE cells from hPSCs. This protocol is based on a spontaneous differentiation protocol. (B-C) Confocal images of 2-month old RPE epithelium from the four cell lines, after immunostaining with antibodies against MERTK (B) and EZRIN (C). Images correspond to maximal projections of z stacks. (D) Confocal images corresponding to maximal projections in zx plans from stacks of images on B-C. Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bar= 20 μ m.

235x322mm (300 x 300 DPI)

Figure 1



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

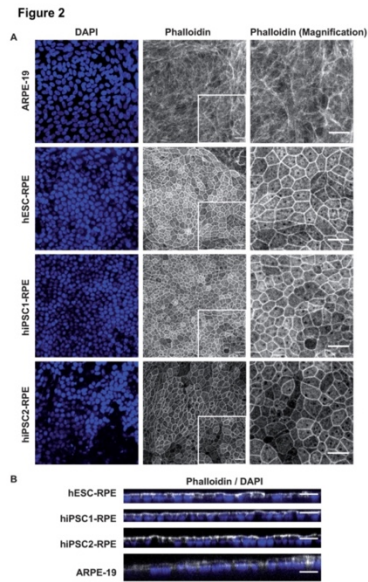
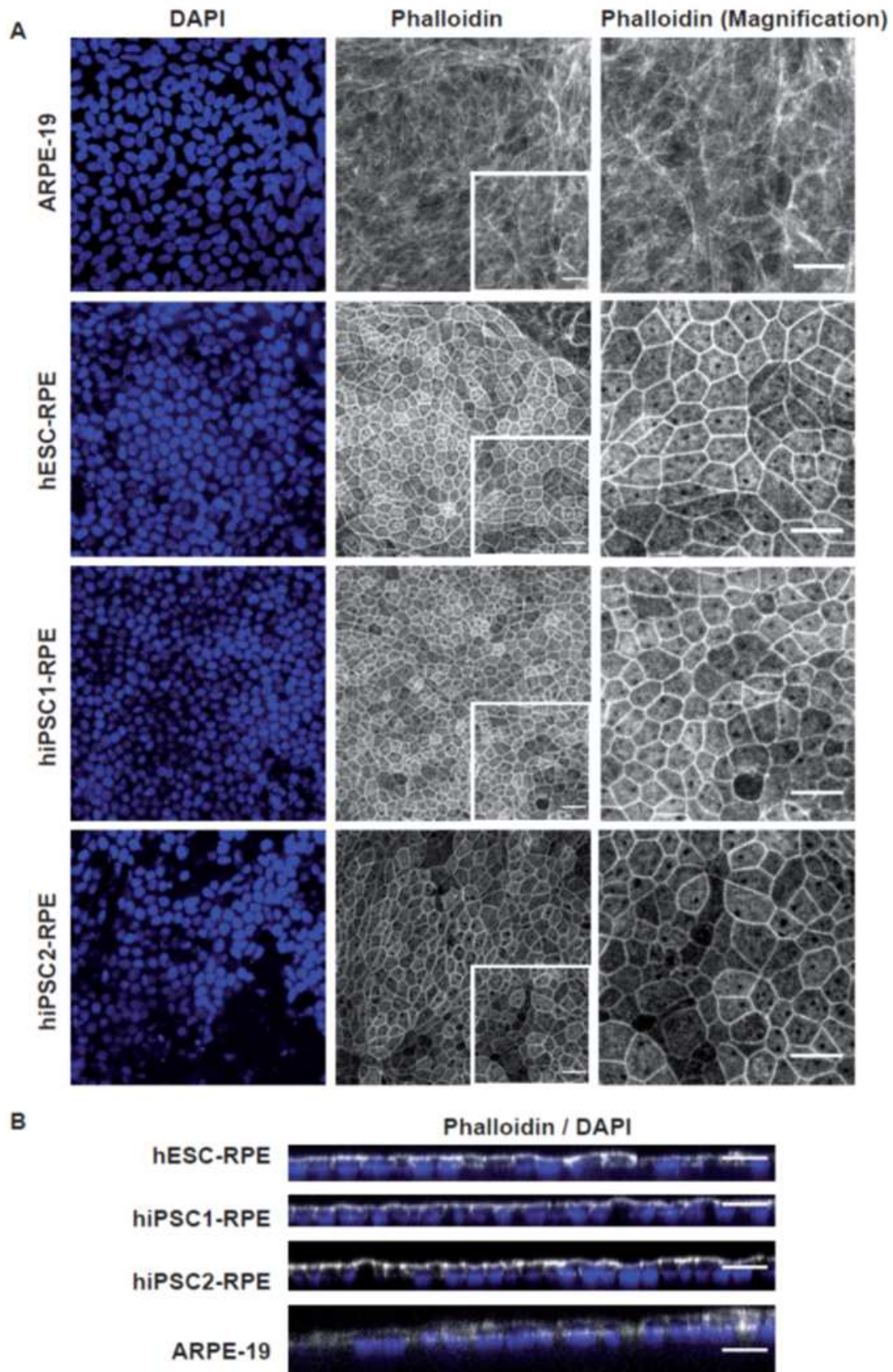


Figure 2: Organization of Actin microfilaments in RPE epitheliums. (A) Confocal images of 2-month old RPE epitheliums that were labelled with phalloidin-A647 to visualized actin networks and counterstained with DAPI. (B) Stack of images in A were resliced in the zx axis (maximal projections). Scale bar= 20 μ m.

235x322mm (300 x 300 DPI)

Figure 2



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 3

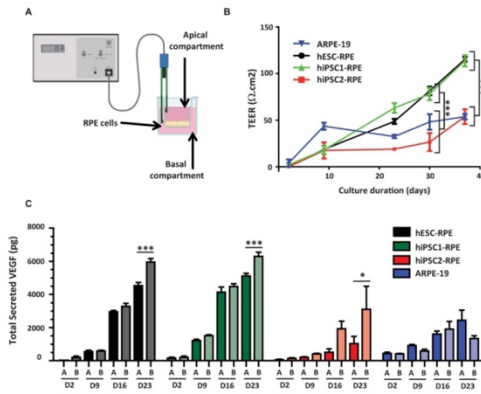
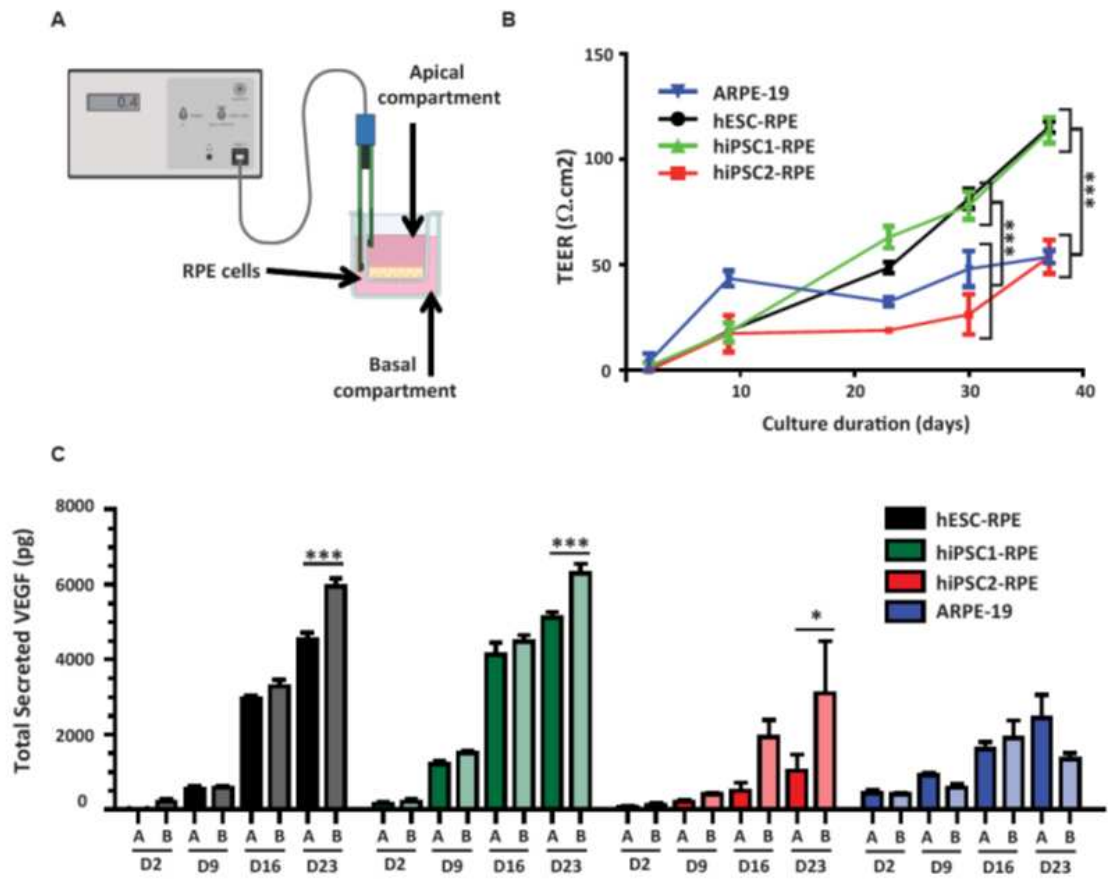


Figure 3: Increased functionality of RPE epitheliums upon maturation in vitro. (A) Drawing illustrating the system used to measure the TEER in vitro. (B) Quantification of the TEER according to the time of maturation in culture for the four RPE cell lines. (C) Quantification of the polarized secretion of VEGF by the four RPE cell lines during three weeks in cultures via ELISA assays. A: apical; B: basal. Values plotted are mean ±SEM. Significant two-way ANOVA were followed up with Bonferroni post test. ***p < 0.001.

235x322mm (300 x 300 DPI)

Figure 3



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

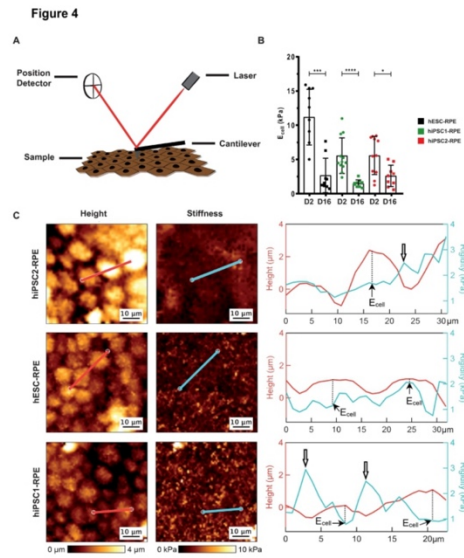
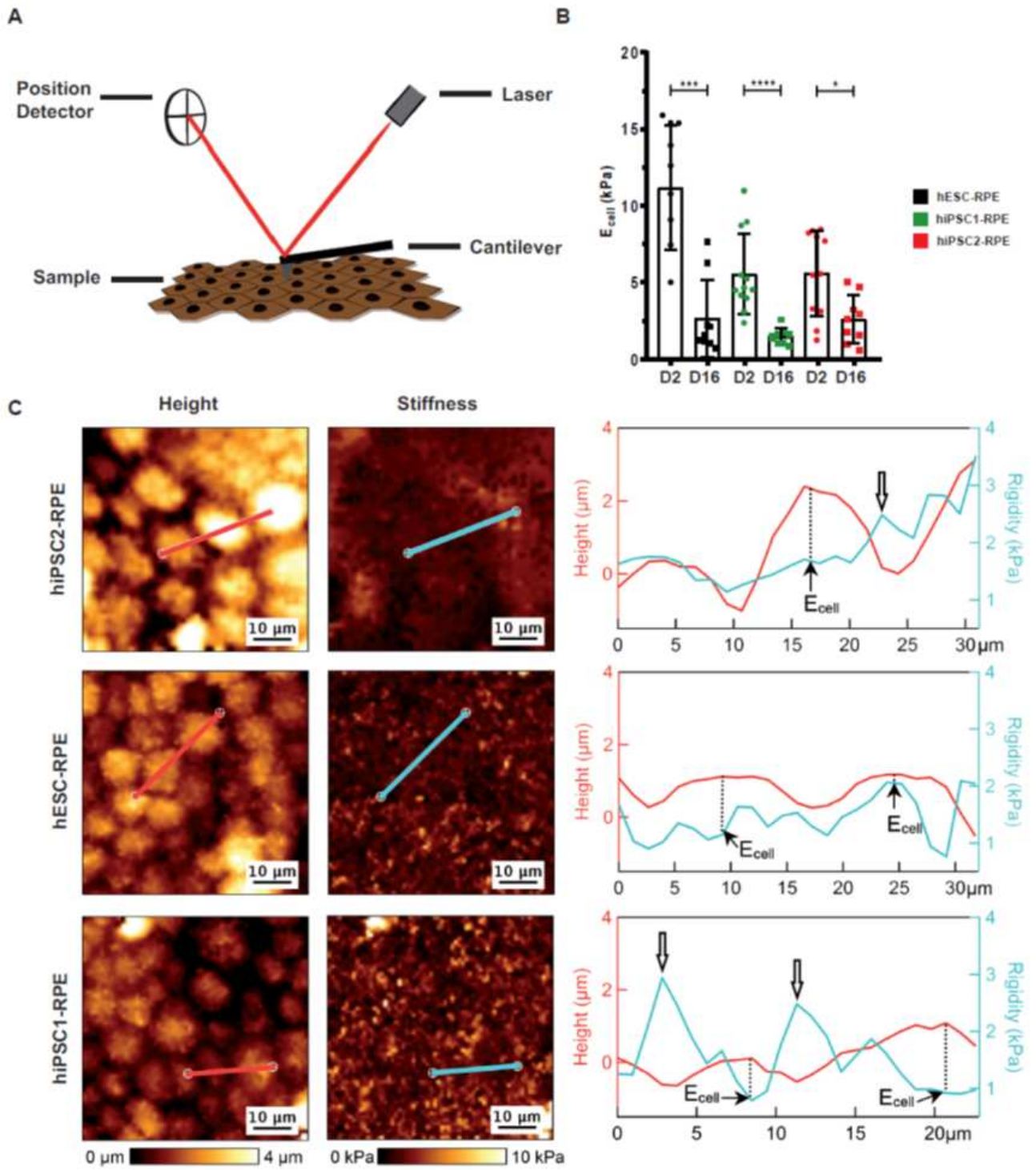


Figure 4: Mechanical properties of hPSC-RPE epitheliums are modified following epithelial maturation. (A) Scheme depicting the AFM principle for the recording of nanomechanical characteristics of the apical side of RPE epitheliums. (B) Quantification of apparent Young's Modulus at the center of the cells (E_{cell}) for the three hPSC-RPE lines at day 2 (D2) and D16. Values plotted are mean ±SD. Mann Whitney test was used for statistical comparisons. (C) AFM topographical images (height) and corresponding elasticity maps for the three hPSC-RPE lines after a 2-week culture period. A representative line was traced in images (red and blue lines) and plotted in right panels to show the distribution of stiffness according to the cell height measured by AFM. White arrows indicate cell junctions stiffer than cell centers.

235x322mm (300 x 300 DPI)

Figure 4



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

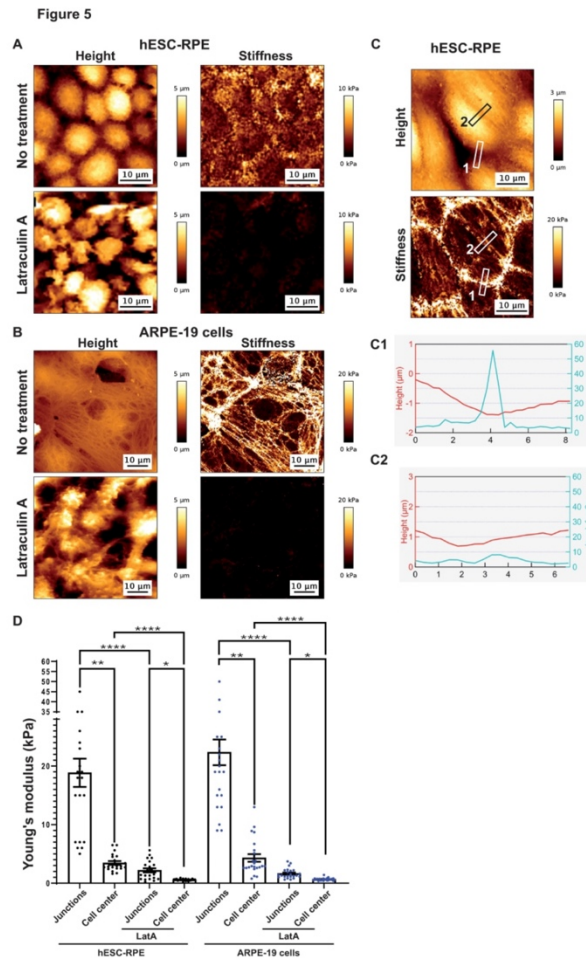


Figure 5: Stiffness of RPE epitheliums is dependent on actin microfilaments. (A-B) AFM topographical images and corresponding elasticity maps of 2-week old RPE cultures (hESC-RPE (A) and ARPE-19 cells (B)), before and after Latrunculin A treatment. (C) Two representative areas in hESC-RPE topographical images and corresponding elasticity map were plotted on graph in C1 and C2. (D) Quantification of apparent Young's Modulus at cell junctions, cell centers and following Latrunculin A treatment (LatA) for hESC-RPE epitheliums and ARPE-19 cell cultures. Values plotted are mean \pm SEM. Significant Kruskal-Wallis tests were followed by Dunn's multiple comparisons tests.

176x290mm (300 x 300 DPI)

Figure 5

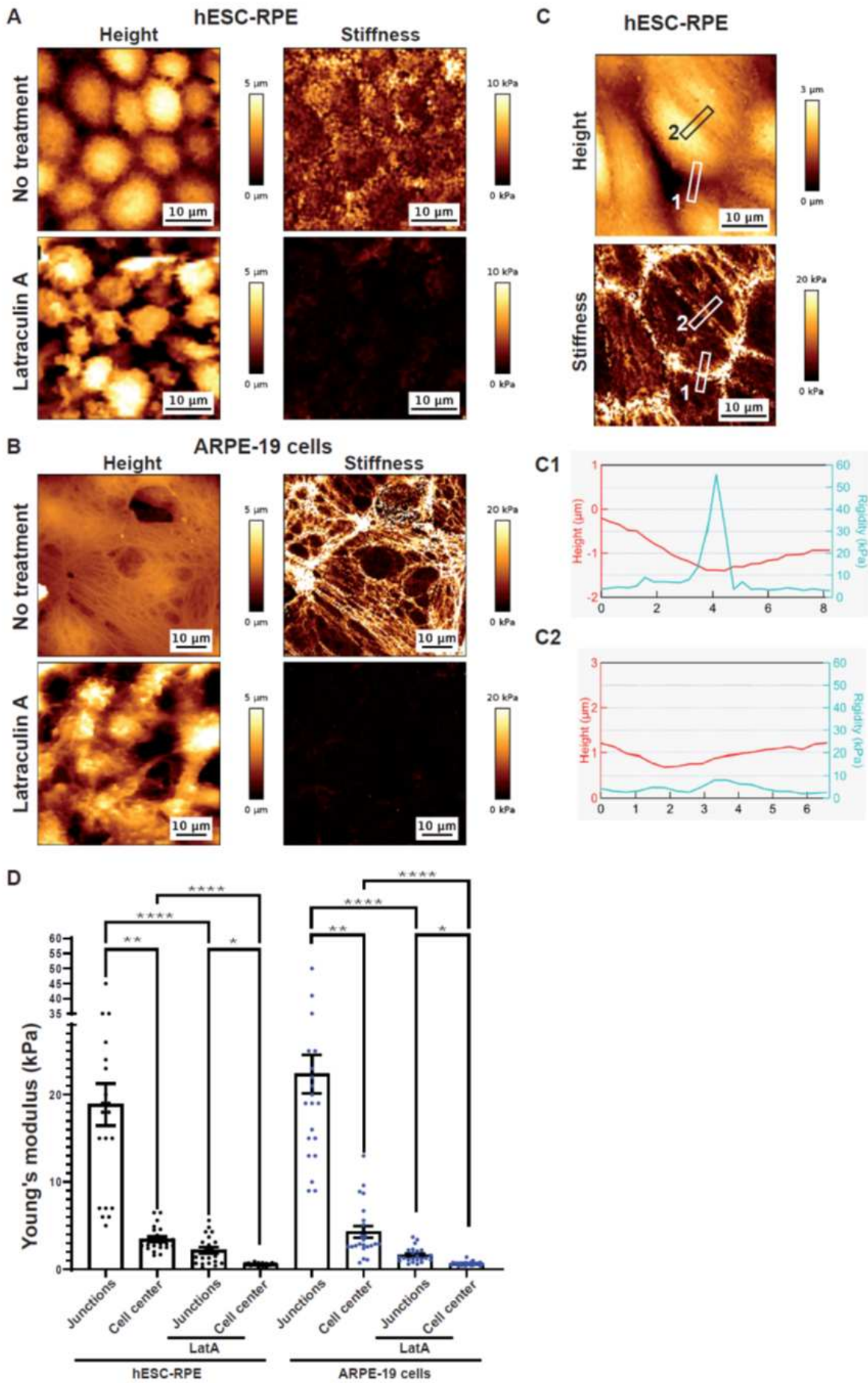


Figure 6

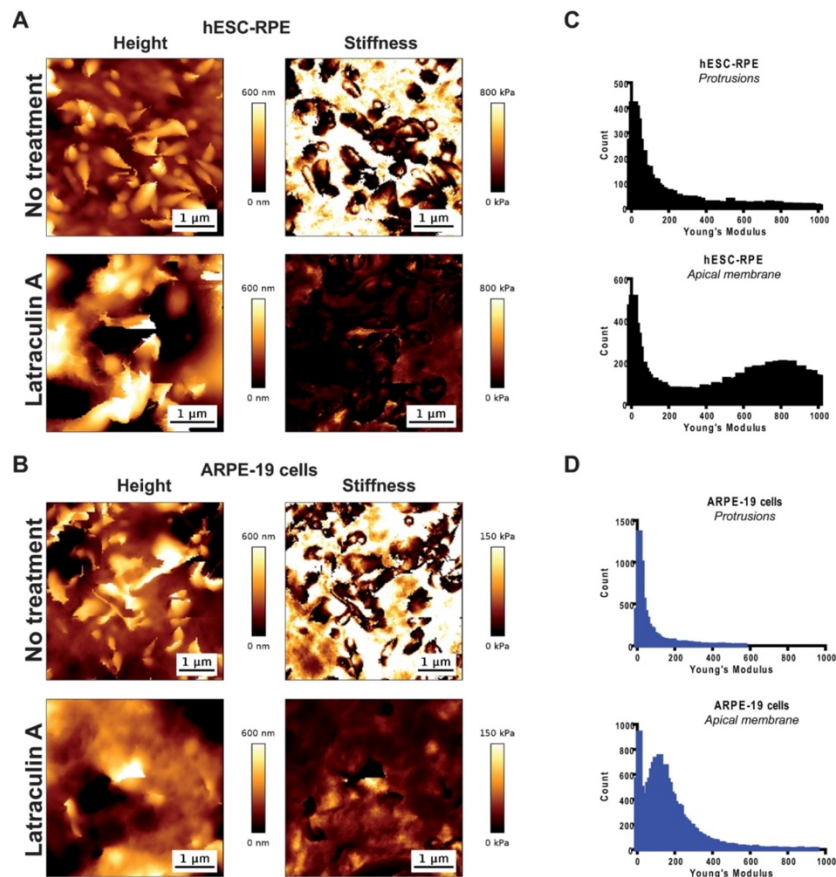
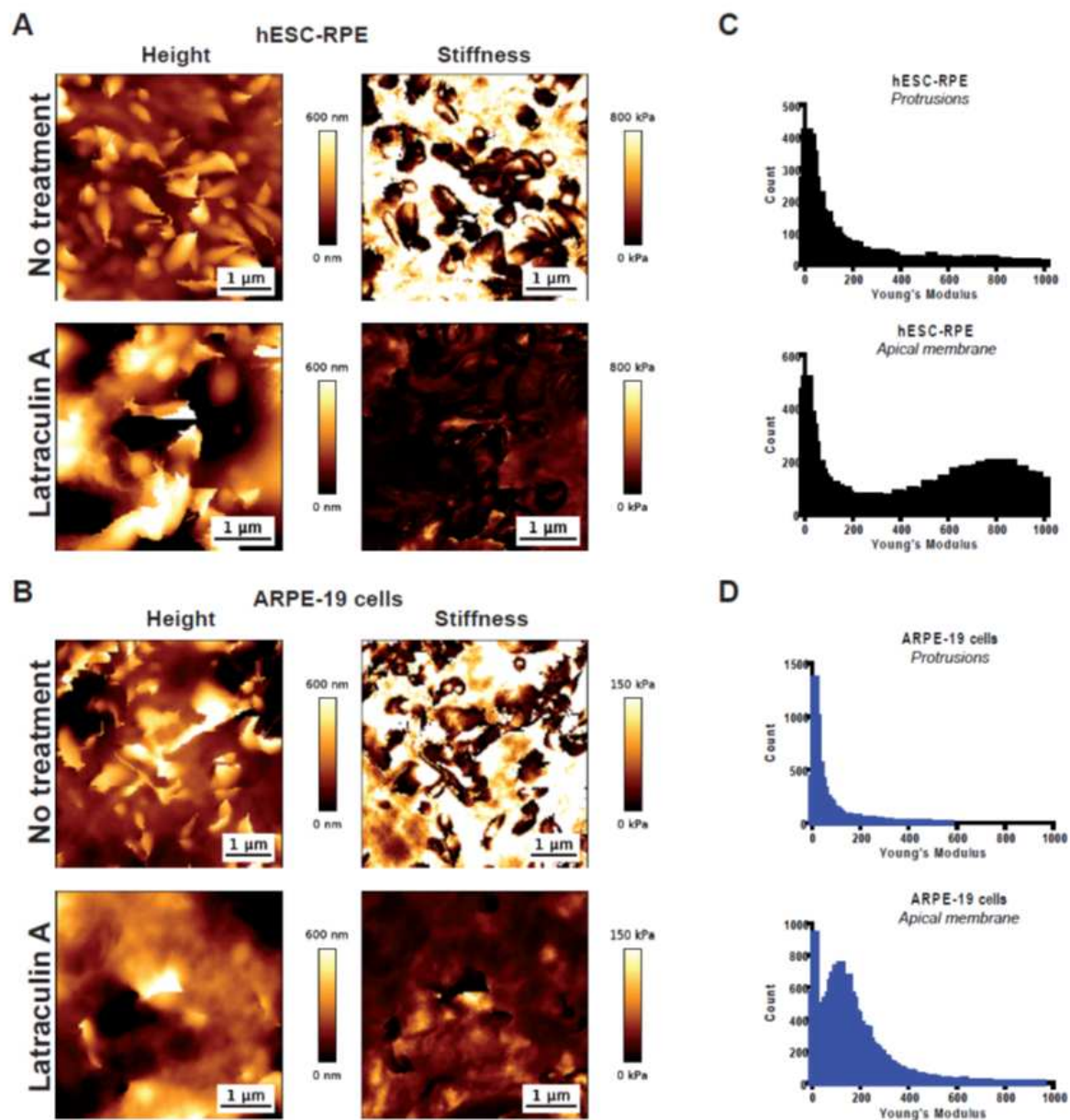


Figure 6: High-resolution AFM topographical images and corresponding elasticity maps revealed typical microvilli in the apical membrane of RPE cells. (A-B) AFM topographical images (height) and corresponding elasticity maps (stiffness) of hESC-RPE epitheliums (A) and ARPE-19 cells (B) following a 2-week culture period. Cells were analyzed using an AFM without treatment or after Latrunculin A exposition. (C-D) Histograms of the distribution of Young's modulus at the apical membrane, obtained from elasticity maps at a threshold of $0.05 \mu\text{m}$ height. hESC-RPE (C) and ARPE-19 (D) Protrusion histograms correspond to apparent Young's modulus distribution at height higher than this threshold. hESC-RPE (C) and ARPE-19 (D) Apical membrane histograms corresponds to apparent Young's modulus below this threshold.

149x169mm (300 x 300 DPI)

Figure 6



c. Discussion

Dans cette étude, nous avons réussi à obtenir une analyse complète des propriétés mécaniques de la surface des épithéliums obtenus à partir de cellules EPR dérivées de CSPhs. Ainsi, nous avons montré que la rigidité de la surface apicale de l'EPR évolue au cours de la maturation épithéliale. Cette rigidité est inversement proportionnelle à la maturation épithéliale et à la densité cellulaire. De plus, lorsque l'épithélium est formé, les jonctions intercellulaires de l'EPR apparaissent plus rigides que les corps cellulaires correspondants. Cette rigidité cellulaire est liée au réseau d'actine. Enfin, nous avons aussi observé que les protusions apicales membranaires, suggérant la présence de microvilli, sont plus molles que la membrane apicale correspondante.

Les quelques études qui se sont intéressées aux propriétés mécaniques de l'EPR ont utilisé la lignée ARPE-19 comme modèle cellulaire, tandis que nous avons utilisé des cultures de l'EPR dérivées de CSPhs en plus de cette lignée (Fabian et al. 2019; Ni et al. 2017; Wiktor et al. 2018). Il est intéressant de constater que dans les études de Wiktor et ses collaborateurs ainsi que dans celle de Ni et ses collaborateurs, les auteurs ont retrouvé des mesures de rigidité des cellules ARPE-19 similaires à celles que l'on observe sur notre lignée ARPE-19, malgré le fait que les cellules aient été cultivées dans un milieu légèrement différent du nôtre, et que les pointes et les systèmes d'exploitation couplés à l'AFM ne soient pas les mêmes (Ni et al. 2017; Wiktor et al. 2018). Dans l'étude de Wiktor et ses collaborateurs, les auteurs ont aussi observé une morphologie cellulaire ainsi qu'un réseau d'actine similaires à ceux que nous avons observés à l'aide de l'AFM. Ainsi, les résultats de leur étude et de la nôtre démontrent la robustesse et la reproductibilité des mesures de rigidité obtenues en laboratoire à l'aide d'un AFM (Wiktor et al. 2018). Cependant, les données biologiques recueillies sur ARPE-19 (faible augmentation de TEER au cours du temps, et sécrétion non polarisée de VEGF) suggèrent que cette lignée n'a pas toutes les caractéristiques biologiques d'un EPR mature et fonctionnel. Plusieurs études antérieures ont montré que la morphologie des cellules ARPE-19 était différente des lignées primaires de l'EPR : les cellules ARPE-19 semblent avoir subi une transition de type épithélio-mésenchymateuse ainsi que l'apparition de fibres de stress d'actine initialement non présentes (Bharti et al. 2022; La et al. 2020; Pfeiffer et Fliesler 2022). C'est pourquoi la mesure de l'élasticité de l'EPR dérivé de CSPhs en feuillet offre des informations plus proches de l'EPR retrouvé *in vivo* que celui des cellules ARPE-19.

En analysant les propriétés mécaniques des lignées EPR dérivées de CSPhs, nous avons observé que les propriétés mécaniques de l'EPR varient en fonction de la maturation épithéliale. Les jonctions intercellulaires se rigidifient avec la maturation. Cependant, toutes les jonctions ne sont pas encore rigides au moment de l'analyse, ce qui suggère que la maturation épithéliale n'est pas complète. En effet, la maturation épithéliale des cellules EPR prend plusieurs semaines (Al-Ani et al. 2020). Ces données restent suffisantes pour établir un contrôle qualité à 2 semaines et montrer une maturation épithéliale de l'EPR. Pour que les produits de thérapie cellulaire puissent être gardés plus longtemps en culture, il faudra adapter le système d'analyse. En effet, dans notre étude, nous avons été limité par l'utilisation de petites boîtes de culture spécifiques à l'AFM, mais qui ne permettaient pas une culture de l'EPR au-delà de deux semaines sans décollement. Il faudrait également évaluer d'autres matrices d'adhésion qui permettent d'éviter le décollement (matrigel, autres coatings).

Lorsque les cellules EPR ont été analysées avec l'AFM à plus haute résolution, des protrusions de la membrane apicale ont pu être observées, ce qui suggère la présence de microvilli. Ces microvilli ont également déjà été observés sur des lignées d'EPR primaires (Chtcheglova et al. 2020). Ces structures sont généralement révélées à l'aide d'un microscope électronique (Bonilha et al. 2006). Cette technique est connue pour être fastidieuse avec une longue préparation des échantillons (environ 48h) (Hayden et Meseck 2021). Ainsi, ces microvilli peuvent être visualisés avec l'AFM beaucoup plus rapidement après une simple fixation de 15 min au paraformaldéhyde et sans aucun marquage. Ainsi, en plus des propriétés mécaniques des cellules, l'AFM pourrait permettre un contrôle qualité de la maturation épithéliale basé sur la présence de microvilli.

Les propriétés mécaniques des cellules sont affectées par l'environnement et peuvent être un indicateur de stress subléthale ou létale (Lee et Lim 2007; Wiktor et al. 2018). En effet, l'induction d'un stress subléthale à l'aide de différents traitements comme la lipofucine et les irradiations entraînent une perturbation du cytosquelette ainsi qu'une baisse de la rigidité des cellules ARPE-19 (Wiktor et al. 2018). L'inhibition de la voie ROCK sur des cellules ARPE-19 permet de réduire l'apoptose des cellules mais aussi d'accroître la rigidité des cellules (Ni et al. 2017). Dans un autre type cellulaire (chondrocytes), un stress chimique induisant l'apoptose conduit également à la diminution de la rigidité cellulaire (Jin et al. 2014). L'ensemble de ces données suggère donc que les mesures de rigidité avec l'AFM pourraient donner une indication sur l'état de stress des cellules à un instant donné. Dans notre étude, nous n'avons pas évalué l'impact d'un tel stress subléthale ou létale sur nos cellules. D'autres études futures induisant des stress sur l'épithélium EPR dérivé de CSPhs nous permettront d'évaluer cette hypothèse et d'établir une gamme de valeurs de rigidité définissant un EPR de qualité optimale.

2 Développement d'un protocole de différenciation pour obtenir des photorécepteurs à partir de CSPhs.

a. Introduction

La thérapie cellulaire, comme indiquée en introduction, est une piste de recherche pour développer des traitements afin de restaurer la fonction visuelle dans le cadre des RPs et de la DMLA. Pour arriver à cet objectif, il faut une source de photorécepteurs.

Dans la littérature scientifique actuelle, il existe de nombreux protocoles destinés à produire des cellules rétiniennes, et plus particulièrement des photorécepteurs. La plupart de ces protocoles passe par la génération d'organoïdes, riches en différents sous-types cellulaires de la rétine neurale (dont des photorécepteurs) (Nakano et al. 2012; Reichman et al. 2014; Zhong et al. 2014). Lors de la transplantation, la présence de cellules bipolaires (ou d'autres cellules de la rétine neurale autres que les photorécepteurs) peut limiter les connexions entre les photorécepteurs greffés et les cellules bipolaires hôtes. Une étape de tri cellulaire a donc été proposée pour enrichir la population cellulaire en photorécepteurs (Gagliardi et al. 2018; Lakowski et al. 2018; Welby et al. 2017). Par ailleurs, il existe une variabilité dans le rendement et la qualité des organoïdes en fonction des différents protocoles et/ou des lignées CSPhs utilisés. Tout ceci rend complexe le développement d'une application clinique simple de cette technologie.

A l'inverse, les protocoles de différenciation en 2D sont plus simples à caractériser et l'application de composés chimiques et/ou cytokines permet un meilleur contrôle de la différenciation cellulaire. Le transfert de la technologie dans un établissement pharmaceutique est également plus simple car les cultures 2D nécessitent moins de compétences spécifiques. Cependant, les protocoles en 2D pour obtenir des photorécepteurs sont anciens et leur rendement est ridiculement faible (cf. **Partie I. 4. c.**) (Lamba et al. 2006). Il est également possible avec une approche en 2D sur des plaques multipuits de tester en combinatoire des composés chimiques et/ou cytokines connues pour moduler les voies du développement embryonnaire. Des systèmes automatisés d'imagerie à haut débit peuvent ensuite faciliter l'analyse d'une grande quantité de conditions de culture. Une telle approche a été développée par Maury et collaborateurs en 2015 (Maury et al. 2015). En effet, les auteurs ont différencié des CSPhs (en plaques 384 puits et 96 puits) en progéniteurs de motoneurones. L'analyse combinatoire de différents composés/cytokines a permis d'enrichir de 52% à plus de 80% la culture en progéniteurs de motoneurones (Maury et al. 2015).

Dans cette étude, j'ai cherché à développer à partir de CSPhs un protocole sous forme de culture adhérente de photorécepteurs, la plus pure possible, en appliquant une méthode d'analyse combinatoire des facteurs modulant les voies de signalisation impliquées dans le développement de la rétine.

b. Matériels et Méthodes

1. La culture cellulaire : différenciation des CSPhs en des photorécepteurs immatures en passant par le stade des précurseurs de photorécepteurs

Les lignées de cellules souches utilisées sont : la lignée CSEhs RC-9, dérivée par Roslin Cells (Roslin Cell Therapies Ltd., Royaume Unis), et la lignée CSPhis PC056c2 dérivée par Phenocell (Grasse, France) à partir de fibroblastes humains (Barrault et al. 2019). Les cellules sontensemencées à 300 000 cellules par puits dans des plaques de 24 puits. Préalablement, afin que les cellules adhèrent, une couche de matrice L7 (Lonza, réf : FP-5020) est polymérisée dans chaque puits. Tout d'abord, les cellules CSPhs sont cultivées jusqu'à confluence, soit environ 3 jours après l'ensemencement dans le milieu Stem Pro (Thermo Fisher Scientific, réf : A1000701) avec du FGF2 (Miltenyi, réf : 130-104-923) à 10ng/mL. Le milieu de différenciation utilisé pour obtenir des progéniteurs rétiniens est composé du milieu « Dulbecco's modified Eagle's medium » supplémenté avec 50 µM de β-mercaptoéthanol (Gibco, réf : 31350-10), du supplément N-2 (Gibco, réf : 17502048) et de 1X d'acides aminés non-essentiels (NEAA) (Thermo Fisher Scientific, réf : 11140050), ainsi que de 2% ou 20% de sérum synthétique (knock out serum replacement ou KSR, Thermo Fisher Scientific) sont utilisés. Les molécules utilisées pour supplémenter le milieu sont : Y-27632 (Tocris, réf : 1254, 10ng/mL) afin de prévenir de la mort cellulaire, IGF-1 (Insulin-like Growth factor-1) (Peprotech, ref : 10011 10µg/mL), SB-431542 (R et D, réf : 1416, 10µmol/L), LDN-193189 (Sigma, réf : SML0559-5MG, 100nmol/L), IWR1e (Millipore, réf : 56666-5mg 3,33ng/mL), DAPT (Tocris, réf : 2634, 9 nmol/mL), taurine (Sigma Aldrich, réf : T0625, 100µmol/L), acide rétinoïque (Sigma Aldrich, réf : 2625, 0.5µmol/L), EFG (Gibco, réf : PHG0311, 100ng/mL) 3,3',5-Triiodo-L-thyronine (T3) (Sigma Aldrich, réf : T2877, 40ng/mL), Activin A (Peprotech, 100ng/mL) et CHIR (R et D, réf : 4423, 3nmol/mL). Lorsque cela est nécessaire, les cellules sont passées à l'aide de tryple (Gibco, réf 12605010).

2. RT-qPCR

Les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit « RNAeasy Plus Mini kit (Qiagen) » d'après les instructions du fournisseur. Les concentrations en ARN sont mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre ND-1000 (Nanodrop ND-1000 spectrophotometer ; Wilmington). A partir des ARN, une reverse transcription est effectuée pour synthétiser les ADNc grâce à l'enzyme « SuperScript III (Invitrogen) ». Les amorces utilisées pour la RT-PCR sont des amorces oligo(dT) et des amorces aléatoires. L'amplification des ADNc par qPCR est réalisée avec le Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix, faible ROX (Thermo Fisher Scientific). Les amorces des gènes d'intérêt pour ces qPCR sont listées dans la **Table 6**. Les données sont ensuite analysées grâce à une méthode comparative ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), normalisées sur le gène de ménage 18S et avec les CSEhs. Chacune des expériences a au moins été réalisée en 3 réplicas techniques.

gène	Amorces	séquence
RAX	sens	GGCAAGGTCAACCTACCAGAG
	anti-sens	CATGGAGGACACTTCCAGCTT
LHX2	sens	CGTCGTTTTCGTTGCAGCTT
	anti-sens	CGTGGACAAGTCGACAGACG
NR2E1	sens	CGAGCCACCACCTCTTGTA
	anti-sens	CCGTGCCATTCTGCCTCTTA
OTX2	sens	CCCACCAAGGACTCTGAACC
	anti-sens	CTCAGCCCATTGACTGCGGTA
SIX3	sens	CCTCCCACTTCTTGTTGCCA
	anti-sens	CGCTACTCGCCAGAAGTATGG
SIX6	sens	AGAATGAGTCGGTGTACGC
	anti-sens	ATAGAGCTCGCGGTAGTTGC
PAX6	sens	GCCAGCAACACACCTAGTCA
	anti-sens	TGTGAGGGCTGTGTCTGTTC
VSX2	sens	CTGCCGGAAGACAGGATACA
	anti-sens	TAGAGCCCATACTCCGCCA
MITF	sens	CCGGGTGCAGAATTGTAAC
	anti-sens	GGACAATTTTGGCATTITGG
18S	sens	GAGGATGAGGTGGAACGTGT
	anti-sens	TCTTCAGTCGCTCCAGGTCT
Nanog	sens	CAAAGGCAAACAACCCACTT
	anti-sens	TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT

Table 6 : Liste des amorces utilisées en RT-qPCR.

3. Immunofluorescence

Les cellules sont fixées à l'aide d'une solution à 4% de paraformaldéhyde pendant 15 min à température ambiante. Ensuite, les cellules sont perméabilisées dans une solution à 0,1% Triton X-100 dans du PBS afin de permettre aux anticorps de rentrer dans les cellules. Puis, une étape de blocage des liaisons non spécifiques est effectuée à l'aide de 0,1% Triton X-100 dans du PBS avec 10% de Sérum de cheval durant 1 heure. Les cellules sont ensuite incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps suivants : anti-PAX6 (Biolegend Poly, réf : 19013) (1/500^e), anti-VSX2 (CHX10 Invitrogen, réf : PA1-12566) (1/500^e), anti-LHX2 (Santa Cruz Biotechnology, réf : SC-19344) (1/500^e), anti-CRX (Abnova, réf : H00001406-M02) (1/200^e) et anti-RECOVERINE (Millipore, réf : AB5585) (1/1000^e). Les anticorps secondaires fluorescents utilisés sont : Alexa Fluor 555 anti-lapin (Invitrogen, réf : A31572) (1/500^e), Alexa Fluor 488 anti-mouton (Invitrogen, réf : A11015) (1/500^e), Alexa Fluor 555 anti-souris (Invitrogen, réf : A31570) (1/500^e), Alexa Fluor 488 anti-chèvre (Invitrogen, réf : A11055) (1/500^e) et Alexa Fluor 647 anti-lapin (Invitrogen, réf : A31573) (1/500^e).

Les anticorps secondaires sont incubés pendant 2h à température ambiante à l'abri de la lumière. Le noyau est coloré avec du DAPI à (1/5000^e). Les images obtenues ont été prises avec un microscope à fluorescence (Zeiss) et/ou avec un microscope confocal (Zeiss LSM880-Airyscan Confocal Microscope) piloté par le logiciel Zeiss Zen black. Les images sont traitées avec le logiciel ImageJ.

4. Cytométrie en flux

Les cellules sont dissociées avec de la tryple durant 5 min, puis la tryple est retirée à l'aide d'une centrifugation à 1000rpm durant 5 min. Les cellules sont ensuite fixées en suspension dans une solution à 4% de paraformaldéhyde à température ambiante. Puis, une étape de blocage des liaisons non spécifiques est effectuée avec 0,1% Triton X-100 dans du PBS avec 2% de Sérum de veau foetal durant 1 heure. Les anticorps utilisés sont les mêmes que ceux utilisés en immunofluorescence. Les cellules sont ensuite analysées à l'aide d'un cytomètre en flux (MACSQuant analyser, Miltenyi Biotec) et traitées avec le logiciel FlowJo.

5. Transcriptome

L'extraction des ARNm des cellules est réalisée grâce au Kit RNeasy plus Mini kit (QUIAGEN) selon les instructions du fabricant. Les ARNm sont dosés avec un spectrophotomètre (Nanodrop ND-1000 spectrophotometer ; Wilmington). La qualité des ARNm est évaluée grâce au RIN (RNA Integrity number). Ils sont générés à l'aide de la TapStation (Agilent) et du kit RNA screentape. Seuls les ARNm possédant un RIN supérieur à 7 ont été utilisés pour le séquençage. Les échantillons sont ensuite transférés à la plateforme transcriptomique d'I-Stem afin de générer des bibliothèques d'ADNc compatibles avec le séquenceur Ion Proton en utilisant le kit Quantseq 3'mRNAseq library prep kit for Ion torrent (LEXOGENE). Le séquençage des bibliothèques est réalisé sur un séquenceur Ion Proton (ThermoFisher Scientific). Les données obtenues sont ensuite traitées par le département bio-informatique d'I-Stem et un fichier Excel est généré avec une comparaison statistique des gènes significativement et différentiellement régulés entre le traitement évalué et les CSEhs de départ. Ensuite, les listes de gènes significativement modulés par rapport à des CSEhs sont analysées sur le site EnrichR pour déterminer les gènes associés à un type cellulaire donné (base de données de human gene atlas).

6. Analyses statistiques

N correspond au nombre réalisé d'expériences indépendantes. Les tests statistiques ont été réalisés avec au moins 3 expériences indépendantes. Les tests statistiques (two-way ANOVA) ont été réalisés à l'aide du logiciel Prism 5 (GaphPad software). Les valeurs considérées comme significatives possèdent une valeur de $p < 0,05$.

c. Résultats

L'objectif initial a été de mettre au point un protocole robuste sous forme de cultures adhérentes permettant d'obtenir des progéniteurs rétiniens à partir de CSPhs en vue d'une application clinique. Pour ce faire, j'ai cherché à moduler *in vitro* les 4 grandes voies développementales impliquées dans les premières étapes de la spécification et de la différenciation rétiniennes. Ainsi, nous avons cherché à reproduire l'inhibition des voies BMP, WNT ou TGF- β . Chacune de ces voies peut être modulée par l'utilisation des petites molécules lorsque l'inhibition est requise (voies BMP, WNT et TGF- β) ou par l'ajout de facteurs de croissance (IGF-1) lorsque l'activation est nécessaire (**Table 7**). Nous avons testé donc l'influence de ces facteurs seuls, en combinaison, avec des durées variables et des compositions de milieux différents. Ces premières différenciations ont été lancées avec deux milieux de cultures différents contenant une concentration élevée de KSR (20%) et faible de KSR (2%), auxquels sont ajoutés des combinaisons de facteurs. Ces différenciations ont été cultivées pendant 1, 2, 3 et 4 semaines (au total 144 combinaisons différentes ; 3 à 5 répliques biologiques). Une RT-qPCR en temps réel a été alors réalisée avec un système automatisé associé à un bras robotique qui permet de traiter plusieurs plaques à la fois. Les taux d'expression des différents gènes du champ visuel et des progéniteurs rétiniens ont été évalués en fonction des différentes conditions testées. Les résultats des RT-qPCR montrent les expressions de gènes clés dans la différenciation des CSEhs vers des types cellulaires rétiniens.

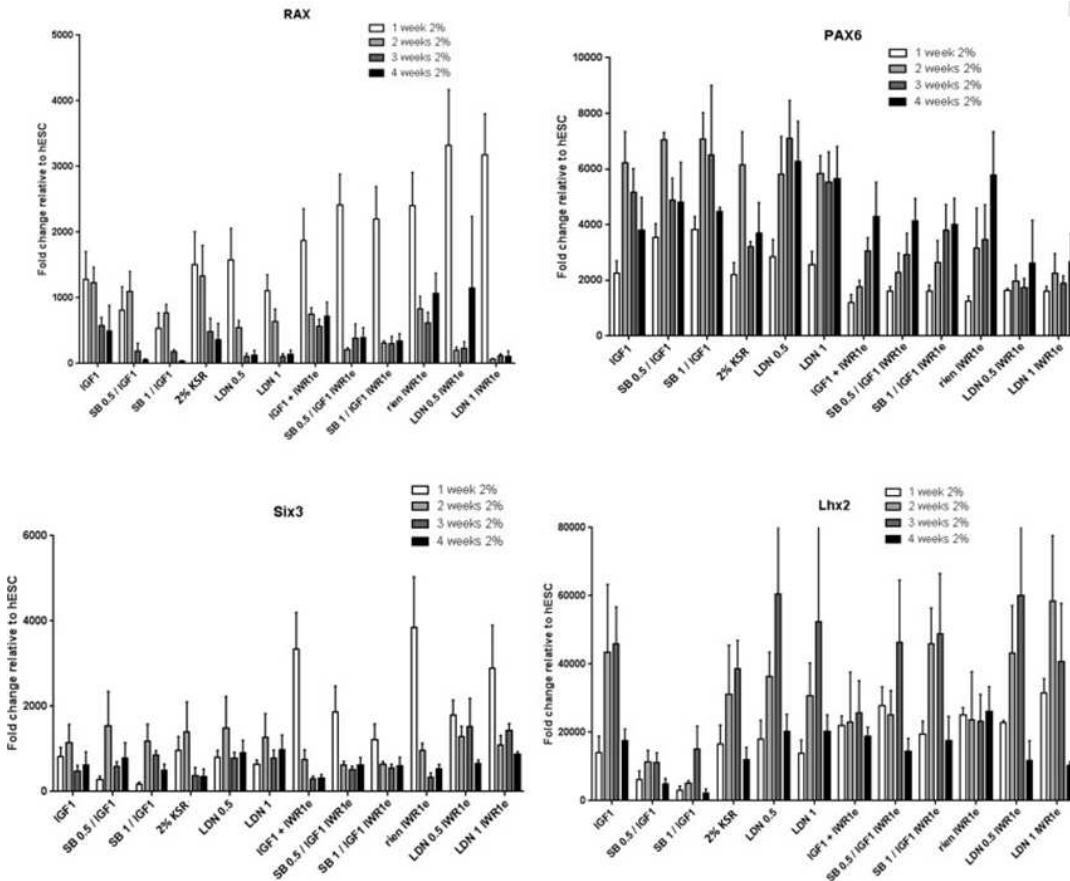
Molécule	Action	Référence
IGF-1	molécule connue comme induisant la prolifération cellulaire et permettant la différenciation des progéniteurs rétiniens <i>in vitro</i>	Wang et al. 2018
LDN193189	molécule connue comme inhibitrice la voie BMP en inhibant ALK2, ALK3 et ALK6	Wong et al. 2015
IWR1e	molécule connue comme inhibitrice de la voie Wnt en stabilisant l'axin, l'un des constituants du complexe de destruction de β -caténine	Chen et al. 2009
SB431542	une molécule connue comme inhibitrice de la voie TGF- β , elle inhibe ALK5, ALK4 et ALK7	Wagstaff et al. 2021

Table 7 : Les molécules choisies dans l'analyse combinatoire jusqu'à 3 semaines de différenciation.

Les cellules du champ visuel (Eye Field) sont caractérisées par l'expression de gènes spécifiques tels que *PAX6*, *RAX*, *SIX3* et *LHX2* (**Figure 17**). *RAX* est le premier gène activé dès la première semaine. Son expression dans un milieu de différenciation supplémenté avec une faible concentration de sérum synthétique (2% KSR), est 1500 fois supérieure à celle des CSEhs. Lorsque la concentration de sérum synthétique est augmentée (20% KSR), cette expression de *RAX* est moins forte (800 fois supérieure à celle des CSEhs ; **Figure 19**). De même, globalement, l'expression de *SIX3* est plus forte en fonction de la concentration en sérum synthétique. En effet, dès la première semaine, *SIX3* est environ 1000 fois plus exprimé avec 2% de KSR par rapport à des CSEhs tandis qu'il est seulement 400 fois plus exprimé en condition 20% KSR. Les autres gènes qui caractérisent ce stade de développement étudié (*PAX6* et *LHX2*) apparaissent de façon maximale à partir de la deuxième semaine de différenciation. De façon intéressante, la concentration en sérum synthétique affecte l'expression de ces gènes. *LHX2* est 40000 fois plus exprimé à deux semaines de différenciation en 2% KSR que dans les CSEhs, alors

qu'il est globalement 2 fois moins exprimé à 20% de KSR. Ainsi, la composition du milieu de base a un impact prépondérant pour l'expression des gènes des cellules du « eye field ». Lorsque l'on étudie l'impact de la modulation des 4 voies du développement sur un milieu de base faible en sérum synthétique (2% KSR), on observe que l'inhibition de la voie WNT (IWR1e) a un fort impact sur les expressions de *RAX* et de *SIX3* dès la première semaine mais que dès la deuxième semaine, leurs expressions chutent très brutalement (**Figure 19**). De façon intéressante, cette expression est plus faible avec un milieu 2%KSR supplémenté ou non en IGF-1 mais celle-ci se maintient sur la deuxième semaine. A l'inverse, *PAX6* est moins exprimé quand le milieu est supplémenté en inhibiteur de la voie WNT par rapport aux conditions 2% KSR supplémentées ou non en IGF-1. Pour conclure, les conditions qui favorisent l'apparition des cellules du « eye field » de façon soutenue et la plus complète correspondent à un milieu faible en sérum synthétique supplémenté ou non en IGF-1, soit les conditions 2%KSR et 2%KSR IGF-1.

A.



B.

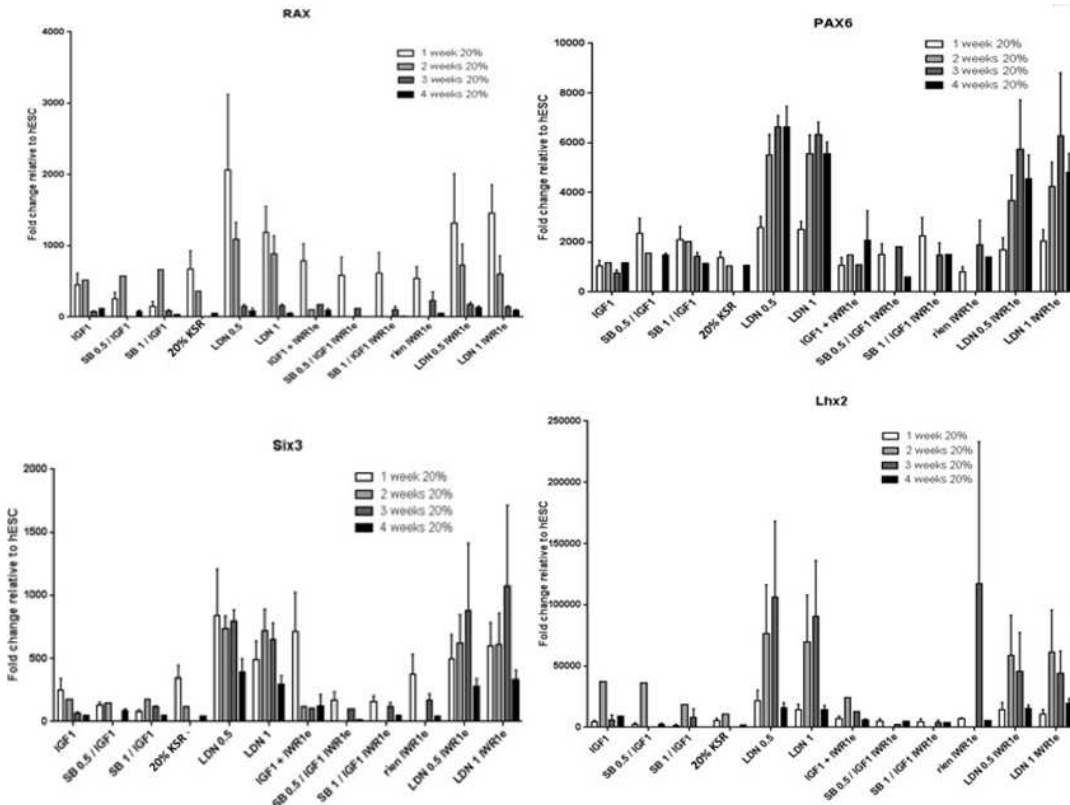


Figure 19 : Résultats de l'analyse combinatoire par RT-qPCR des facteurs influant sur la différenciation rétinienne. A-B. RT-qPCR montrant les expressions des gènes RAX, SIX3, PAX6, VSX2 suivant les différentes conditions testées dans les milieux 2% (A) et 20% KSR (B).

Nous avons également évalué l'apparition des progéniteurs rétiniens en fonction des différentes combinaisons testées. Ceux-ci sont caractérisés par l'expression spécifique de *PAX6* et *VSX2*. Un milieu de base faible en KSR (2%) supplémenté ou pas en IGF-1 permet d'obtenir la meilleure surexpression (100000 fois plus exprimés) de *VSX2* dès la deuxième semaine par rapport à des CSEhs (**Figure 20**). La présence d'inhibiteur de la voie TGF- β (SB431542) conduit à une expression beaucoup plus faible de *VSX2* à 2 semaines par rapport aux deux conditions précédentes. Par contre, l'inhibition de la voie WNT (IWR1e) retarde la surexpression de *VSX2* avec un pic seulement à la quatrième semaine. De la même manière, l'expression de *PAX6* suit la même tendance pour les conditions faibles en KSR supplémentées ou non d'IGF-1. En effet, *PAX6* est surexprimé dès la deuxième semaine. Le même décalage du pic d'expression à la quatrième semaine est observé avec l'ajout de IWR1e (**Figure 19**). De façon intéressante, les conditions contenant du SB431542 ou du LDN193189 en l'absence de IWR1e, entraîne une forte expression de *PAX6* mais une très faible expression de *VSX2*, ce qui suggère que le type cellulaire majoritaire n'est plus de type rétinien mais plutôt d'autres neurones du télencéphale. Ainsi, les conditions les plus favorables à l'émergence des gènes correspondants aux progéniteurs rétiniens sont les mêmes que pour celles des gènes du champ visuel (un milieu faible en sérum synthétique supplémenté ou non en IGF-1 ; aussi appelé 2%KSR et 2%KSR IGF-1).

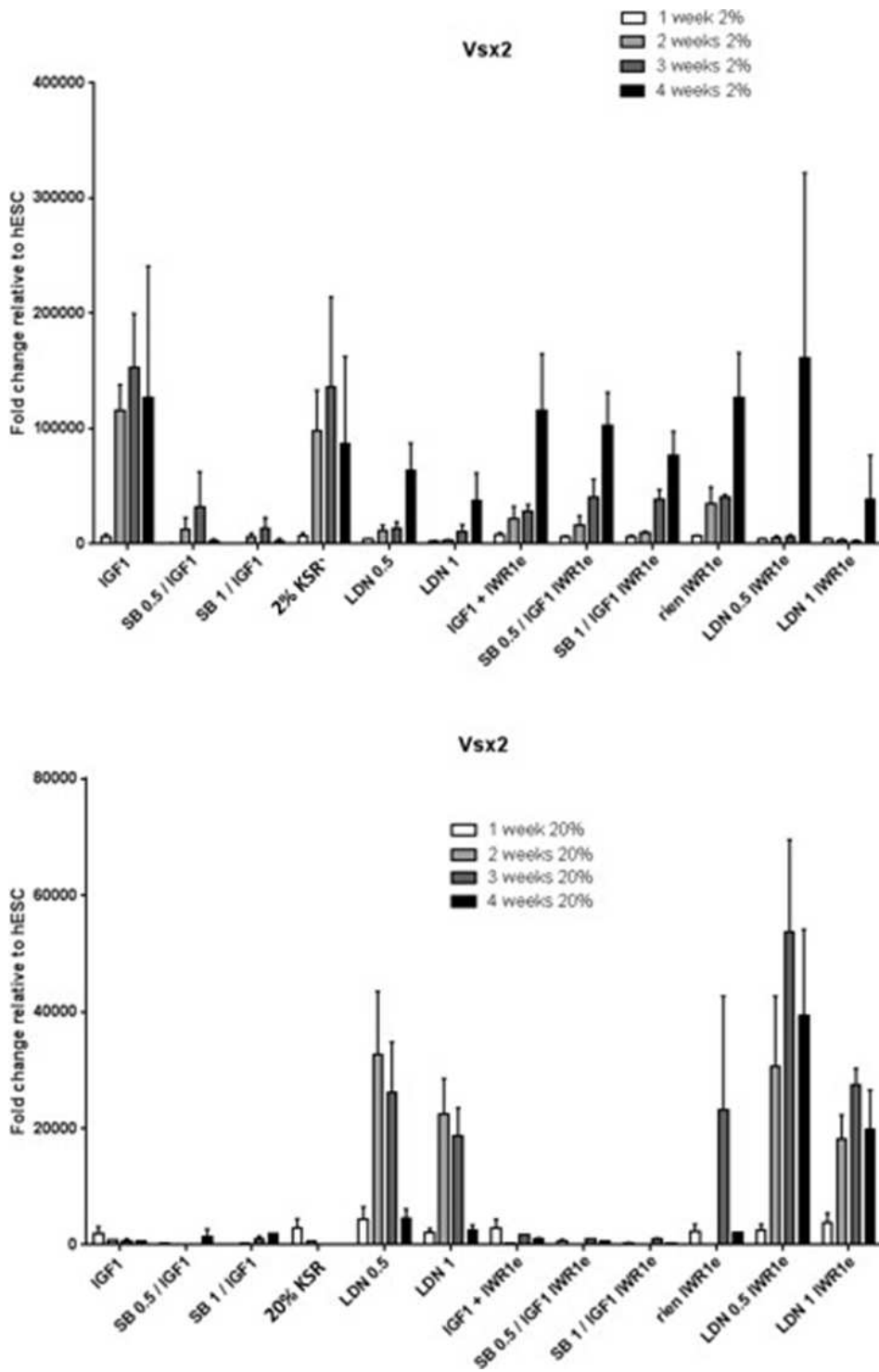


Figure 20 : Résultats des RT-qPCR montrant l'expression de VSX2 dans les différentes conditions testées au cours du temps par rapport à celles des CSEhs.

La **figure 21** récapitule toutes les conditions de RT-qPCR testées et décrites précédemment sur son axe-y et les gènes de la rétine sont présents sur l'axe-x. Une condition testée correspond à une ligne. L'expression génique de chaque condition est normalisée sur l'expression génique des CSEhs. La **figure 21** montre que certaines conditions (carré jaune) induisent au sein des cellules différenciées l'expression des gènes du « Eye field » et que d'autres conditions induisent l'expression des gènes des progéniteurs rétiniens (carré bleu). L'expression de ces gènes est quantifiée par la couleur rouge sur

la heat map, cette couleur indique que le gène est plus exprimé dans la condition testée que dans les CSPhs.

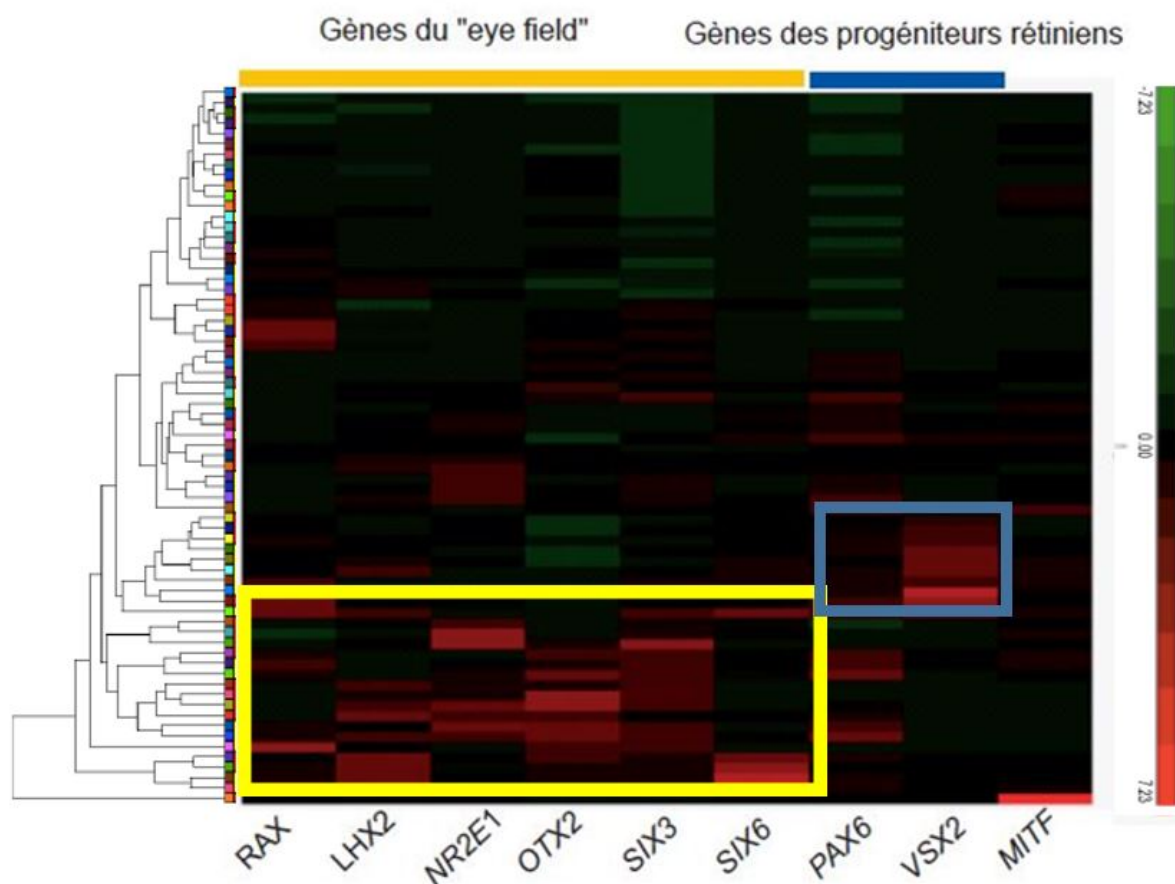
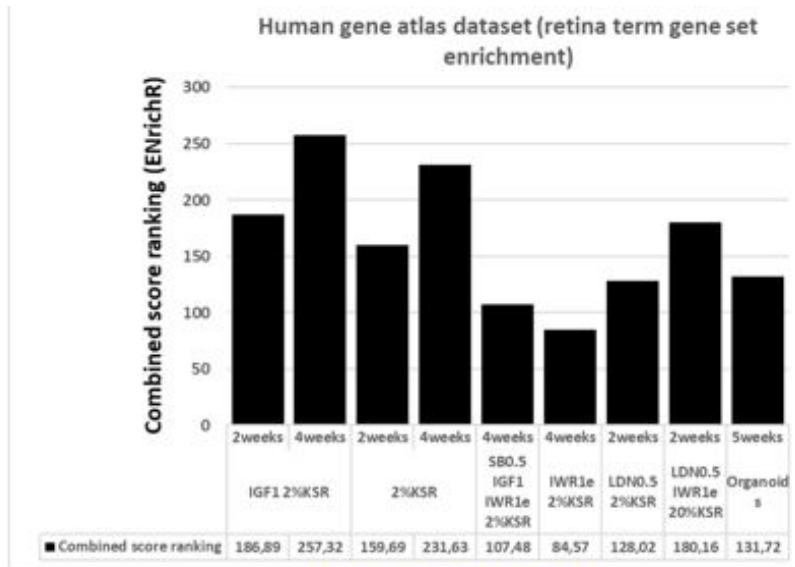


Figure 21 : La heat map montrant les résultats des RT-qPCR de l'analyse combinatoire. Chaque ligne correspond à une condition testée (milieu de culture, cytokines et 1, 2 et 3 semaines de différenciation), 144 conditions sont testées au total. Les gènes de la rétine sont mentionnés sur l'axe-x. La couleur rouge indique que le gène en question est plus exprimé dans la condition testée qu'au sein des CSPhs. La couleur verte indique que le gène est moins exprimé dans la condition testée que dans les CSPhs. Le carré jaune montre les meilleures conditions pour produire des cellules du « eye field » tandis que le carré bleu montre les meilleurs conditions pour obtenir des progéniteurs rétiniens.

Cependant, l'analyse de gènes d'intérêt isolés par RT-qPCR est susceptible de masquer des phénomènes de différenciation dans d'autres types cellulaires, qui pourraient être majoritaires dans la culture, et pour lesquels l'expression des gènes spécifiques n'est pas évaluée. Pour éviter ce biais d'analyse, une étude transcritomique a été réalisée sur une sélection de combinaisons de traitement. De plus, ces différentes combinaisons ont été comparées à une culture 3D d'organoïdes rétiniens (de 35 jours de culture) de référence bien caractérisée (Reichman et al. 2017). Dans un premier temps, les différentes combinaisons de différenciation et les organoïdes rétiniens sont comparés aux CSEhs et seuls les gènes les plus exprimés avec un facteur d'augmentation de 100 et une valeur de p inférieure à 0,05 sont pris en compte pour la suite des analyses. Ainsi, les 2 conditions 2% KSR et 2% KSR IGF-1, identifiées précédemment comme les plus favorables à l'expression des gènes de progéniteurs rétiniens dès deux semaines, ont respectivement 84 et 90 gènes surexprimés par rapport aux CSEhs

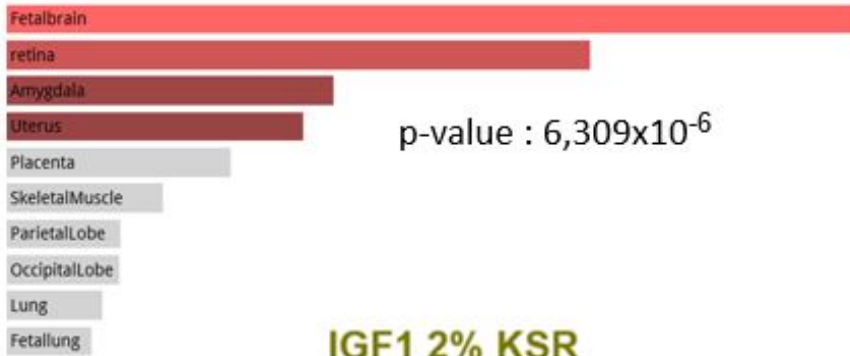
de départ. Une condition moins favorable à l'expression des gènes de progéniteurs rétiniens a également été évaluée. Cette condition (LDN193189 0,5 2% KSR) conduit à une surexpression de 73 gènes par rapport aux CSEhs. Enfin les organoïdes rétiniens (à 35 jours de culture) ont 176 gènes surexprimés par rapport aux CSEhs. Pour déterminer à quel type cellulaire cette surexpression de gènes correspond, une analyse bioinformatique via le site EnrichR a été réalisée. L'analyse EnrichR montre que le « combined score ranking » des gènes de la rétine pour les conditions 2% KSR et 2% KSR IGF-1 est supérieur à 230 après 4 semaines de différenciation, tandis que celui des cellules issues d'organoïdes de rétine est de 131 (**Figure 22 A**). En s'appuyant sur la base de données Human Gene Atlas, nous observons aussi que le type majoritaire associé à cette surexpression particulière de gènes est de la rétine pour les conditions 2% KSR et 2% KSR IGF-1 avec une valeur de p respectivement de $3,692 \times 10^{-5}$ et de $6,309 \times 10^{-6}$ (**Figure 22 B**). De façon intéressante, les cellules traitées avec LDN193189 0,5 en milieu 2% KSR ont une surexpression d'un set de gènes associés à du cerveau fœtal de façon majoritaire avec une valeur de p-value $6,452 \times 10^{-6}$. Enfin, la condition contrôle (organoïdes rétiniens) d'après le site EnrichR possède un set de gènes associé à de la rétine de façon majoritaire avec une p-value de $5,445 \times 10^{-7}$. Ainsi ces résultats de transcriptomique confirment que les CSEhs se différencient bien de façon spécifique dans la voie de cellules rétiniennes avec les traitements 2% KSR et 2% KSR IGF-1 tandis qu'elles s'engagent dans une autre voie : la condition 2%KSR LDN193189 0,5.

A.



B.

LDN0.5 2% KSR



IGF1 2% KSR



Organoïde de rétine

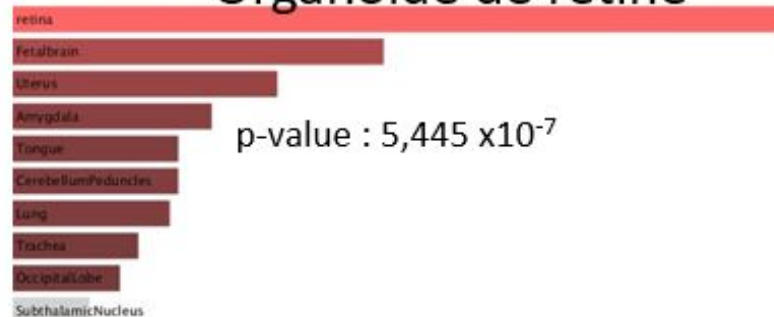


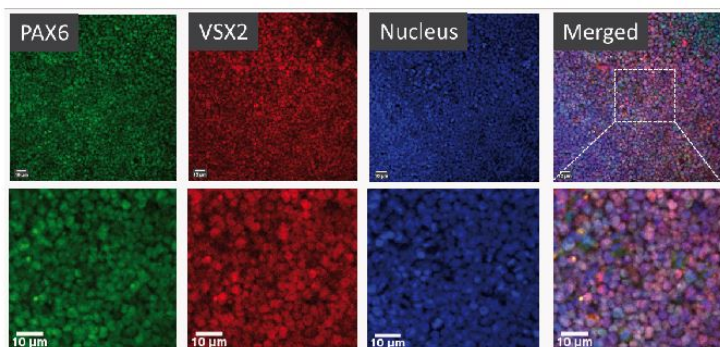
Figure 22 : Analyse EnrichR. A. Diagramme en barres montrant le « combined score ranking » des gènes de la rétine pour chacune des conditions séquencées ainsi que pour les cellules provenant d'organoïdes

de rétine. B. Analyse EnrichR montrant pour chaque traitement à quel tissu s'associe l'expression d'un set de gènes.

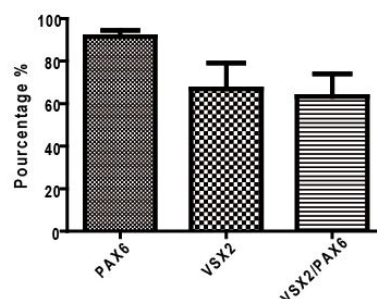
L'analyse de l'expression des gènes *VSX2* et *PAX6* par RT-qPCR sur un lysat cellulaire ne permet pas de conclure sur la co-expression de ces 2 gènes dans les mêmes cellules. Cependant cette co-expression est nécessaire pour conclure sur la présence de progéniteurs rétiens. Nous avons donc réalisé des immunofluorescences à 3 semaines de différenciation dans la condition 2% KSR IGF-1, car il s'agit de celle qui présentait le meilleur rendement en progéniteurs rétiens d'après les analyses en RT-qPCR et transcriptomique réalisées auparavant. Ces immunofluorescences indiquent la co-expression des protéines *VSX2* et *PAX6* (**Figure 23 A**). 63% ($\pm 11\%$) des cellules co-expriment simultanément par *PAX6* et par *VSX2* (**Figure 23 B**), ce qui montre qu'il s'agit de progéniteurs rétiens. La cytométrie en flux (**Figure 23 C**) nous a permis de quantifier d'une autre manière le rendement obtenu en progéniteurs rétiens. Nous observons que les cellules co-expriment aussi les protéines *LHX2/PAX6* à 64% $\pm 26\%$, $n \geq 5$, la protéine *PAX6* à 94% $\pm 6\%$, $n \geq 5$ et ainsi que la protéine *VSX2* à 52% $\pm 20\%$, $n \geq 3$ à 3 semaines de différenciation depuis des CSEhs. Dans cette condition (milieu faiblement supplémenté en KSR (2%) et ajout de la molécule IGF-1), à 3 semaines de différenciation, la plupart des cellules sont devenues des progéniteurs rétiens de par l'expression de leurs protéines *VSX2/PAX6* à partir de CSEhs RC9.

Progéniteurs rétiens (*VSX2/PAX6*) obtenus après 3 semaines de différenciation à partir de CSEh RC9

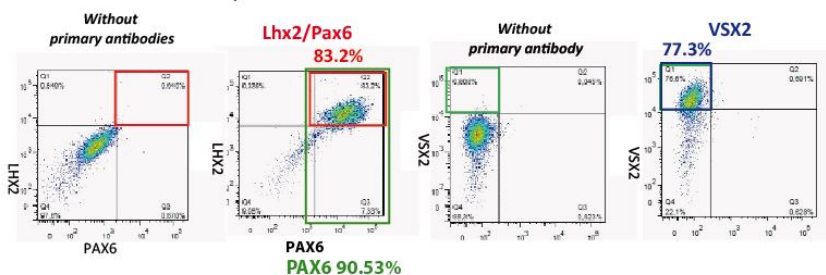
A. Quantification en immunofluorescence



B. Pourcentage de cellules positive



C. Quantification en cytométrie en flux



D. Quantification cytométrie en flux 3 semaines CSEh RC9

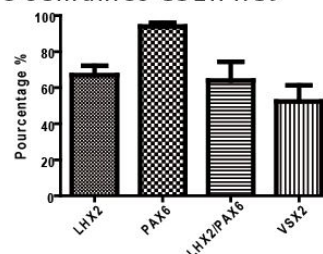
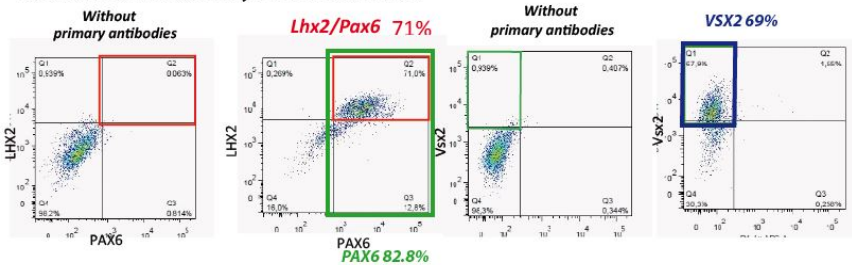


Figure 23 : Analyse des marqueurs d'expression des progéniteurs rétiens obtenus après 3 semaines de différenciation à partir de CSEhs RC9 dans la condition 2%KSR IGF-1. A. Immunofluorescence montrant la co-expression de *PAX6* et de *VSX2* dans la condition 2%KSR IGF-1. B. Comptage manuelle sur les immunofluorescences des marquages *VSX2/PAX6*. C. Quantification des cytométries en flux pour les marquages *LHX2/PAX6*, *PAX6* et *VSX2*.

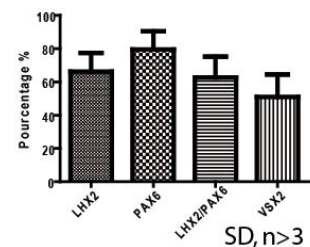
Le protocole a été reproduit sur la lignée CSPhis 56c2. Après 3 semaines de différenciation, la cytométrie en flux montre que la co-expression des protéines LHX2/PAX6 est de 63% ±28, n>3, l'expression de PAX6 est de 79% ±25, n>3, et l'expression de VSX2 est de 51% ±13, n>3 (**Figure 24 A**). Ces résultats sont corrélés avec l'observation en immunofluorescence (**Figure 24 B**).

Progéniteurs rétiniens (VSX2/PAX6) obtenus après 3 semaines de différenciation à partir de CSPhi 56C2

A. Quantification en cytométrie en flux



Quantification facs 3 semaines CSPih 56C2



B. Quantification en immunofluorescence

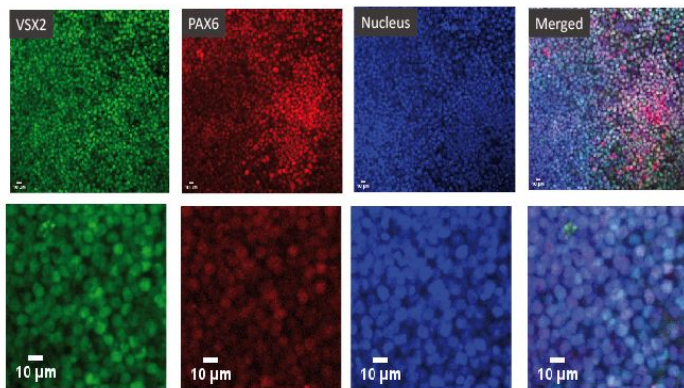


Figure 24 : Progéniteurs rétiniens obtenus après 3 semaines de différenciation à partir de CSPhis dans la condition 2%KSR IGF-1. A. Quantification des cytométries en flux des cellules positives pour LHX2/PAX6, PAX6 et VSX2. B. Immunofluorescence montrant la co-expression de PAX6 et de VSX2 dans la condition 2%KSR IGF-1.

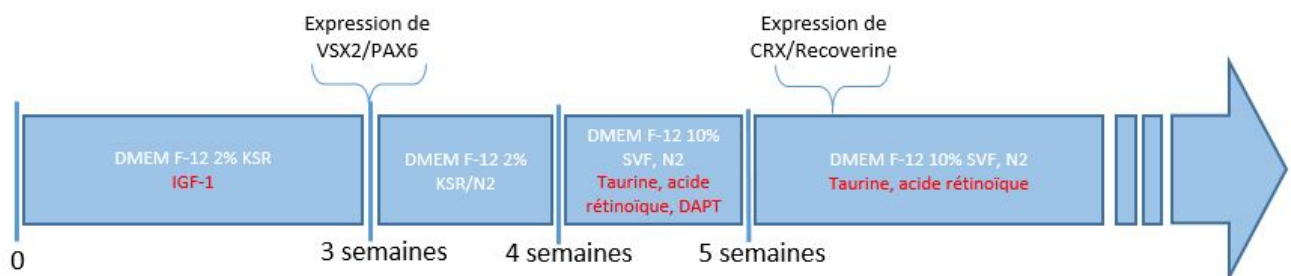


Figure 25 : Protocole différenciation des photorécepteurs en 2D sous forme de cultures adhérentes à partir de CSPhs. Le milieu de culture est mentionné en blanc, et les cytokines ajoutées sont écrites en rouge : IGF-1 10μg/mL; acide rétinoïque 5x10⁻⁸ mol/L; DAPT 4,32mg/mL ; taurine 1x10⁻⁴ mol/L. Le

dernier milieu de différenciation peut être utilisé durant plusieurs mois. Seules les 3 premières semaines de ce protocole ont fait l'objet d'une analyse combinatoire.

Une fois que nous avons réussi à obtenir des progéniteurs rétiniens après 3 semaines de différenciation, j'ai cherché à produire des photorécepteurs immatures. Cette partie comporte des résultats préliminaires. Nous avons développé un protocole nous permettant d'obtenir des cellules exprimant les protéines CRX et RECOVERINE après 7 semaines de différenciation à partir de CSEhs (**Figure 25 et 26**). 3 semaines après l'obtention de progéniteurs rétiniens, nous avons supplémenté le milieu avec du N-2 durant une semaine car il a été démontré qu'il suffisait à lui seul pour induire la différenciation rétinienne (Reichman et al. 2014). Ensuite, après 4 semaines de différenciation nous avons supplémenté le milieu avec du sérum de veau foetal et nous avons ajouté les cytokines de l'acide rétinoïque et la taurine pour le reste de la différenciation (**Figure 25**). En effet, l'acide rétinoïque et la taurine permettent la différenciation terminale des progéniteurs rétiniens en photorécepteurs (Osakada et al. 2008, 2009). La présence de sérum a démontré dans certaines études, une meilleure maturation des photorécepteurs (Zhong et al. 2014). DAPT (permet l'inhibition de Notch *in vitro*) est ajouté à la 4^{ème} semaine de différenciation mais seulement durant une semaine afin de d'induire la sortie du cycle cellulaire des progéniteurs rétiniens et de permettre ainsi l'émergence de photorécepteurs immatures exprimant la protéine CRX (Osakada et al. 2008).

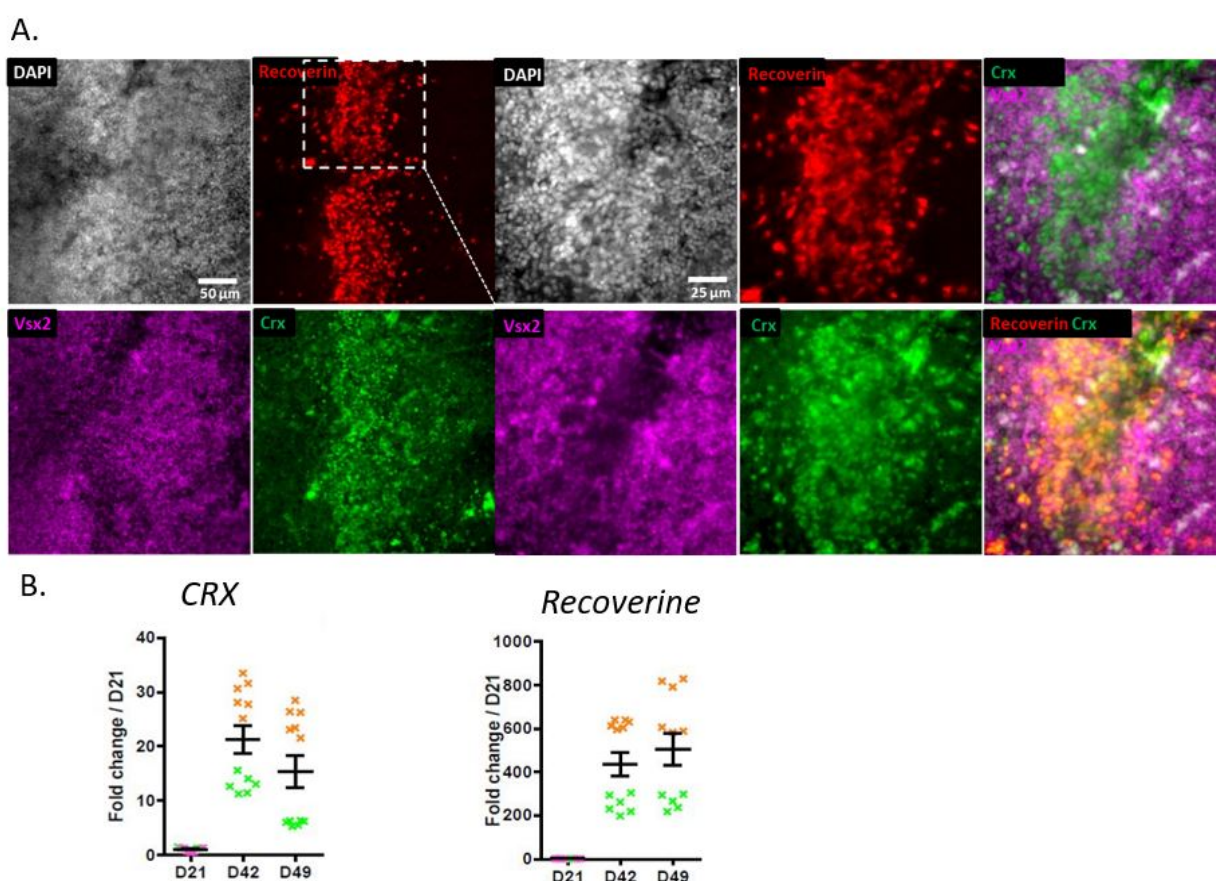


Figure 26 : Optimisation du protocole de différenciation pour obtenir des photorécepteurs immatures à 7 semaines de différenciation. A. Obtention de photorécepteurs immatures sur des cultures adhérentes après 7 semaines de différenciation à partir de CSEhs en utilisant le protocole décrit figure 25. L'immunofluorescence souligne la présence des protéines caractéristiques des photorécepteurs

immatures : RECOVERINE et CRX. B. RT-qPCR réalisées sur des sur des cultures adhérentes après 21 jours (3 semaines), 42 jours (6 semaines) et 49 jours (7 semaines) de différenciation à partir de CSEhs montrant l'expression des gènes CRX et RECOVERINE.

En utilisant ce protocole jusqu'à 7 semaines de différenciation, nous avons réussi à obtenir des photorécepteurs immatures exprimant les protéines CRX et RECOVERINE (**Figure 26 A**). Les analyses en RT-qPCR montrent que l'expression de CRX et de RECOVERINE augmente au cours de la différenciation sur le temps analysé (n=2) (**Figure 26 B**). Ainsi, le protocole que nous avons établi permet d'obtenir des photorécepteurs immatures exprimant les protéines CRX et RECOVERINE après 7 semaines de différenciation.

d. Discussion

Nos résultats montrent que nous avons développé un protocole simple sous forme de cultures adhérentes permettant d'obtenir des progéniteurs rétiniens co-exprimant les protéines VSX2 et PAX6 avec un rendement d'environ 60% après 3 semaines de différenciation depuis des CSPhs en utilisant un milieu avec une faible concentration en sérum synthétique (2% KSR) et de l'IGF-1. Ce résultat est contraire à ce qui est décrit dans la littérature. En effet, Nakano et ses collaborateurs (2012) ont développé un protocole avec une forte concentration en KSR. Celle-ci entraînait une caudalisation de la différenciation qui ne permettait plus d'obtenir suffisamment de cellules rétiniennes. Cependant, cet effet était rectifié par l'addition d'un inhibiteur de la voie WNT. Nakano et ses collaborateurs travaillaient avec des cultures d'organoïdes rétiniens en 3D tandis que nous développons un protocole 2D. L'exposition aux facteurs du milieu de culture est donc différente et peut expliquer pourquoi nous observons des variations différentes. Les autres voies modulées, décrites pour favoriser le lignage rétinien (Gagliardi et al. 2019), n'induisent pas, non plus, une meilleure surexpression des gènes associée à la rétine.

Lors de l'élaboration de ce protocole, nous avons rencontré des problèmes de reproductibilité des rendements obtenus en VSX2/PAX6. Les conditions de différenciation de 0 à 3 semaines doivent être travaillées à nouveau, pour que ce protocole puisse être suffisamment robuste afin d'être utilisé dans le cadre d'une application clinique. Sur cette première série d'expérimentations, nous avons traité les cellules en continu sur toute la durée de la différenciation. Des nouvelles expérimentations devront être menées pour introduire un facteur de durée d'exposition des traitements. En effet, nous avons observé, par exemple, que l'inhibition de la voie WNT sur une semaine augmentait drastiquement l'expression de RAX mais que la poursuite de ce traitement ne permettait pas le maintien de celle-ci. Ainsi, nous pourrions modifier le traitement à partir de la première semaine pour maintenir cette expression. Nous pourrions aussi évaluer si la densité cellulaire ensemencée au départ ou si le milieu de culture de base ont un impact sur le rendement de progéniteurs rétiniens obtenus.

Ensuite, nous pouvons chercher à amplifier les progéniteurs rétiniens obtenus à l'aide de facteurs de prolifération comme le FGF2 ou IGF-1, et ainsi étudier l'influence de ces facteurs sur le rendement des progéniteurs rétiniens.

Lorsque les cellules ont été différenciées jusqu'à 7 semaines sous forme de cultures adhérentes, des résultats préliminaires ont montré qu'elles sont capables d'exprimer les protéines CRX et RECOVERINE, caractéristiques des photorécepteurs immatures. Même si les immunofluorescences réalisées à 7 semaines de différenciation montrent que le rendement obtenu est faible, car seuls quelques-uns des progéniteurs sont capables de se différencier en des photorécepteurs immatures, il est nécessaire d'améliorer le protocole en réalisant une nouvelle analyse combinatoire.

Les molécules connues comme intervenant positivement sur la différenciation des précurseurs de photorécepteurs en des photorécepteurs matures et pouvant être utilisées pour réaliser une analyse combinatoire après 3 semaines de différenciation sont listées dans la **Table 8**.

Molécule	Action	Référence
T3	Hormone thyroïdienne connue pour favoriser la différenciation des bâtonnets L/M.	Zerti et al. 2020
Activine A	Molécule antagoniste de la voie nodale. L'utilisation de l'activine A induit une augmentation de la production de photorécepteurs immatures (CRX+).	Mellough et al. 2012
LDN	Molécule connue comme bloquant la voie de signalisation BMP. Lorsque les cellules rétiniennes sont traitées avec LDN, la production de cellules de Müller est amoindrie et de cette manière, les cellules de Müller ne peuvent pas réprimer l'expression des gènes des photorécepteurs comme <i>OTX2</i> .	Ueki et al. 2015
SAG	Molécule connue pour promouvoir la voie de signalisation Sonic Hedgehog. Cette voie est indispensable pour la différenciation des bâtonnets <i>in vitro</i> . Elle permet également d'augmenter le nombre de progéniteurs rétiniens.	Levine et al. 1997
IWR1e	Molécule induisant l'inhibition de la voie Wnt. L'inhibition de la voie Wnt est indispensable au cours du développement embryonnaire lors de la maturation de la cupule optique vers la maturation des photorécepteurs.	Zhao et al. 2017
L'acide rétinolique et la taurine	L'acide rétinolique et la taurine sont connus pour promouvoir la différenciation des bâtonnets et des cônes.	Khalili et al. 2018; Zhong et al. 2014
DAPT	Molécule induisant l'inhibition de la voie Notch en inhibant la g-sécrétase.	Dong et al. 2021

Table 8 : Liste des cytokines pouvant être impliquée dans la différenciation terminale des photorécepteurs.

3 Mise au point d'un tissu rétinien par bio-ingénierie favorisant la maturation et l'intégration des photorécepteurs

a. Introduction

Pour restaurer la fonction visuelle perdue dans le cadre des dégénérescences rétiniennes, différentes approches de thérapie cellulaire ont été évaluées (cf. **Parties I. 3 et I.5.b.**). Cependant, les études de transplantation des progéniteurs de photorécepteurs sur des modèles animaux ont montré que les photorécepteurs injectés en suspension dans des rétines atrophiques, ne s'organisent pas ou ne s'intègrent que très peu (Iraha et al. 2018; McLelland et al. 2018; Shirai et Mandai 2016; Tu et al. 2019). Les tentatives de greffe de sections d'organoïdes de rétine permettent de greffer des photorécepteurs déjà organisés mais ces sections contiennent d'autres types cellulaires dont des cellules bipolaires qui limitent les connexions avec la rétine hôte (Watari et al. 2023). Par ailleurs, les sections obtenues sont trop petites pour couvrir une région significative de la macula chez l'homme.

Une stratégie qui permettrait de faciliter l'organisation des photorécepteurs est de guider leur maturation dans une membrane microstructurée (cf. **Partie I. 6. B.**). Ainsi, différentes membranes microstructurées avec différents motifs ont été évaluées *in vitro* pour leur capacité à permettre la culture et l'organisation des photorécepteurs (Jung et al. 2018; Lee et al. 2021; Worthington et al. 2017). Cependant, aucune démonstration de la fonctionnalité d'un tel système sur des modèles animaux n'a été publiée à ce jour.

L'objectif de cette étude a été d'évaluer la capacité des précurseurs de photorécepteurs issus d'organoïdes de rétine ou des progéniteurs rétiens issus du protocole développé en **partie III. 2.** à s'organiser dans de nouveaux designs de membranes microstructurées. Pour cela, nous avons développé des membranes microstructurées de PDMS, constituées de pores permettant de contenir les photorécepteurs.

Une partie des résultats de cette étude fait l'objet d'un dépôt de demande de brevet (FR2107934 ; date de priorité : 2021-07-22) (**voir annexe 1**). Les inventeurs désignés sont Elise Herardot, Karim Ben M'Barek, Christelle Monville et Frédéric Hamouda.

b. Matériels et méthodes

1. Génération d'organoïdes de rétine

Pour ces différenciations, les lignées de cellules souches utilisées sont : la lignée CSEhs RC-9, dérivée par Roslin Cells (Roslin Cell Therapies Ltd., Royaume Unis) et la lignée CSPhs PC056c2 dérivée par Phenocell (Grasse, France) à partir de fibroblastes humains (Barrault et al. 2019), et la lignée CSPhs PGP1 (Lam et al. 2020).

Les organoïdes de rétine ont été obtenus à partir du protocole de l'équipe du Dr. Olivier Goureau à l'institut de la vision (**Figure 27**) (Reichman et al. 2017). Brièvement, les CSPhs sont cultivées dans des boîtes de 6 cm jusqu'à ce qu'elles soient à 80% de confluence. La différenciation est initiée sous forme de cultures adhérentes au moment où le milieu est changé pour du milieu E6. Ce milieu se compose de 500mL de « TeSR™- E6 Basal Medium » (Stem Cell, réf : 5946) avec le supplément « TeSR™-E6 20x supplement » (Stem Cell, réf : 5946). Ce milieu est renouvelé chaque jour jusqu'au 2^{ème} jour. Du 2^{ème} jour jusqu'au 28^{ème} jour, le milieu est changé toutes les 48/72 heures pour un milieu E6/N2. Ce milieu se compose de 500 mL de « TeSR™-E6 Basal Medium » (Stem Cell, réf : 5946), du supplément « TeSR™-E6 20x supplement » (Stem Cell, réf 5946), du supplément N2 (Gibco, réf : 17502048) et de 5 mL de Pénicilline-streptomycine (ThermoFisher, réf : 15140122). A partir du 28^{ème} jour de différenciation sous forme de cultures adhérentes, des petites sphères, précurseurs des futurs organoïdes de rétine, émergent du tapis cellulaire. Celles-ci sont décollées et mises dans des plaques 6 puits à faible attachement jusqu'à la fin de la différenciation. Le milieu utilisé à partir de l'étape de récolte jusqu'à la fin de la différenciation est le milieu BVA. Il est composé de 500 mL de DMEM/F12 (Gibco, réf : 11320074), du supplément « SM1 Neuronal » (stem cell, réf 5711) et de 5 mL de Pénicilline-streptomycine (ThermoFisher, réf : 15140122). Du 28^{ème} jour jusqu'au jour 35, le facteur de croissance FGF2 (Miltenyi, réf : 130-104-923) est ajouté toutes les 48 heures à 10ng/mL.

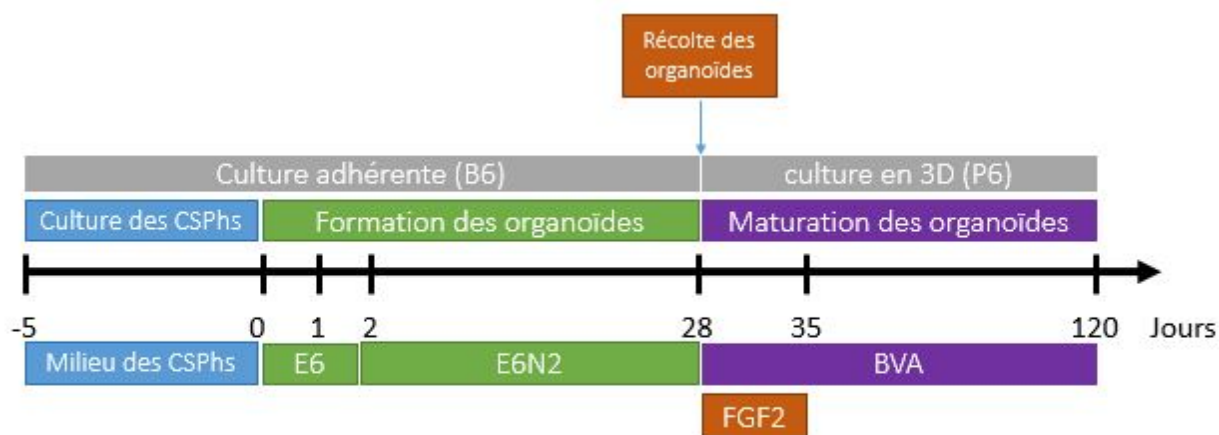


Figure 27 : Protocole de différenciation permettant d'obtenir des organoïdes de rétine après 120 jours de différenciation. Adapté, du protocole de (Reichman et al. 2017).

2. Dissociation des organoïdes

Les organoïdes sont récoltés à l'aide d'une pipette pasteur et sont coupés à l'aide de deux aiguilles. Si les organoïdes présentent un bourrelet pigmenté contenant de l'EPR, il doit être retiré. Les organoïdes sont mis dans une solution de ringer (Merck, réf 1155250001) (475 mL pour 15/20 organoïdes). La Papaine (2U soit 1,75 μ L pour 15/20 organoïdes) (Worthington Biochemical Corporation, réf : LS003126) est activée à l'aide de 24 μ L de solution activatrice de papaine à 37°C, durant 30 minutes. La solution activatrice de papaine est fabriquée dans de l'eau pure dans laquelle sont dissous 1,1mM d'EDTA (Sigma-Aldrich, réf : E6758), de 5.5mM de L-Cystéine (Sigma-Aldrich, réf : C7477) et de 0,067 mM de β -mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich, réf : M3148). La papaine activée est ajoutée à la solution de ringer contenant les organoïdes coupés. Ils sont incubés durant 30 min à 37°C, puis les organoïdes sont tapotés afin d'être légèrement remis en suspension avant d'être à nouveau incubés durant 5 min à 37°C. Les organoïdes sont dissociés à l'aide d'une pipette de 1000 μ L. Ensuite, les organoïdes sont de nouveau incubés durant 10 min à 37°C, puis ils sont dissociés à l'aide d'une pipette de 200 μ L.

3. Section d'organoïdes

Les organoïdes sont fixés à l'aide de paraformaldéhyde 4% sur de la glace durant 10 minutes. Les organoïdes sont ensuite lavés deux fois à l'aide de PBS. Puis, les organoïdes sont incubés dans une solution de PBS sucrose 30% durant au minimum de 1 heure à 4°C (les organoïdes doivent être tombés au fond du tube). Puis, dans des moules en plastique, une petite quantité de gélatine est déposée puis solidifiée (à 4°C durant 10 min puis durant 2h dans une chambre humide) afin de créer un socle pour déposer l'organoïde. Ensuite, les organoïdes sont déposés au centre des socles de gélatine et sont entourés d'une solution de PBS contenant 10% de sucrose et 7.5% de gélatine. L'ensemble est laissé à 4°C durant 10 minutes puis durant 1h dans une chambre humide. Pour congeler les organoïdes, les cubes de gélatine contenant les organoïdes sont trempés dans de l'isopentane à -20°C. Les organoïdes contenus dans la gélatine sont ensuite stockés à -80°C.

Au moment de la découpe des sections d'organoïdes au cryostat (Leica CM1520), la gélatine contenant les organoïdes est détachée des socles et l'échantillon est fixé sur le support de découpe du cryostat à l'aide d'OCT. Des sections de 10 μ m ont été réalisées et déposées sur des lames.

Avant de réaliser les immunoflorescences comme décrites dans la **section III.2.b.**, les lames contenant les coupes sont plongées dans une solution de PBS à 37°C afin de retirer la gélatine.

4. Microscopie (microscope confocal et traitement d'image)

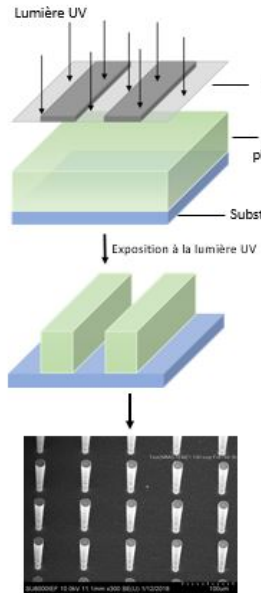
Les images obtenues ont été prises avec un microscope à fluorescence (Zeiss) et avec un microscope confocal (Zeiss LSM880-Airyscan Confocal Microscope) piloté par le logiciel Zeiss Zen black. Les reconstructions en 3D ont été réalisées à l'aide du microscope confocal. Les acquisitions en profondeur ont été réalisées en Z-stack de 100 à 150 μ m avec une acquisition tous les 1 μ m. Les images et reconstitutions 3D sont opérées avec le logiciel image J.

5. Production des membranes microstructurées

A. Génération des moules maîtres

Photolithographie

Le masque est posé sur le matériau photorésistant. Puis, les zones non couvertes par le masque sont détruites par la lumière UV.

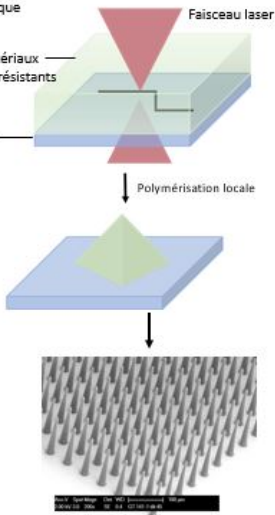


Photolithographie ne permet pas la création de motifs complexes

Seulement la membrane avec les motifs de type cylindre peut être créée avec cette technologie

La polymérisation à « deux-photons »

La polymérisation à «deux-photons» est un processus basé sur l'absorption simultanée de deux photons sur le matériau photorésistant, induisant la polymérisation locale de la résine.



La polymérisation à deux photons permet de créer des motifs complexes en 3D

Tous les motifs peuvent ainsi être réalisés (tripode, hexagonal, conique, cylindrique)

B. Production des membranes microstructurées

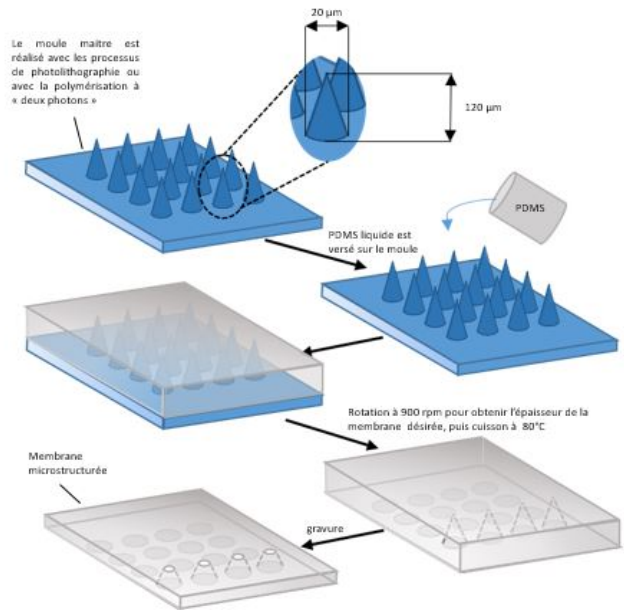


Figure 28 : Processus de création des membranes microstructurées. A. La première étape de production est la génération des moules maîtres des membranes microstructurées. Deux techniques ont été utilisées pour les produire : la photolithographie et la polymérisation à deux photons. B. Ces moules ainsi générés sont les négatifs des membranes microstructurées. Ils servent de support sur lequel est ensuite coulé le PDMS liquide constituant les membranes. Le PDMS se polymérise à 80°C, puis une étape de gravure est nécessaire pour ouvrir les motifs et ajuster l'épaisseur des membranes. Adapté de (Weibel, Diluzio, et Whitesides 2007).

La mise au point et la réalisation de ces membranes microstructurées ont été effectuées au Centre de Nanosciences et Nanotechnologies (CNRS, Université Paris Saclay ; Dr. Frédéric Hamouda, Camille Geiger et Natacha Perrin).

La production des membranes microstructurées se décompose en plusieurs étapes. La première étape consiste à produire un moule maître de chacune des membranes constituant le négatif de celles-ci. Le moule maître des membranes peut être réalisé à l'aide de deux techniques différentes : la photolithographie et la polymérisation à « deux-photons ». La photolithographie est un procédé consistant à mettre un masque sur un matériau photorésistant appelé le SU8. Puis, la lumière UV va détruire toutes les zones non couvertes par le masque. Avec cette technique seulement des structures simples peuvent être réalisées, la forme du motif obtenue reste identique sur toute l'épaisseur de la membrane. Seules les membranes de type cylindrique ont pu être obtenues avec ce procédé. Par la

suite, nous avons souhaité développer des membranes avec des motifs plus complexes (tripode, hexagonal et conique). Pour ce faire, nous avons utilisé la technique de la polymérisation à deux-photons avec le Nanoscribe GmbH, une technologie qui permet une polymérisation dans l'espace point par point (<https://www.nanoscribe.com/en/>). Un matériau photosensible appelé le IP-S est utilisé pour cette approche. Les moules maîtres obtenus sont préalablement traités en phase vapeur avec du 1H,1H,2H,2H-perfluorooctyltriéthoxysilane afin de faciliter le démoulage de la membrane (Nekouian, Sojoodi, et Nadri 2019).

Dans un second temps, du PDMS liquide est coulé sur le moule maître, puis une étape de rotation à 900 rpm permet d'affiner l'épaisseur du PDMS avant une étape de polymérisation à 80°C. Une fois que le PDMS est complètement polymérisé, les membranes sont démoulées.

Après cette étape, certains des motifs sont encore fermés sur la partie supérieure de la membrane. Un plasma, sur une gravure ionique réactive, vient éroder la surface et ajuster l'épaisseur de la membrane. Ensuite, l'ouverture des pores est contrôlée au microscope électronique (**Figure 28**).

Les membranes microstructurées comportent 625 motifs/mm², sur une surface de 25mm² ; ce qui signifie que chaque membrane est composée 15 625 motifs au total.

c. Résultats

1. Obtention des précurseurs de photorécepteurs à partir d'organoïdes de rétine.

Nous avons importé au laboratoire la méthode de différenciation des CSPhs en organoïdes de rétine (protocole de l'équipe de Dr. Goureau à l'Institut de la Vision). Deux lignées CSPhis (PGP1 et 56c2) et une lignée de CSEhs (RC9) ont été différenciées selon ce protocole. Les rendements en organoïdes de rétine ont été variables d'une lignée à l'autre, la lignée de CSEhs ayant un très faible rendement. Les immunofluorescences réalisées au jour 77 (J77) et au jour 98 montrent que les organoïdes obtenus à partir des lignées CSPhis ont la structuration attendue, avec l'expression des protéines CRX et RECOVERINE en périphérie de ceux-ci (**Figure 29**) (données préliminaires).

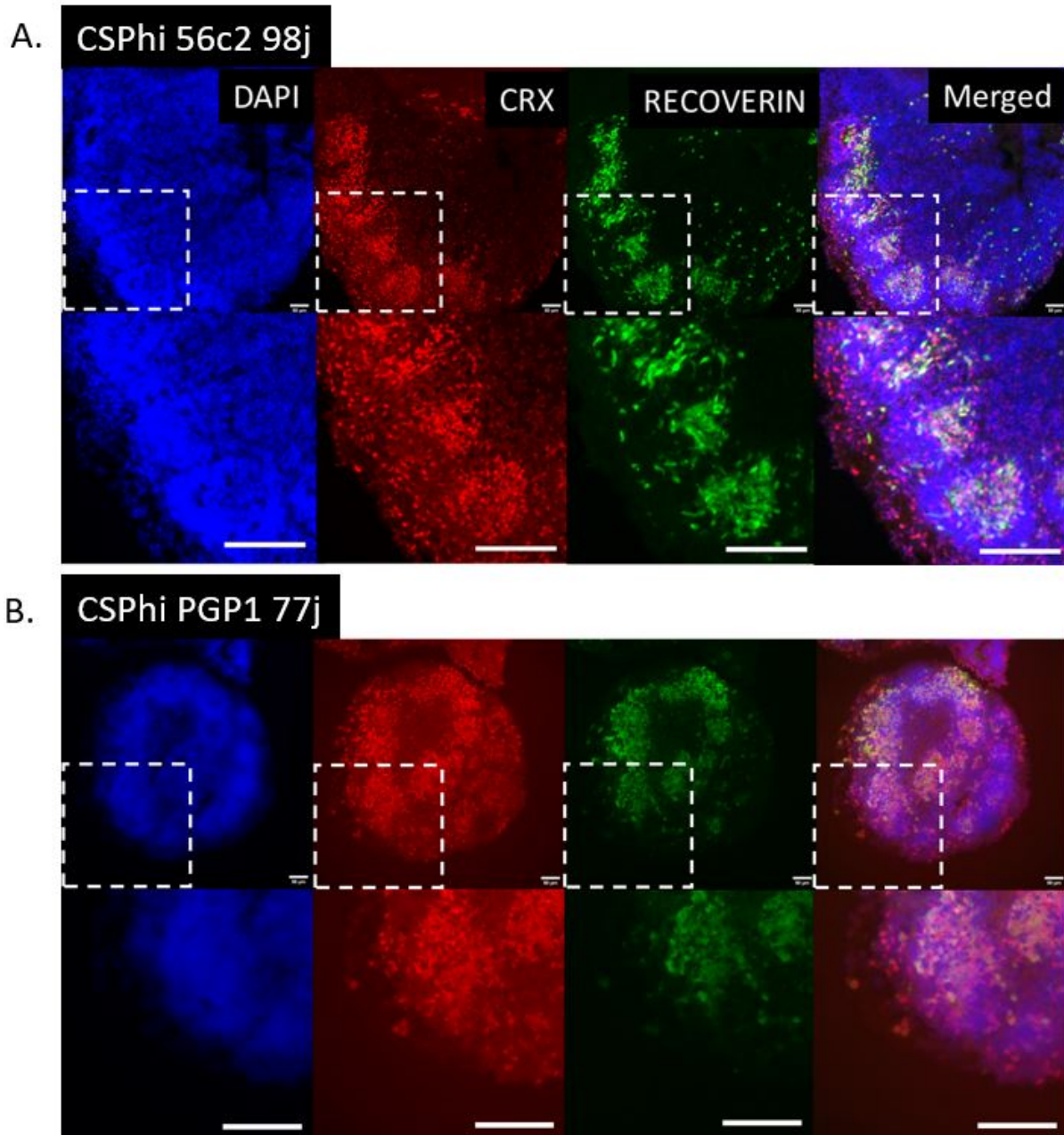


Figure 29 : Formation des organoïdes de rétine au cours du temps. Les images représentent des immunofluorescences réalisées à 77 et à 98 jours de différenciation sur des coupes d'organoïdes. La barre d'échelle est de 50 μ m. A. Immunofluorescences d'un organoïde différencié durant 98 jours à partir de

la lignée de CSPhis 56c2, les protéines CRX et RECOVERINE sont marquées et présentes. B. Immunofluorescences d'un organoïde différencié durant 77 jours à partir de la lignée de CSPhis PGP1, les protéines CRX et RECOVERINE sont marquées et présentes.

2. Production des membranes microstructurées

Pour créer un tissu rétinien, nous avons imaginé plusieurs designs de membranes microstructurées en PDMS. Ces membranes sont constituées de pores (pour les contacts cellulaires) d'une hauteur de 80-100 μm (proche de la longueur d'un photorécepteur) et avec une face supérieure assez large pour contenir plusieurs cellules à la fois. A partir de ce schéma directeur, 4 designs de ces pores ont été générés : des cylindres et des cônes simples ou complexes (tripode, hexagone) (**Figure 30**). La densité des pores a été augmentée progressivement sur les différents prototypes de moules maîtres pour atteindre une densité de 625 pores/ mm^2 .

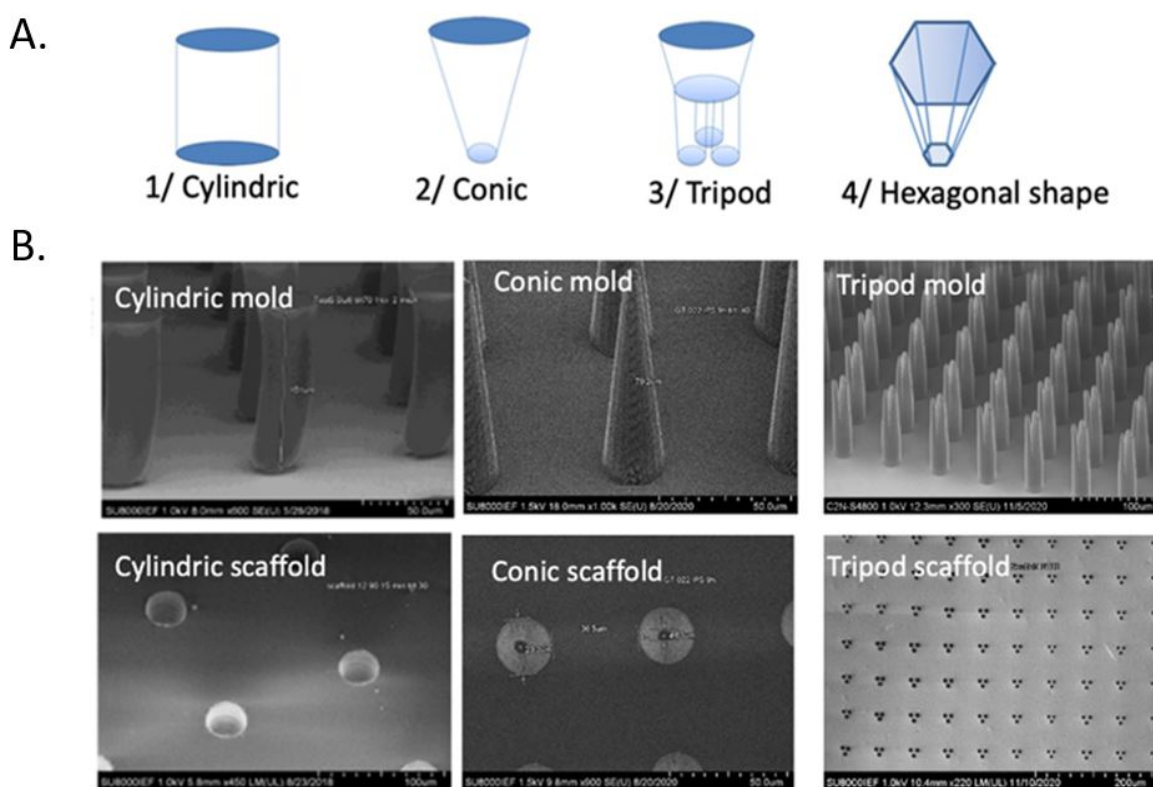


Figure 30 : Les différents motifs des pores des membranes microstructurées obtenus. A. Les différents types de pores des microstructurations élaborés au sein des membranes microstructurées. B. Les images de la première ligne montrent les moules maîtres des membranes microstructurées de type cylindrique, tripode et conique. Les images de la seconde ligne montrent les membranes microstructurées obtenues vues du dessous (où le diamètre des pores est plus resserré).

3. Reconstruction d'un rétine *in vitro*

Pour réaliser le tissu rétinien, nous avons évalué la capacité de progéniteurs rétiens ou de précurseurs de photorécepteurs à se différencier et/ou à maturer en photorécepteurs matures au sein

des pores des membranes microstructurées et au contact d'un épithélium EPR au préalable reformé (**Figure 31**).

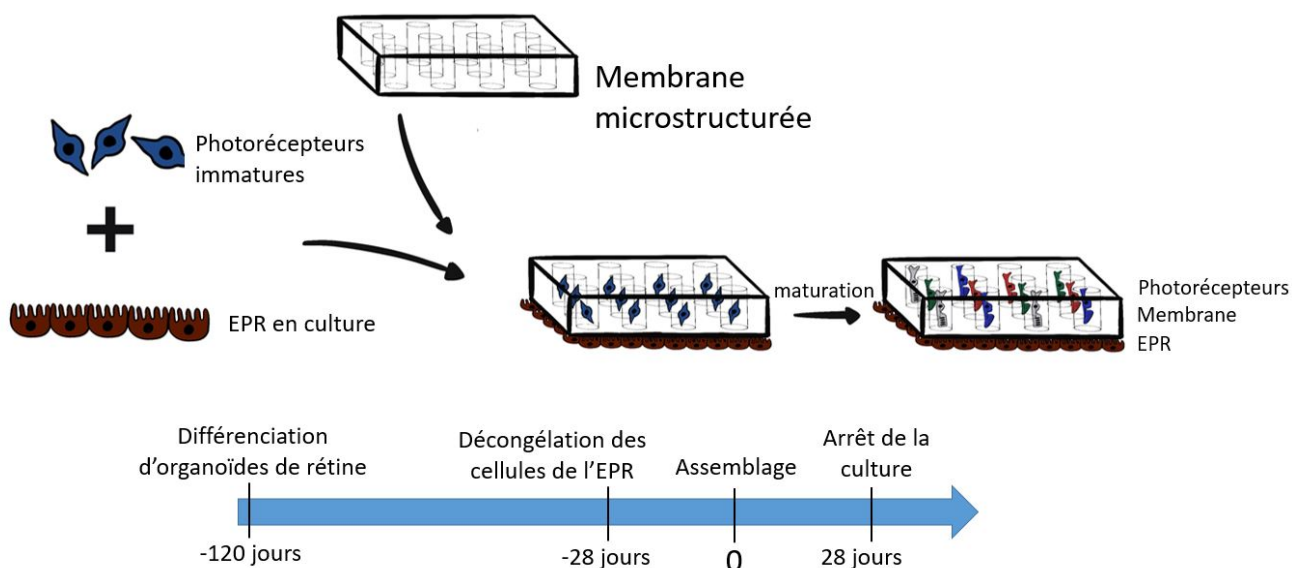


Figure 31 : La méthode expérimentale menant à la construction du tissu rétinien complexe. Les cellules rétiniennes sontensemencées dans la membrane microstructurée de PDMS placée au-dessus de l'EPR. Ensuite, un temps supplémentaire de 28 jours ou de 3 mois permet la maturation des photorécepteurs ensemencés à l'intérieur de la membrane.

Les progéniteurs rétiniens à J21 (cf. protocole décrit **section III. 2. c.**) ensemencés sur les membranes microstructurées au dessus de l'épithélium EPR ont mûri pendant 3 mois et ont été capables de former des extensions RECOVERINE à l'intérieur de membranes microstructurées (**Figure 32**) (données préliminaires).

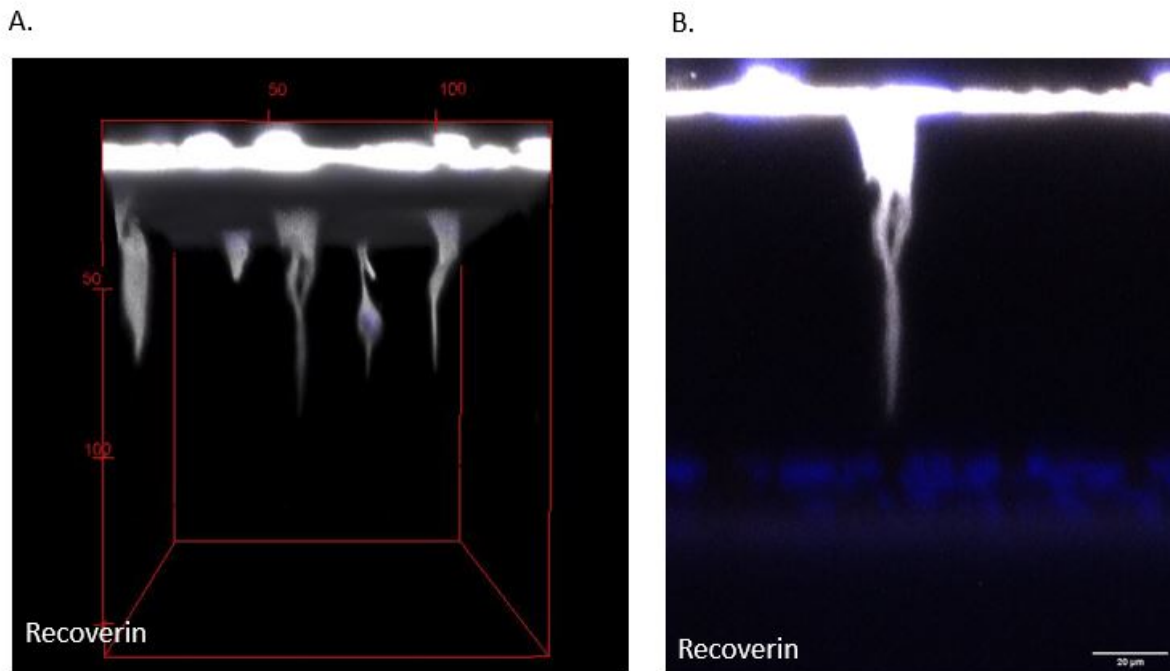


Figure 32 : Analyse du marqueur protéique RECOVERINE sur la rétine reconstruite in vitro. Les progéniteurs rétiniens ont été cultivés durant 21 jours sous forme d'une culture adhérente avant d'être ensemencés sur une membrane microstructurée de type cylindrique de PDMS durant 3 mois. Au total, les cellules rétiniennes ensemencées ont 111 jours de différenciation. La membrane a des pores coniques. A. Vue sur le côté de l'expression de la RECOVERINE à l'intérieur de plusieurs motifs. B. Vue sur le côté de l'expression RECOVERINE à l'intérieur d'un seul motif. Expression de DAPI dans l'EPR sous l'expression de la RECOVERINE.

Afin de pallier aux variabilités de notre protocole développé dans la partie précédente, nous avons produit des cellules rétiniennes via la formation d'organoïdes de rétine. A J120, les organoïdes contiennent un maximum de 70% précurseurs de photorécepteurs prêts à être transplantés (Gagliardi et al. 2018). Les organoïdes ont donc été dissociés à ce stade de J120 et ensemencés sur des membranes microstructurées au contact d'un épithélium EPR. Après 1 mois de culture, la comparaison des différents designs de pores a montré que la forme cylindrique ne retient pas les cellules sur la face supérieure contrairement aux formes coniques (hexagone, cône simple et tripode) (**Figure 33**). Tous les designs de pores permettent la survie des cellules ensemencées (**Figure 33**). Le nombre de cellules retrouvé dans les pores des différentes membranes oscille entre 2 et 6 cellules (**Figure 34**). Parmi les cellules présentes dans un pore, en moyenne, une seule est un photorécepteur immature (CRX+).

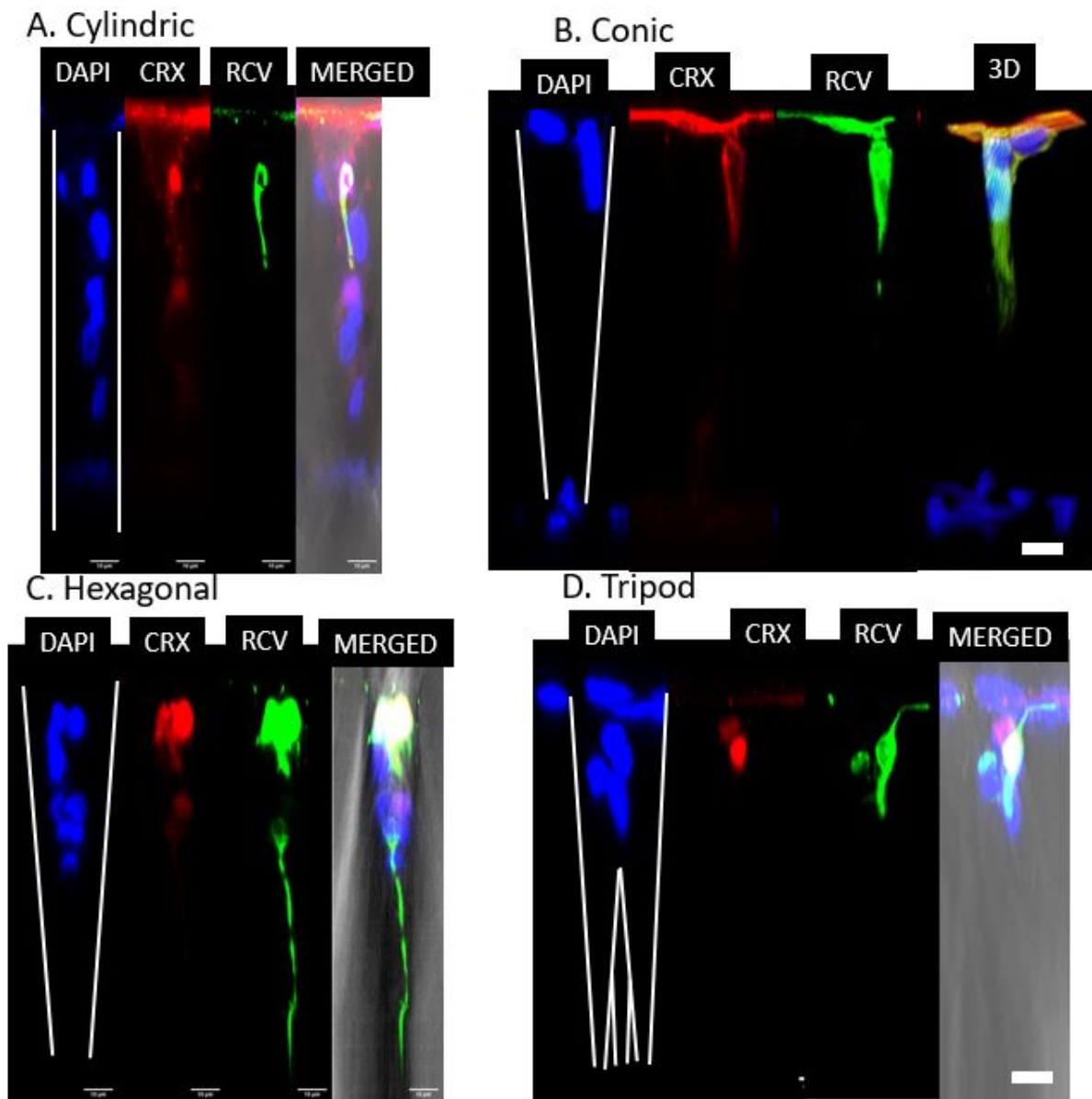


Figure 33 : Maturation des photorécepteurs à l'intérieur des différentes membranes microstructurées. La durée totale des expériences est de 148 jours (120 jours sous forme d'organoides + 28 jours à l'intérieur de la membrane). Maturation des cellules dans une membrane avec les pores de type cylindrique (A), conique (B), hexagonal (C), tripode (D). La barre d'échelle est de 10 μm . RCV : RECOVERINE

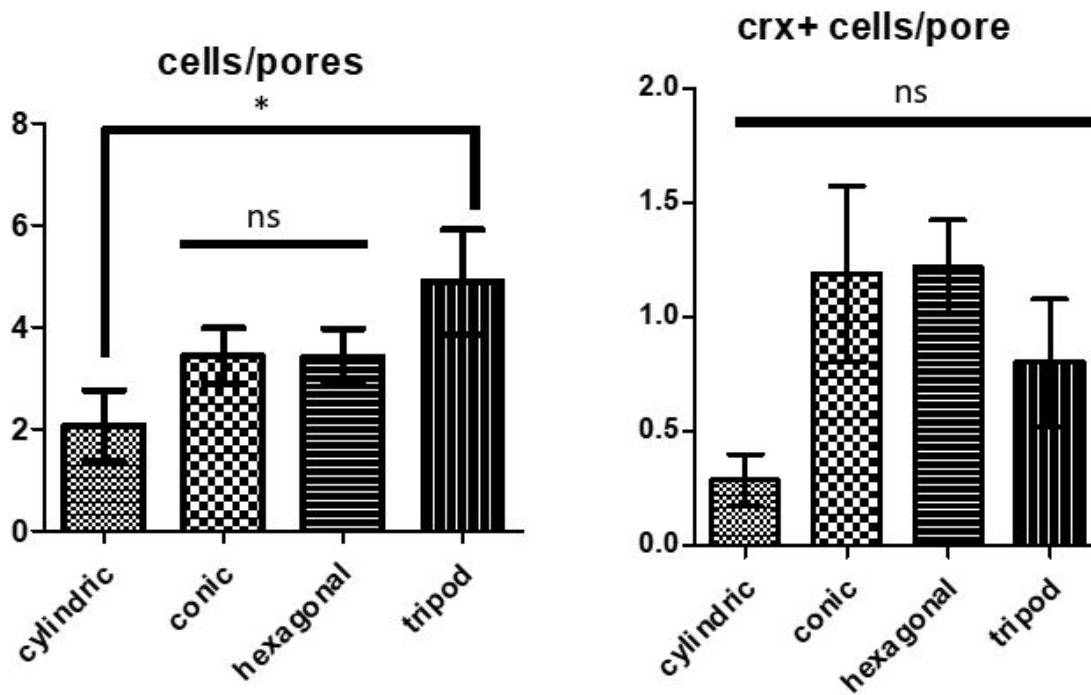


Figure 34 : Occupation cellulaire des pores des différentes membranes microstructurées. A. Nombre de cellules par pore dans les différents motifs des membranes microstructurées. B. Nombre de photorécepteurs immatures (CRX+) contenus par pore dans les différents motifs des membranes microstructurées.

Toutes les formes de pores permettent la croissance d'extensions des photorécepteurs exprimant la protéine RECOVERINE (Figure 33). Les photorécepteurs émettent ces extensions en direction des cellules EPR (l'EPR n'est pas visible sur les images d'immunofluorescence à cause de la profondeur du champ lors de l'acquisition). La forme tripode permet d'augmenter la surface de contact vers les cellules EPR, ceci se vérifie par l'occupation des extensions de photorécepteurs dans les 3 pieds sur ce motif (Figure 35). Les cellules issues d'organoïdes n'étant pas triées, il reste encore un nombre important de cellules qui n'expriment ni CRX ni RECOVERINE (Figure 33).

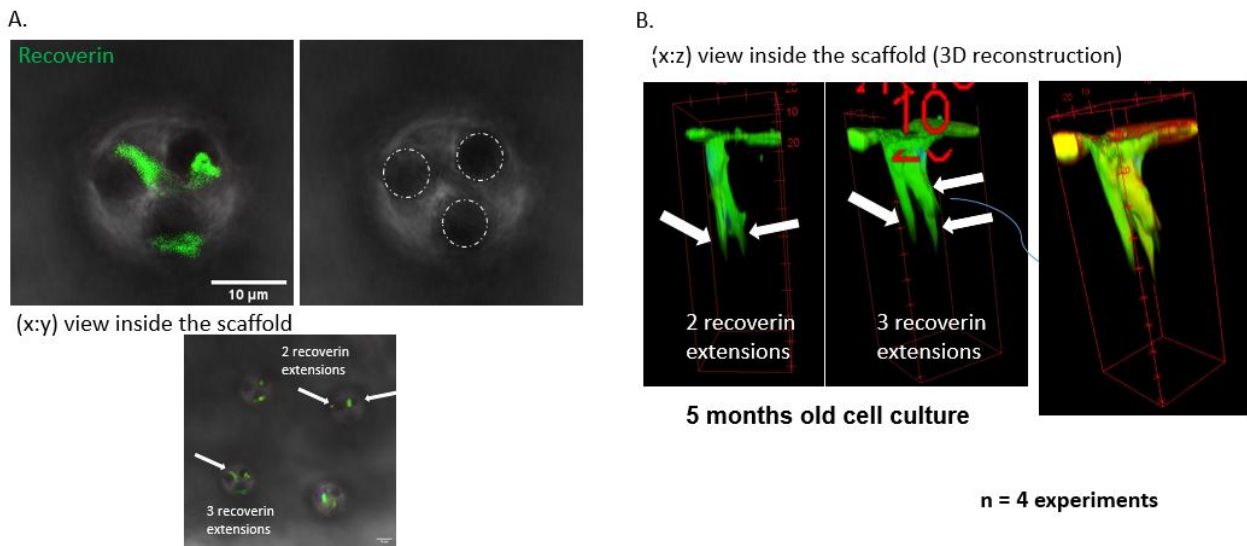


Figure 35 : Expression protéique de la protéine RECOVERINE au sein du motif tripode. A. Vue sur le dessus d'un motif tripode d'une membrane microstructurée. Chaque pied du motif tripode est visible en lumière blanche. Plusieurs extensions sont marquées par l'expression de la protéine RECOVERINE. Les extensions RECOVERINE sont présentes dans au moins deux des pieds du motif tripode. Sur l'image avec la vue sur le côté, l'expression de la RECOVERINE montre que plusieurs cellules sont capables de mûrir et créer des extensions RECOVERINE à l'intérieur de la membrane microstructurée de type tripode.

d. Discussion

Dans cette étude, nous avons élaboré plusieurs membranes microstructurées permettant le développement et la polarisation des photorécepteurs. Sur ces membranes, nous avonsensemencé des cellules photoréceptrices avec plusieurs degrés de maturité. Les cellulesensemencées sur les membranes *in vitro* ont été capables de murer et de former des extensions RECOVERINE au contact de l'épithélium EPR.

1. Les motifs des membranes microstructurées

Les différents modèles de membranes que nous avons créés présentent des avantages et des inconvénients (**Table 9**). La membrane avec les motifs cylindriques a été créée afin de permettre l'adhérence des cellules rétiniennes à l'intérieur de ses motifs, et d'induire le développement de la morphologie polarisée des photorécepteurs. La membrane de type conique, développée en seconde intention, aurait l'avantage de mieux convenir à la morphologie des photorécepteurs et d'empêcher que les cellulesensemencées ne tombent complètement au fond du motif, ce qui pousserait davantage la polarisation du photorécepteurensemencé, contrairement à la membrane avec le motif cylindrique. Les membranes avec les motifs coniques et cylindriques n'ont pas été créées pour permettre la communication cellulaire des cellules photoréceptrices entre elles. C'est pour cela que nous avons créé la membrane microstructurée avec des motifs en forme de tripode. L'architecture de ces motifs permet l'ensemencement de plusieurs cellules rétiniennes dans un même motif et ses 3 sorties induisent le développement de 3 fois plus de segments externes de photorécepteurs en contact avec l'EPR tout en établissant un contact cellulaire avec les autres cellules photoréceptrices à l'intérieur d'un même motif (**Figure 35**). L'avantage de cette membrane est qu'elle permet d'augmenter sa surface de contact avec l'EPR par 3 par rapport aux autres membranes. La membrane, avec le motif hexagonal, n'est pas optimisée mais la forme hexagonale des motifs a été pensée pour pouvoir réduire le plus possible l'espacement entre les motifs et créer une structure en nid-d'abeilles. Mais pour le moment notre technologie ne nous permet pas de réaliser de telles membranes.

Membrane microstructurée	Cylindrique	Conique	Tripode	Hexagonale
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> Les cellules rétinienne adhèrent à la membrane Les cellules migrent à l'intérieur des pores Les pores permettent le développement de la morphologie attendue d'un photorécepteur 	<ul style="list-style-type: none"> La forme conique convient mieux à la morphologie des photorécepteurs Cette forme permet d'éviter que les corps cellulaires ne tombent au fond du motif. Ce type de membrane est brevetable. 	<ul style="list-style-type: none"> La forme tripode permet d'ensemencer plusieurs photorécepteurs à l'intérieur d'un même motif. Les cellules d'un même motif peuvent communiquer entre elles. Ce type de membrane est brevetable. 	<ul style="list-style-type: none"> Sous investigation Permet de réduire l'espace entre les motifs. Cette forme permet d'éviter que les corps cellulaires ne tombent au fond du motif. Ce type de membrane est brevetable.
Désavantages	<ul style="list-style-type: none"> Certaines cellules tombent au fond du motif, ce qui ne permet plus la polarisation des photorécepteurs 	<ul style="list-style-type: none"> La communication cellulaire entre les photorécepteurs ensemencés n'est pas possible 	<ul style="list-style-type: none"> Les motifs sont loin les uns des autres. 	<ul style="list-style-type: none"> Ne permet pas la communication cellulaire entre les photorécepteurs ensemencés

Table 9 : Les avantages et les inconvénients des différentes membranes microstructurées élaborées.

2. La densité cellulaire ensemencée

De nombreuses extensions RECOVERINE ont été imagées et documentées dans les différents motifs des membranes microstructurées et plus particulièrement dans celles comportant les pores en forme de tripode. Les membranes microstructurées de types cylindriques, coniques, tripodes et hexagonales ont une densité de 625 pores/mm². En moyenne, dans les membranes avec les pores en forme de tripode, il y a 4,9 cellules, ce qui permettrait le développement de $625 \times 4,9 = 3\,062,5$ cellules/mm².

En terme de comparaison, l'étude de Jung et ses collaborateurs permet le développement de 5 120 cellules/mm² dans la membrane en forme de verre de vin et dans l'étude de Lee et ses collaborateurs, la membrane en forme de bac à glaçons peut contenir jusqu'à 17 400 cellules/mm² (Jung et al. 2018; Lee et al. 2021). Dans la rétine humaine, la densité de cônes est de 125 500 cônes/mm² au niveau de la fovéola, et cette densité décroît à 6 000 cônes/mm² soit en périphérie de la rétine (J. B. Jonas, Schneider, et Naumann 1992a). La densité des bâtonnets est à son maximum à 150 000 bâtonnets/mm², et cette densité décroît à 30 000 - 40 000 bâtonnets/mm² en périphérie de la rétine (J. B. Jonas, Schneider, et Naumann 1992b). Ainsi, nous pouvons constater que notre membrane permet d'ensemencer une densité de photorécepteurs largement inférieure à celle nécessaire pour retrouver une acuité visuelle maximale (soit environ 1 photorécepteur sur 20 ou 66 par rapport à ce qui est retrouvé dans la macula humaine en bonne santé (Lee et al. 2021)). Cependant, cette densité cellulaire au sein des pores peut être améliorée, car nous avons testé qu'une seule densité cellulaire de 500 000 cellules ensemencées/membrane. Nous pourrions ensemencer 1, 2, ou 4 millions de cellules/membrane, car beaucoup de pores sont vides ou peu remplis avec la densité actuellement utilisée. A titre d'exemple, Lee et ses collaborateurs ont testé des densités d'ensemencement jusqu'à 7 millions de cellules (Lee et al. 2021).

3. Le rendement en cellules photoréceptrices

Lorsque nous avons ensemencé des cellules issues d'organoïdes de rétine après 120 jours de différenciation, la plupart des cellules présentes dans les motifs des membranes n'étaient pas des photorécepteurs (pas d'expression de la protéine CRX dans environ 75% des cellules, contrairement à ce qui est mentionné dans l'étude de (Gagliardi et al. 2018))(Figures 33 et 34). Plusieurs hypothèses peuvent être formulées : soit les lignées que nous avons utilisées pour générer les organoïdes sont moins efficaces que celles utilisées dans l'étude de Gagliardi et ses collaborateurs, soit les cellules d'intérêt meurent sur le scaffold, soit les autres cellules contenues dans l'organoïde prolifèrent au détriment des cellules photoréceptrices. Pour les expériences à venir, il faudrait optimiser le rendement de photorécepteurs à ensemencer et réaliser une étape de purification en cytométrie en flux des organoïdes dissociés à l'aide du marqueur CD-73 présent sur les cellules photoréceptrices (Gagliardi et al. 2018). Ensemencer une suspension de photorécepteurs immatures pure pourrait aussi permettre d'augmenter le nombre d'extensions RECOVERINE à l'intérieur des membranes. A moins que ce cocktail de cellules rétinienne (issu de la dissociation des organoïdes) ne représente pas finalement un avantage en terme de différenciation rétinienne car les autres cellules rétinienne relarguent des substances qui pourraient s'avérer nécessaire à la maturation des photorécepteurs.

4. La maturation des photorécepteurs

Dans cette étude, nous avons obtenu des extensions RECOVERINE après 4 mois de maturation (3 semaines sous forme de cultures adhérentes et 3 mois sur la membrane) et après 5 mois de maturation (4 mois sous forme d'organoïde et 1 mois sur la membrane). Si nous voulons obtenir des photorécepteurs plus matures au sein des membranes microstructurées (expression polarisée de OPSINE et de RHODOPSINE), nous devrions à l'avenir faire murer les cellules plus longtemps sur la membrane, car nous savons que *in vivo* les photorécepteurs finissent de murer dans les mois qui suivent la naissance (O'Hara-Wright et Gonzalez-Cordero 2020). Nous ne savons pas si les photorécepteurs qui se développent dans les membranes ont une orientation correcte. Lorsque nous dissociions les cellules au moment de l'ensemencement sur les membranes, elles pourraient ne pas s'orienter correctement dans les pores. Pour cela, nous devons nous assurer de l'orientation polarisée des protéines OPSINE et RHODOPSINE qui doivent être contenues dans le segment externe des photorécepteurs.

IV. Discussion générale

Au cours de ma thèse, j'ai effectué la caractérisation bio-mécanique de différents épithéliums EPR dérivés de CSPhs et j'ai émis l'hypothèse que l'AFM pourrait fournir un contrôle qualité, rapide et fiable de l'EPR avant une transplantation. Puis, j'ai essayé de développer un protocole de différenciation sous forme d'une culture adhérente permettant l'obtention de photorécepteurs. Ce protocole n'est pas encore abouti mais j'ai obtenu une population cellulaire enrichie en progéniteurs rétiniens. Enfin, nous avons élaboré une stratégie pour reconstruire un tissu rétinien composé de l'épithélium EPR, de photorécepteurs et d'une membrane microstructurée.

1 Les contrôles qualité dans le cadre de la transplantation rétinienne

Les premières cellules de l'EPR dérivées de CSPhs ont été greffées en 2012 chez l'homme (S. H. Schwartz et al. 2012). Ces premiers essais cliniques ont permis de démontrer que les cellules dérivées de CSPhs sont sûres et n'induisent pas de cancer. Cependant, les contrôles qualité, mis en œuvre, sont coûteux et longs, ils limitent un développement à grande échelle de ce type de produit de thérapie cellulaire. Seul un épithélium EPR fonctionnel doit être transplanté (dans le cadre d'une formulation en feuillet cellulaire), et cette validation de la fonctionnalité est souvent effectuée avec des techniques de biologie cellulaire et moléculaire (Mandai et al. 2017). Celles-ci ont l'inconvénient d'être longues, fastidieuses. Au cours de ma thèse, j'ai analysé pour la première fois les propriétés mécaniques des cellules EPR issues de CSPhs. Ces propriétés mécaniques et morphologiques donnent des informations additionnelles sur le statut des cellules. J'ai montré qu'elles fournissaient des informations rapides et complémentaires aux analyses biologiques. Cette technique pourrait être adaptée à l'analyse des épithéliums EPR destinés à être transplantés (Matsuoka et al. 2013; Sasaki et al. 2014). En effet, les données biomécaniques ainsi collectées à l'aide de l'AFM nous ont permis d'obtenir un profil mécanique, type à respecter, pour certifier un EPR de qualité.

Ce type d'approche est déjà utilisé en médecine et notamment dans la recherche et le diagnostic des cancers. En effet, les cellules cancéreuses subissent une série de modifications du cytosquelette et de ses propriétés d'adhérences. Les propriétés mécaniques des cellules cancéreuses vivantes peuvent être collectées à l'aide de l'AFM et aident à déterminer les propriétés intrinsèques des cellules cancéreuses, mais aussi à la découverte de nouvelles molécules anti-cancéreuses (Deng et al. 2018).

D'autres équipes ont développé des approches prometteuses de contrôle qualité sur des épithéliums EPR en s'appuyant sur l'intelligence artificielle (IA). Dans l'étude de Ye et de ses collaborateurs, les auteurs ont développé une approche basée sur l'IA permettant de prédire les valeurs de TEER sur des feuillets EPR à partir d'images de microscopie ne nécessitant aucun marquage additionnel. Cette méthode se montre efficace et reproductible pour distinguer les épithéliums EPR de basse qualité (faible TEER) comparés à ceux pouvant être utilisés pour une transplantation (Ye et al. 2020). Dans l'étude de Ortolan et de ses collaborateurs, les auteurs ont développé une carte morphométrique complète de l'EPR à l'aide d'un logiciel couplé à une IA. Cette approche a mis en lumière la présence de 5 sous-populations cellulaires de l'EPR, mais aussi de révéler les différentes vulnérabilités de celles-ci lorsqu'elles sont impliquées dans des dégénérescences rétiniennes (Ortolan et al. 2022). Les contrôles qualité utilisant l'IA ont l'avantage de ne pas être invasifs, d'être rapides et de ne pas

compromettre la stérilité de l'échantillon. Notre approche consistant à évaluer les propriétés biomécaniques pourrait permettre de mesurer un état général des cellules (stress subléthal) que ne permettent pas les analyses morphométriques par IA. De plus, les paramètres topographiques acquis par AFM permettent d'obtenir des données plus fines pour visualiser la présence de microvilli (essentiels dans l'interaction des cellules EPR avec les photorécepteurs).

2 La différenciation pure des types cellulaires de la rétine reste un challenge

Après le succès de la différenciation des cellules de l'EPR à partir de CSPhs en des cultures pures compatibles avec la clinique, un des nouveaux challenges de la thérapie cellulaire rétinienne est de réussir à différencier les autres types cellulaires de la rétine ayant dégénéré, aux stades les plus tardifs, des dégénérescences rétiniennes ou encore qui sont atteints dans d'autres maladies dégénératives de l'œil, comme les cellules ganglionnaires, la choroïde, les cellules amacrines... Certaines études se sont intéressées à différencier des cellules ganglionnaires, mais ces protocoles ne peuvent pas se passer d'une étape de tri pour générer une quantité suffisante de la population cellulaire d'intérêt (Sluch et al. 2015). La limitation majeure à l'utilisation de cellules ganglionnaires dans la thérapie cellulaire est de réussir à ce que les cellules s'intègrent dans le circuit rétinien avec des axones longs qui se projettent jusqu'au système nerveux central (cf. **partie I.1.f.**) (Erskine et Herrera 2014). Un protocole récent de différenciation des CSPhs a permis de générer des cellules de Müller à partir d'organoïdes de rétine (Couturier et al. 2021). L'intérêt de différencier des cellules de Müller est qu'elles ont divers rôles métaboliques. Elles servent de soutien structurel et nutritionnel aux neurones de la rétine, sécrètent une variété de facteurs trophiques favorisant la survie des neurones et elles participent au transport des nutriments et de l'oxygène aux neurones (Kobat et Turgut 2020; Tworig et Feller 2022). Ces cellules pourraient être intégrées dans de nouvelles générations du tissu rétinien pour évaluer leur effet sur la prise de la greffe ou encore le développement des photorécepteurs. Enfin, la différenciation pure des cellules amacrines depuis des CSPhs n'a jamais été réalisée.

La plupart des types cellulaires rétiniens, et plus particulièrement les photorécepteurs sont obtenus sous forme d'organoïdes. Cependant, afin d'obtenir un type cellulaire pur à partir des organoïdes, une étape de purification par cytométrie en flux est indispensable. En effet, pour une application clinique, il est nécessaire d'obtenir la population cellulaire d'intérêt la plus pure possible, et d'éliminer toute autre population résiduelle ou, du moins, de la réduire au maximum. Des cellules mitotiques résiduelles pourraient engendrer une hyperprolifération dans la rétine hôte, ou bien encore, les cellules bipolaires pourraient compromettre l'intégration des photorécepteurs (Yamasaki et al. 2022). Bien que la stratégie du tri cellulaire soit pertinente, cette méthode se révèle très longue et fastidieuse. Certaines études proposent de trier les cellules d'intérêt sur la base d'un gène rapporteur tel que celui de la GFP (Welby et al. 2017), d'autres suggèrent des étapes de tri cellulaire magnétique avec des anticorps dirigés contre des épitopes de surface (Gagliardi et al. 2018; Lakowski et al. 2018). Cette dernière méthode conduit à l'utilisation de billes magnétiques qui doivent être compatibles avec une application clinique (ce qui n'est pas toujours le cas). Il est à noter que certains protocoles utilisés en essais cliniques passent effectivement par une étape de tri cellulaire magnétique sans qu'aucun effet secondaire n'ait été relevé. C'est ainsi le cas des progéniteurs cardiaques dérivés de CSPhs dans le traitement d'insuffisance cardiaque (Menasché et al. 2018). Il reste cependant préférable d'éviter le plus possible ces approches pour limiter la présence de corps étrangers pouvant engendrer une réaction du système immunitaire de l'hôte. Dans l'idéal, les protocoles utilisés doivent donc permettre de produire de larges populations cellulaires directement pures.

Au cours de ma thèse, j'ai pu produire des progéniteurs rétiniens en quantité avec un degré élevé de pureté. L'absence de protocole pertinent pour orienter la différenciation terminale de ces progéniteurs rétiniens en des photorécepteurs ou en d'autres types cellulaires de la rétine, reste un frein au traitement par thérapie cellulaire. Pour améliorer les protocoles déjà existants ou pour en créer d'autres, il est nécessaire d'établir de nouvelles stratégies pour identifier des facteurs permettant de définir le destin cellulaire des progéniteurs rétiniens *in vitro*, même si ces facteurs n'interviennent pas nécessairement dans le développement embryonnaire de la rétine. Pour cela, un criblage à haut débit sur des progéniteurs rétiniens permettrait de mettre en lumière des composés nouveaux permettant d'orienter le devenir des progéniteurs rétiniens vers des lignages rétiniens variés. Le criblage à haut débit est une approche qui consiste à tester de façon systématique un grand nombre de molécules (chimiothèque couvrant une large variété de structures chimiques) sur des cellules d'intérêt à l'aide d'un système automatisé couplé à un robot (Shabajee et al. 2021). La découverte de nouvelles molécules pourrait également permettre d'améliorer les rendements de certaines différenciations déjà connues ou de produire plus rapidement les cellules d'intérêt, comme cela a déjà été fait dans certaines différenciations neurales (Maury et al. 2015). Même si ce type d'approche est réalisable au sein de notre laboratoire, les criblages nécessitent des étapes importantes de miniaturisation et de développement.

3 Vers une production industrielle des cellules rétinienne

Au cours de ma thèse, nous avons réussi à obtenir des progéniteurs rétiens (VSX2/PAX6) sous forme de cultures adhérentes après 3 semaines de différenciation, sans aucune étape de tri. Nous devons envisager dans un avenir proche d'amplifier ces cellules (sous réserve d'être capable de les différencier en photorécepteurs par la suite). En effet, pour pouvoir cibler la population de patients atteints de RP et de stades avancés de DMLA, il faut une production industrielle des produits de thérapie cellulaire. Une des stratégies qui permettrait d'amplifier ces progéniteurs rétiens est la culture en bioréacteurs. Cette technologie prometteuse pourrait permettre de générer, à grande échelle, les cellules dans un petit espace et avec moins de milieu de culture que lorsque celles-ci sont produites manuellement en boîtes de culture. La culture en bioréacteur a aussi l'avantage d'être applicable à une production automatisée à grande échelle, d'être rapide, en environnement clos (essentiel pour garantir la stérilité finale) et moins coûteuse (Tavassoli et al. 2018). Cette stratégie a déjà permis d'amplifier de nombreux types cellulaires dont des progéniteurs neuronaux humains (issus de télencéphale de fœtus à 10 semaines et cultivés sous forme de neurosphères en suspension) (A. Baghbaderani et al. 2011; Baghbaderani et al. 2008), ainsi que des cellules de l'EPR issues de CSPhs (cultivées sous la forme d'un feuillet monocellulaire sur des microbilles) (Faynus et al. 2022). Les autres stratégies d'amplification cellulaire seraient l'utilisation de robots pour une production de progéniteurs rétiens en 2D à grande échelle. Cette stratégie semble réalisable car elle a été, notamment, mise en œuvre sur des cultures de cellules de l'EPR sous forme adhérente, et a permis de générer plusieurs milliards de cellules en quelques semaines (Matsumoto et al. 2019; Regent et al. 2019; Truong et al. 2021). De plus, l'équipe du professeur Tucker a élaboré une approche automatisée, autologue, permettant de générer des organoïdes de rétine à partir des fibroblastes des patients (Bohrer et al. 2023). Même si cette approche est très innovante, une approche allogénique semble plus réalisable à grande échelle. Cette étude, même si elle a été réalisée sur des organoïdes, montre que les progéniteurs rétiens peuvent être obtenus de manière automatisée.

Un autre enjeu important est la cryopréservation de ces progéniteurs rétiens pour pouvoir les utiliser à la demande, cela permettrait de fractionner les étapes de différenciation. Créer une banque de progéniteurs rétiens contribuerait à les caractériser et à les valider à l'aide de contrôles qualité appropriés. Réussir à amplifier et à cryopréserver les progéniteurs rétiens permettrait de faciliter de nombreuses applications comme la transplantation cellulaire mais aussi l'utilisation de ces cellules pour la modélisation pathologique ou encore le criblage à haut débit de chimiothèques. Cette approche semble réalisable car des organoïdes de rétine ont déjà été congelés avec succès tout en maintenant leurs caractéristiques phénotypiques après décongélation (Reichman et al. 2017; Rogulska, Havelkova, et Petrenko 2023). Ainsi, les précurseurs de photorécepteurs décongelés au sein des organoïdes maintiennent l'expression de marqueurs de surface tel que le CD-73 utilisé dans des approches de tri cellulaire (Gagliardi et al. 2018; Reichman et al. 2017).

4 Optimisation des membranes microstructurées

Les membranes microstructurées peuvent être améliorées à différents niveaux comme résumé dans le schéma de la **Figure 36**. Nous pourrions réduire d'avantage l'espace entre les motifs pour accroître la densité des photorécepteurs. En effet, l'étude de Pearson et de ses collaborateurs a mis en lumière la nécessité d'un nombre minimal de cellules survivantes dans la rétine pour observer un effet significatif sur l'acuité visuelle de l'animal transplanté (Pearson et al. 2012). Cette observation questionne sur la densité minimale de photorécepteurs pouvant être contenue dans les membranes pour qu'un effet fonctionnel puisse être observé après greffe. Ainsi, il faudra aller à la limite maximale de densité de motifs par unité de surface. Nous avons une contrainte de facteur de forme très élevée (rapport taille des motifs sur la largeur de ceux-ci) qui conduit à la casse des motifs sur le moule maître lorsque la densité est trop élevée. Pour surmonter ces contraintes, d'autres matériaux pour réaliser des moules maîtres plus résistants et peut-être plus élastiques peuvent être envisagés pour limiter la casse de ces motifs lors de l'étape de démoulage de la membrane. On peut envisager également de réduire la hauteur des motifs pour cette fois-ci réduire le facteur de forme. Tout ceci permettrait d'atteindre une densité plus élevée et d'optimiser les chances d'observer un effet thérapeutique *in vivo*.

Un autre point d'amélioration est la biodégradabilité de la membrane. Nous utilisons actuellement un polymère biocompatible mais qui ne se dégradera pas dans la rétine. Les polymères biodégradables (**Partie I. 6. b.**) ont des propriétés qui peuvent être différentes du PDMS utilisé actuellement et nécessiteront donc des développements spécifiques pour reproduire les motifs que nous avons sélectionnés avec une densité suffisante.

Dans notre étude, nos membranes microstructurées ont une épaisseur d'environ 100 μm , ce qui correspond à la hauteur d'un photorécepteur. Plusieurs épaisseurs de membranes pourraient être évaluées. Il sera important de déterminer quelle est l'épaisseur la plus favorable au développement et à la maturation des photorécepteurs *in vitro* mais aussi quelle est celle qui permettrait la meilleure intégration des photorécepteurs au sein de la rétine hôte *in vivo*.

Afin de faciliter la différenciation terminale des photorécepteurs, des protéines et des vésicules extracellulaires (petites vésicules entourées de membrane contenant ARN, ADN, protéines et lipides) pourraient être incluses dans la membrane microstructurée et libérées au fur et à mesure de sa dégradation. Sachant que l'objectif est de greffer des photorécepteurs immatures dans les rétines atrophiques adultes, l'ajout de ces facteurs dans les membranes, apparaît comme une nécessité. En effet, l'apport de substances exogènes libérées par la membrane pourrait avoir l'avantage de moduler l'environnement défavorable dans lequel le tissu rétinien va être greffé (drusen, facteurs d'inflammation, réaction du système immunitaire et facteurs apoptotiques). En effet, dans une rétine atrophique, beaucoup de molécules inflammatoires sont sécrétées par l'EPR dysfonctionnel, comme la cytokine IFN- γ connue pour promouvoir l'expression de PD-L1 (B7-H1), du CMH de classe I et II, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL2, les facteurs du complément (C3, C5, facteur B), et ICAM. Il est également important de considérer que la barrière hémato-rétinienne est aussi souvent dégradée, conduisant à la rupture du caractère immunoprivilégié de l'œil (Sugita et al. 2021). Ainsi, le feuillet rétinien, une fois greffé, a de fortes chances d'être affecté par cet environnement défavorable. L'apport de molécules exogènes (exerçant un effet paracrine) répondant à ces problématiques au sein de la

membrane, permettrait donc une meilleure survie et intégration des cellules nouvellement greffées. Les vésicules extracellulaires peuvent jouer ce rôle, elles peuvent également jouer un effet neuroprotecteur sur les photorécepteurs de l'hôte et sur le microenvironnement rétinien (Ma et al. 2020; Mead et Tomarev 2020). En effet, des vésicules extracellulaires issues de progéniteurs nerveux humains de cerveau de fœtus ont déjà été injectées dans l'espace sous rétinien de rats modélisant la RP. Un mois après l'injection, les rats ont maintenu leur vision et la mort des photorécepteurs a été limitée. De plus, les vésicules ont agi sur l'environnement local de la rétine et réduit l'inflammation (diminution des cytokines pro-inflammatoires et de la microglie) (Bian et al. 2020). De la même manière, des vésicules extracellulaires dérivées de cellules souches mésenchymateuses (CSM) peuvent agir d'une façon équivalente sur des modèles de rongeurs modélisant la forme humide de la DMLA (Yu et al. 2016). Ainsi, ce domaine d'application des vésicules extracellulaires est encore peu exploité et pourrait être combiné aux membranes microstructurées.

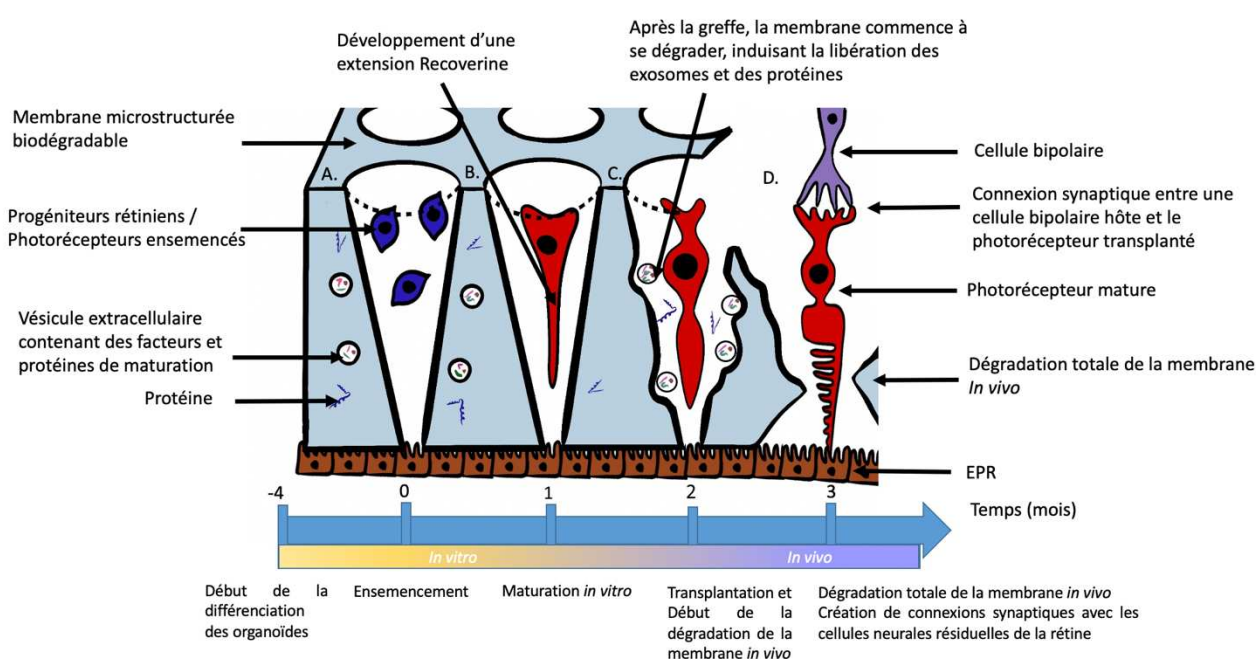


Figure 36 : Evolution de la membrane microstructurée idéale au cours du temps. A. Les photorécepteurs immatures issus d'organoïdes ou de cultures adhérentes sont dissociés et ensemencés dans la membrane microstructurée *in vitro*. B. Les cellules ensemencées disposent de plusieurs mois supplémentaires de maturation afin de développer leur extension RECOVERINE. La polarisation des photorécepteurs débute. C. Après quelques mois de maturation *in vitro*, la membrane est greffée *in vivo*. A ce moment-là, la membrane commence à se dégrader, et les vésicules extracellulaires et protéines contenus dans la membrane sont libérés. Les photorécepteurs contenus à l'intérieur des motifs continuent de mûrir. D. Quelques mois après la greffe du tissu rétinien, la membrane s'est complètement dégradée, les photorécepteurs greffés ont reformé des synapses avec les cellules bipolaires de la rétine hôte.

Bien que cette stratégie soit prometteuse, elle ne couvre qu'une petite partie de la rétine dans la macula. Les membranes pourraient être agrandies, mais la plus grande limitation réside dans la transplantation. Comment pourrions nous transplanter de larges tissus sans compromettre la santé

du patient ? Les techniques de transplantation devront être optimisées pour que de plus grands tissus rétiniens puissent être transplantés afin de restaurer le plus grand champ visuel possible.

5 La bioimpression : une autre piste pour la médecine régénérative

La bioimpression est une méthode de création de structures cellulaires dans un espace confiné à l'aide de techniques d'impression 3D. La bioimpression 3D dépose, couche après couche, des matériaux afin de créer des structures similaires à des tissus biologiques. Les cellules sont ensuite déposées, une par une, pour former des couches successives. Ensemble, avec le matériau formé et les cellules déposées, ils constitueront un tissu biologique en 3D (Yeong et Chua 2014). Avec cette technique émergente, des tissus oculaires pourraient être fabriqués sur mesure, de manière automatisée, en incorporant différents types de cellules et de biomatériaux ayant des propriétés similaires aux membranes microstructurées (Ruiz-Alonso et al. 2021). Les principaux biomatériaux utilisés comme polymères sont le collagène, la gélatine, l'alginate ou l'acide hyaluronique, connus pour être similaires à la matrice extracellulaire (Gopinathan et Noh 2018).

La bioimpression est une technique qui paraît intéressante pour le futur de la médecine régénérative même si pour le moment elle n'en est qu'à son commencement, car elle permettrait de déposer chaque cellule de manière polarisée dans un ordre précis. Cette technique a fait ses preuves pour produire de la peau (cette méthode pourrait être envisagée pour produire des greffes de peau dans le cadre d'essais cliniques), elle est déjà utilisée dans l'industrie cosmétique (Loai et al. 2019). La rétine a l'avantage de présenter une structure stratifiée, ce qui facilite l'utilisation de la bioimpression. De cette manière, nous pourrions recréer un arrangement tissulaire en mosaïque avec des bâtonnets entre les cônes, comme décrit dans la publication de (Viets et al. 2016). De plus, les cellules peuvent être incorporées en différentes couches : les cellules de l'EPR, les cellules bipolaires et les autres types cellulaires de la rétine pourraient aussi être ajoutés en couches successives avec les photorécepteurs. Avec cette technique, le nombre de cellules requis peut être incorporé avec une orientation et polarisation correctes dans le tissu (Shi et al. 2017), ce qui sous-entend que nous pourrions aussiensemencer des photorécepteurs plus matures exprimant par exemple la protéine RECOVERINE. Dans ce contexte, la bioimpression 3D pourrait être une alternative intéressante pour l'automatisation et la production à large échelle de la médecine régénérative rétinienne. Cependant, cette technologie n'en est qu'à ses prémices et une importante limitation est la résolution de 10-20 μm , ce qui rend le dépôt des gouttes de bio-encre imprécis et cette technologie n'est pas encore adaptée à une application micrométrique.

6 Vers la preuve de concept de fonctionnalité *in vivo*

Malgré le développement par plusieurs équipes de recherche, de plusieurs membranes microstructurées différentes, capables de contenir des photorécepteurs, aucune preuve de concept démontrant la fonctionnalité sur l'animal n'a été obtenue à ce jour. Au préalable, il sera nécessaire de définir le stade de maturation du greffon qui permet la meilleure intégration dans la rétine hôte (établissement de synapses avec les neurones de second ordre de la rétine). La première étude qui a soulevé cette hypothèse est celle de Maclaren et de ses collaborateurs, où des photorécepteurs de souris issus de différents stades de maturation (embryonnaires E11, post natales à J3-5 et adultes) ont été greffés sur des souris atteintes d'une dégénérescence rétinienne. Les auteurs ont observé que les photorécepteurs adultes et les progéniteurs rétiens issus de rétine d'embryon de souris ne s'intègrent pas à la rétine hôte contrairement aux photorécepteurs immatures post mitotiques issus de souriceaux âgés de 3 à 5 jours (Maclaren et al. 2006). Dans l'étude de Shirai et de ses collaborateurs, les auteurs ont greffé des morceaux d'organoïdes de rétine issus de CSpH à différents stades de maturation sur des rats nus et sur des rats avec une mutation sur la Rhodopsine (à un stade de dégénérescence avancé). Les auteurs ont ainsi montré que les photorécepteurs contenus dans des morceaux d'organoïdes transplantés à J50-60 étaient plus nombreux environ 6 mois post-greffe que ceux issus d'organoïdes plus âgés (J100) (Shirai et Mandai 2016). A l'inverse, une autre étude suggère que les cônes isolés d'organoïdes âgés de 250 jours s'intègrent mieux dans l'espace sous-rétinien que les cônes isolés d'organoïdes âgés de 200 jours (expressions protéiques de la RECOVERINE, ARRESTINE, PERIPHERIN et de OPSINE) (Gasparini et al. 2022). Ainsi, il semble que la formulation (morceaux d'organoïdes ou suspension cellulaire) ait un impact sur la nécessité de laisser mûrir les photorécepteurs plus ou moins longtemps. Le degré de maturation d'un greffon donné doit donc être évalué au cas par cas.

V. Conclusion générale

Ce doctorat m'a offert l'opportunité de participer au développement d'une stratégie thérapeutique de thérapie cellulaire pour traiter les dégénérescences rétiniennes. La thérapie cellulaire constitue une des pistes pour le développement de solutions thérapeutiques pour ces maladies. En fonction des maladies, des mutations impliquées, ou encore du stade de progression de la dégénérescence rétinienne, les stratégies thérapeutiques ne sont pas les mêmes. Si les cellules rétiniennes n'ont pas encore complètement dégénéré, il convient d'élaborer des pistes thérapeutiques pour les préserver tant qu'il est encore temps car il est plus simple de réaliser des injections ou de prendre des médicaments que de greffer des cellules. Ces approches peuvent aller de la thérapie génique au développement de thérapies utilisant des dérivés biologiques (cytokines,...). Cependant, pour les patients souffrant de dégénérescences rétiniennes aux stades les plus tardifs, nous ne pouvons pas nous passer d'une approche de thérapie cellulaire ou d'approches utilisant des implants électroniques. Même si les principales limitations de la thérapie cellulaire résident dans la difficulté de générer des cellules d'intérêt, la production à grande échelle, la qualité des cellules, le coût, les conditions de stockage et de transport des tissus sont encore des sujets de perfectionnement pour les années à venir. Aujourd'hui, nous savons déjà comment produire les cellules de l'EPR, même si les applications sur les patients restent encore ponctuées d'embûches. A terme, l'objectif final est de développer tout un arsenal thérapeutique adapté à chacun des stades des maladies dégénératives rétiniennes.

VI. Bibliographie

- A. Baghbaderani, Behnam, Karim Mukhida, Murray Hong, Ivar Mendez, et Leo A. Behie. 2011. « A Review of Bioreactor Protocols for Human Neural Precursor Cell Expansion in Preparation for Clinical Trials ». *Current Stem Cell Research & Therapy* 6(3):229-54. doi: 10.2174/157488811796575378.
- Aboualazadeh, Ebrahim, M. Joseph Phillips, Juliette E. McGregor, David A. DiLoreto, Jennifer M. Strazzeri, Kamal R. Dhakal, Brittany Bateman, Lindsey D. Jager, Kelsy L. Nilles, Sara A. Stuedemann, Allison L. Ludwig, Jennifer J. Hunter, William H. Merigan, David M. Gamm, et David R. Williams. 2020. « Imaging Transplanted Photoreceptors in Living Nonhuman Primates with Single-Cell Resolution ». *Stem Cell Reports* 15(2):482-97. doi: 10.1016/j.stemcr.2020.06.019.
- Age-Related Eye Disease Study 2 Research Group. 2013. « Lutein + Zeaxanthin and Omega-3 Fatty Acids for Age-Related Macular Degeneration: The Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) Randomized Clinical Trial ». *JAMA* 309(19):2005-15. doi: 10.1001/jama.2013.4997.
- Al-Ani, Abdullah, Saud Sunba, Bilal Hafeez, Derek Toms, et Mark Ungrin. 2020. « In Vitro Maturation of Retinal Pigment Epithelium Is Essential for Maintaining High Expression of Key Functional Genes ». *International Journal of Molecular Sciences* 21(17):6066. doi: 10.3390/ijms21176066.
- Al-Kharsan, Hasenin, Rehan M. Hussain, Thomas A. Ciulla, et Pravin U. Dugel. 2019. « Innovative Therapies for Neovascular Age-Related Macular Degeneration ». *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 20(15):1879-91. doi: 10.1080/14656566.2019.1636031.
- Allen, Penelope J. 2021. « Retinal Prostheses: Where to from Here? » *Clinical & Experimental Ophthalmology* 49(5):418-29. doi: 10.1111/ceo.13950.
- Ames, J. B., R. Ishima, T. Tanaka, J. I. Gordon, L. Stryer, et M. Ikura. 1997. « Molecular Mechanics of Calcium-Myristoyl Switches ». *Nature* 389(6647):198-202. doi: 10.1038/38310.
- Amit, M., M. K. Carpenter, M. S. Inokuma, C. P. Chiu, C. P. Harris, M. A. Waknitz, J. Itskovitz-Eldor, et J. A. Thomson. 2000. « Clonally Derived Human Embryonic Stem Cell Lines Maintain Pluripotency and Proliferative Potential for Prolonged Periods of Culture ». *Developmental Biology* 227(2):271-78. doi: 10.1006/dbio.2000.9912.
- An, Steven S., Ben Fabry, Xavier Trepas, Ning Wang, et Jeffrey J. Fredberg. 2006. « Do Biophysical Properties of the Airway Smooth Muscle in Culture Predict Airway Hyperresponsiveness? » *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 35(1):55-64. doi: 10.1165/rcmb.2005-0453OC.
- Annamalai, Balasubramaniam, Nathaniel Parsons, Marwa Belhaj, Carlene Brandon, Jay Potts, et Bärbel Rohrer. 2018. « Encapsulated Cell Technology-Based Delivery of a Complement Inhibitor Reduces Choroidal Neovascularization in a Mouse Model ». *Translational Vision Science & Technology* 7(2):3. doi: 10.1167/tvst.7.2.3.
- Ayton, Lauren N., Nick Barnes, Gislin Dagnelie, Takashi Fujikado, Georges Goetz, Ralf Hornig, Bryan W. Jones, Mahiul M. K. Muqit, Daniel L. Rathbun, Katarina Stingl, James D. Weiland, et Matthew A. Petoe. 2020. « An update on retinal prostheses ». *Clinical neurophysiology: official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 131(6):1383-98. doi: 10.1016/j.clinph.2019.11.029.
- Baghbaderani, Behnam A., Karim Mukhida, Arindom Sen, Murray Hong, Ivar Mendez, et Leo A. Behie. 2008. « Expansion of Human Neural Precursor Cells in Large-Scale Bioreactors for the Treatment of Neurodegenerative Disorders ». *Biotechnology Progress* 24(4):859-70. doi: 10.1021/bp070324s.
- Bainbridge, James W. B., Alexander J. Smith, Susie S. Barker, Scott Robbie, Robert Henderson, Kamaljit Balaggan, Ananth Viswanathan, Graham E. Holder, Andrew Stockman, Nick Tyler, Simon Petersen-Jones, Shomi S. Bhattacharya, Adrian J. Thrasher, Fred W. Fitzke, Barrie J. Carter, Gary S. Rubin, Anthony T. Moore, et Robin R. Ali. 2008. « Effect of Gene Therapy on Visual Function in Leber's Congenital Amaurosis ». *New England Journal of Medicine* 358(21):2231-39. doi: 10.1056/NEJMoa0802268.
- Baranov, Petr, Andrew Michaelson, Joydip Kundu, Rebecca L. Carrier, et Michael Young. 2014. « Interphotoreceptor Matrix-Poly(ϵ -Caprolactone) Composite Scaffolds for Human Photoreceptor Differentiation ». *Journal of Tissue Engineering* 5:2041731414554139. doi: 10.1177/2041731414554139.
- Barber, A. C., C. Hippert, Y. Duran, E. L. West, J. W. B. Bainbridge, K. Warre-Cornish, U. F. O. Luhmann, J. Lakowski, J. C. Sowden, R. R. Ali, et R. A. Pearson. 2013. « Repair of the Degenerate Retina by Photoreceptor Transplantation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(1):354-59. doi: 10.1073/pnas.1212677110.
- Barone, Francesca, Juan Amaral, Irina Bunea, Mitra Farnoodian, Rohan Gupta, Rishabh Gupta, Dara Baker, M. Joseph Phillips, Richard J. Blanch, Arvydas Maminishkis, David M. Gamm, et Kapil Bharti. 2023. « A Versatile Laser-Induced Porcine Model of Outer Retinal and Choroidal Degeneration for Preclinical Testing ». *JCI Insight* 8(11):e157654. doi: 10.1172/jci.insight.157654.
- Barrault, Laetitia, Jacqueline Gide, Tingting Qing, Lea Lesueur, Jorg Tost, Jerome Alexandre Denis, Michel Cailleret, Laetitia Aubry,

- Marc Peschanski, Cécile Martinat, et Sandrine Baghdoyan. 2019. « Expression of MiRNAs from the Imprinted DLK1/DIO3 Locus Signals the Osteogenic Potential of Human Pluripotent Stem Cells ». *Cells* 8(12):1523. doi: 10.3390/cells8121523.
- Barry, Jacqueline, Johan Hyllner, Glyn Stacey, Craig J. Taylor, et Marc Turner. 2015. « Setting Up a Haplobank: Issues and Solutions ». *Current Stem Cell Reports* 1(2):110-17. doi: 10.1007/s40778-015-0011-7.
- Bartsch, Udo, Wasi Oriyakhel, Paul F. Kenna, Stephan Linke, Gisbert Richard, Bettina Petrowitz, Pete Humphries, G. Jane Farrar, et Marius Ader. 2008. « Retinal Cells Integrate into the Outer Nuclear Layer and Differentiate into Mature Photoreceptors after Subretinal Transplantation into Adult Mice ». *Experimental Eye Research* 86(4):691-700. doi: 10.1016/j.exer.2008.01.018.
- Behar-Cohen, Francine, Emmanuelle Gelizé, Laurent Jonet, et Patricia Lassiaz. 2020. « Anatomie de la rétine ». *médecine/sciences* 36(6-7):594-99. doi: 10.1051/medsci/2020094.
- Ben M'Barek, Karim, Stéphane Bertin, Elena Brazhnikova, Céline Jaillard, Walter Habeler, Alexandra Plancheron, Claire-Maëlle Fovet, Joanna Demilly, Mohamed Jarraya, Ana Bejanariu, José-Alain Sahel, Marc Peschanski, Olivier Goureau, et Christelle Monville. 2020. « Clinical-Grade Production and Safe Delivery of Human ESC Derived RPE Sheets in Primates and Rodents ». *Biomaterials* 230:119603. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119603.
- Ben M'Barek, Karim, Walter Habeler, Alexandra Plancheron, Mohamed Jarraya, Olivier Goureau, et Christelle Monville. 2018. « Engineering Transplantation-Suitable Retinal Pigment Epithelium Tissue Derived from Human Embryonic Stem Cells ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE* (139). doi: 10.3791/58216.
- Ben M'Barek, Karim, Walter Habeler, Alexandra Plancheron, Mohamed Jarraya, Florian Regent, Angélique Terray, Ying Yang, Laure Chatrousse, Sophie Domingues, Yolande Masson, José-Alain Sahel, Marc Peschanski, Olivier Goureau, et Christelle Monville. 2017. « Human ESC-Derived Retinal Epithelial Cell Sheets Potentiate Rescue of Photoreceptor Cell Loss in Rats with Retinal Degeneration ». *Science Translational Medicine* 9(421):eaa17471. doi: 10.1126/scitranslmed.aai7471.
- Ben M'Barek, Karim, et Christelle Monville. 2019a. « Cell Therapy for Retinal Dystrophies: From Cell Suspension Formulation to Complex Retinal Tissue Bioengineering ». *Stem Cells International* 2019:4568979. doi: 10.1155/2019/4568979.
- Ben M'Barek, Karim, et Christelle Monville. 2019b. « Cell Therapy for Retinal Dystrophies: From Cell Suspension Formulation to Complex Retinal Tissue Bioengineering ». *Stem Cells International* 2019:1-14. doi: 10.1155/2019/4568979.
- Berger, Adam S., Tongalp H. Tezel, Lucian V. Del Priore, et Henry J. Kaplan. 2003. « Photoreceptor Transplantation in Retinitis Pigmentosa: Short-Term Follow-Up ». *Ophthalmology* 110(2):383-91. doi: 10.1016/S0161-6420(02)01738-4.
- Berninger, T. A., et G. B. Arden. 1988. « The Pattern Electroretinogram ». *Eye* 2(1):S257-83. doi: 10.1038/eye.1988.149.
- Beutel, Julia, Lena Greulich, Matthias Lüke, Focke Ziemssen, Peter Szurman, Karl-Ulrich Bartz-Schmidt, et Salvatore Grisanti. 2007. « Inner Limiting Membrane as Membranous Support in RPE Sheet-Transplantation ». *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht Von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie* 245(10):1469-73. doi: 10.1007/s00417-007-0566-9.
- Bharti, Kapil, Anneke I. den Hollander, Aparna Lakkaraju, Debasish Sinha, David S. Williams, Silvia C. Finnemann, Catherine Bowes-Rickman, Goldis Malek, et Patricia A. D'Amore. 2022. « Cell Culture Models to Study Retinal Pigment Epithelium-Related Pathogenesis in Age-Related Macular Degeneration ». *Experimental Eye Research* 222:109170. doi: 10.1016/j.exer.2022.109170.
- Bi, Anding, Jinjuan Cui, Yu-Ping Ma, Elena Olshevskaya, Mingliang Pu, Alexander M. Dizhoor, et Zhuo-Hua Pan. 2006. « Ectopic Expression of a Microbial-Type Rhodopsin Restores Visual Responses in Mice with Photoreceptor Degeneration ». *Neuron* 50(1):23-33. doi: 10.1016/j.neuron.2006.02.026.
- Bian, Baishijiao, Congjian Zhao, Xiangyu He, Yu Gong, Chung Ren, Lingling Ge, Yuxiao Zeng, Qiyou Li, Min Chen, Chuanhuang Weng, Juncai He, Yajie Fang, Haiwei Xu, et Zheng Qin Yin. 2020. « Exosomes Derived from Neural Progenitor Cells Preserve Photoreceptors during Retinal Degeneration by Inactivating Microglia ». *Journal of Extracellular Vesicles* 9(1):1748931. doi: 10.1080/20013078.2020.1748931.
- Bibb, Carol, et Richard W. Young. 1974. « RENEWAL OF FATTY ACIDS IN THE MEMBRANES OF VISUAL CELL OUTER SEGMENTS ». *Journal of Cell Biology* 61(2):327-43. doi: 10.1083/jcb.61.2.327.
- Binder, Susanne, Boris V. Stanzel, Ilse Krebs, et Carl Glittenberg. 2007. « Transplantation of the RPE in AMD ». *Progress in Retinal and Eye Research* 26(5):516-54. doi: 10.1016/j.preteyeres.2007.02.002.
- Binder, Susanne, Ulrike Stolba, Ilse Krebs, Lukas Kellner, Christian Jahn, Hans Feichtinger, Margit Povelka, Ursula Frohner, Andreas Kruger, Ralf-Dieter Hilgers, et Walter Krugluger. 2002. « Transplantation of Autologous Retinal Pigment Epithelium in Eyes with Foveal Neovascularization Resulting from Age-Related Macular Degeneration: A Pilot Study ». *American Journal of Ophthalmology* 133(2):215-25. doi: 10.1016/s0002-9394(01)01373-3.
- Bloomfield, S. A., et R. F. Dacheux. 2001. « Rod Vision: Pathways and Processing in the Mammalian Retina ». *Progress in Retinal and Eye Research* 20(3):351-84. doi: 10.1016/s1350-9462(00)00031-8.

- Bohrer, Laura R., Nicholas E. Stone, Nathaniel K. Mullin, Andrew P. Voigt, Kristin R. Anfinson, Jessica L. Fick, Viviane Luangphakdy, Bradley Hittle, Kimerly Powell, George F. Muschler, Robert F. Mullins, Edwin M. Stone, et Budd A. Tucker. 2023. « Automating iPSC Generation to Enable Autologous Photoreceptor Cell Replacement Therapy ». *Journal of Translational Medicine* 21(1):161. doi: 10.1186/s12967-023-03966-2.
- Bok, Dean. 1993. « The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision ». *Journal of Cell Science* 1993(Supplement_17):189-95. doi: 10.1242/jcs.1993.Supplement_17.27.
- Bonilha, Vera L., Mary E. Rayborn, Sanjoy K. Bhattacharya, Xiarong Gu, John S. Crabb, John W. Crabb, et Joe G. Hollyfield. 2006. « THE RETINAL PIGMENT EPITHELIUM APICAL MICROVILLI AND RETINAL FUNCTION ». *Advances in experimental medicine and biology* 572:519-24. doi: 10.1007/0-387-32442-9_72.
- Bonilha, Vera Lúcia, Silvia C. Finnemann, et Enrique Rodriguez-Boulan. 1999. « Ezrin Promotes Morphogenesis of Apical Microvilli and Basal Infoldings in Retinal Pigment Epithelium ». *The Journal of Cell Biology* 147(7):1533-48.
- Boulton, M., et P. Dayhaw-Barker. 2001. « The Role of the Retinal Pigment Epithelium: Topographical Variation and Ageing Changes ». *Eye (London, England)* 15(Pt 3):384-89. doi: 10.1038/eye.2001.141.
- Brodie-Kommit, Justin, Brian S. Clark, Qing Shi, Fion Shiau, Dong Won Kim, Jennifer Langel, Catherine Sheely, Philip A. Ruzycski, Michel Fries, Awais Javed, Michel Cayouette, Tiffany Schmidt, Tudor Badea, Tom Glaser, Haiqing Zhao, Joshua Singer, Seth Blackshaw, et Samer Hattar. 2021. « Atoh7-Independent Specification of Retinal Ganglion Cell Identity ». *Science Advances* 7(11):eabe4983. doi: 10.1126/sciadv.abe4983.
- Brown, Connor N., Brian D. Green, Richard B. Thompson, Anneke I. den Hollander, Imre Lengyel, et EYE-RISK consortium. 2018. « Metabolomics and Age-Related Macular Degeneration ». *Metabolites* 9(1):4. doi: 10.3390/metabo9010004.
- Brzezinski, Joseph A., et Thomas A. Reh. 2015. « Photoreceptor cell fate specification in vertebrates ». *Development (Cambridge, England)* 142(19):3263-73. doi: 10.1242/dev.127043.
- Buchholz, David E., Sherry T. Hikita, Teisha J. Rowland, Amy M. Friedrich, Cassidy R. Hinman, Lincoln V. Johnson, et Dennis O. Clegg. 2009. « Derivation of Functional Retinal Pigmented Epithelium from Induced Pluripotent Stem Cells ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 27(10):2427-34. doi: 10.1002/stem.189.
- Buchholz, David E., Britney O. Pennington, Roxanne H. Croze, Cassidy R. Hinman, Peter J. Coffey, et Dennis O. Clegg. 2013. « Rapid and Efficient Directed Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Into Retinal Pigmented Epithelium ». *Stem Cells Translational Medicine* 2(5):384-93. doi: 10.5966/sctm.2012-0163.
- Buenaventura, Diego F., Miruna G. Ghinia-Tegla, et Mark M. Emerson. 2018. « Fate-Restricted Retinal Progenitor Cells Adopt a Molecular Profile and Spatial Position Distinct from Multipotent Progenitor Cells ». *Developmental Biology* 443(1):35-49. doi: 10.1016/j.ydbio.2018.06.023.
- Bunker, C. H., E. L. Berson, W. C. Bromley, R. P. Hayes, et T. H. Roderick. 1984. « Prevalence of Retinitis Pigmentosa in Maine ». *American Journal of Ophthalmology* 97(3):357-65. doi: 10.1016/0002-9394(84)90636-6.
- Burton, Matthew J., Jacqueline Ramke, Ana Patricia Marques, Rupert R. A. Bourne, Nathan Congdon, Iain Jones, Brandon A. M. Ah Tong, Simon Arunga, Damodar Bachani, Covadonga Bascaran, Andrew Bastawrous, Karl Blanchet, Tasanee Braithwaite, John C. Buchan, John Cairns, Anasaini Cama, Margarida Chagunda, Chimgee Chuluunkhuu, Andrew Cooper, Jessica Crofts-Lawrence, William H. Dean, Alastair K. Denniston, Joshua R. Ehrlich, Paul M. Emerson, Jennifer R. Evans, Kevin D. Frick, David S. Friedman, João M. Furtado, Michael M. Gichangi, Stephen Gichuhi, Suzanne S. Gilbert, Reeta Gurung, Esmael Habtamu, Peter Holland, Jost B. Jonas, Pearse A. Keane, Lisa Keay, Rohit C. Khanna, Peng Tee Khaw, Hannah Kuper, Fatima Kyari, Van C. Lansingh, Islay Mactaggart, Milka M. Mafwiri, Wanjiku Mathenge, Ian McCormick, Priya Morjaria, Lizette Mowatt, Debbie Muirhead, Gudlavalleti V. S. Murthy, Nyawira Mwangi, Daksha B. Patel, Tunde Peto, Babar M. Qureshi, Solange R. Salomão, Virginia Sarah, Bernadetha R. Shilio, Anthony W. Solomon, Bonnielin K. Swenor, Hugh R. Taylor, Ningli Wang, Aubrey Webson, Sheila K. West, Tien Yin Wong, Richard Wormald, Sumrana Yasmin, Mayinuer Yusufu, Juan Carlos Silva, Serge Resnikoff, Thulasiraj Ravilla, Clare E. Gilbert, Allen Foster, et Hannah B. Faal. 2021. « The Lancet Global Health Commission on Global Eye Health: Vision beyond 2020 ». *The Lancet. Global Health* 9(4):e489-551. doi: 10.1016/S2214-109X(20)30488-5.
- Busskamp, Volker, Jens Duebel, David Balya, Mathias Fradot, Tim James Viney, Sandra Siegert, Anna C. Groner, Erik Cabuy, Valérie Forster, Mathias Seeliger, Martin Biel, Peter Humphries, Michel Paques, Saddek Mohand-Said, Didier Trono, Karl Deisseroth, José A. Sahel, Serge Picaud, et Botond Roska. 2010. « Genetic Reactivation of Cone Photoreceptors Restores Visual Responses in Retinitis Pigmentosa ». *Science (New York, N.Y.)* 329(5990):413-17. doi: 10.1126/science.1190897.
- Byrne, Leah C., Deniz Dalkara, Gabriel Luna, Steven K. Fisher, Emmanuelle Clérin, Jose-Alain Sahel, Thierry Léveillard, et John G. Flannery. 2015. « Viral-Mediated RdCVF and RdCVFL Expression Protects Cone and Rod Photoreceptors in Retinal Degeneration ». *The Journal of Clinical Investigation* 125(1):105-16. doi: 10.1172/JCI65654.
- Calejo, Maria Teresa, Tanja Ilmarinen, Elina Vuorimaa-Laukkanen, Elina Talvitie, Hanna M. Hakola, Heli Skottman, et Minna Kellomäki. 2017. « Langmuir-Schaefer Film Deposition onto Honeycomb Porous Films for Retinal Tissue Engineering ». *Acta*

Biomaterialia 54:138-49. doi: 10.1016/j.actbio.2017.02.035.

Campbell, Matthew, et Peter Humphries. 2012. « The Blood-Retina Barrier: Tight Junctions and Barrier Modulation ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 763:70-84.

Capeáns, Carmen, Antonio Piñeiro, María Pardo, Catalina Sueiro-López, María José Blanco, Fernando Domínguez, et Manuel Sánchez-Salorio. 2003. « Amniotic Membrane as Support for Human Retinal Pigment Epithelium (RPE) Cell Growth ». *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 81(3):271-77. doi: 10.1034/j.1600-0420.2003.00076.x.

Capowski, Elizabeth E., Kayvan Samimi, Steven J. Mayerl, M. Joseph Phillips, Isabel Pinilla, Sara E. Howden, Jishnu Saha, Alex D. Jansen, Kimberly L. Edwards, Lindsey D. Jager, Katherine Barlow, Rasa Valiauga, Zachary Erlichman, Anna Hagstrom, Divya Sinha, Valentin M. Sluch, Xitiz Chamling, Donald J. Zack, Melissa C. Skala, et David M. Gamm. 2019. « Reproducibility and Staging of 3D Human Retinal Organoids across Multiple Pluripotent Stem Cell Lines ». *Development (Cambridge, England)* 146(1):dev171686. doi: 10.1242/dev.171686.

Carr, Amanda-Jayne, Anthony A. Vugler, Sherry T. Hikita, Jean M. Lawrence, Carlos Gias, Li Li Chen, David E. Buchholz, Ahmad Ahmado, Ma'ayan Semo, Matthew J. K. Smart, Shazeen Hasan, Lyndon da Cruz, Lincoln V. Johnson, Dennis O. Clegg, et Pete J. Coffey. 2009. « Protective Effects of Human IPS-Derived Retinal Pigment Epithelium Cell Transplantation in the Retinal Dystrophic Rat ». *PLOS ONE* 4(12):e8152. doi: 10.1371/journal.pone.0008152.

Castillo, B. V., M. del Cerro, R. M. White, C. Cox, J. Wyatt, G. Nadiga, et C. del Cerro. 1997. « Efficacy of Nonfetal Human RPE for Photoreceptor Rescue: A Study in Dystrophic RCS Rats ». *Experimental Neurology* 146(1):1-9. doi: 10.1006/exnr.1997.6534.

Chaffiol, Antoine, Romain Caplette, Céline Jaillard, Elena Brazhnikova, Mélissa Desrosiers, Elisabeth Dubus, Laëtitia Duhamel, Emilie Macé, Olivier Marre, Patrick Benoit, Philippe Hantraye, Alexis-Pierre Bemelmans, Ernst Bamberg, Jens Duebel, José-Alain Sahel, Serge Picaud, et Deniz Dalkara. 2017. « A New Promoter Allows Optogenetic Vision Restoration with Enhanced Sensitivity in Macaque Retina ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 25(11):2546-60. doi: 10.1016/j.jymthe.2017.07.011.

Chambers, Stuart M., Christopher A. Fasano, Eirini P. Papapetrou, Mark Tomishima, Michel Sadelain, et Lorenz Studer. 2009. « Highly Efficient Neural Conversion of Human ES and IPS Cells by Dual Inhibition of SMAD Signaling ». *Nature Biotechnology* 27(3):275-80. doi: 10.1038/nbt.1529.

Chatterjee, Samrat, Deepshikha Agrawal, Deepanshu Agrawal, Swapnil M. Parchand, et Anupam Sahu. 2021. « Cataract Surgery in Retinitis Pigmentosa ». *Indian Journal of Ophthalmology* 69(7):1753-57. doi: 10.4103/ijo.IJO_2916_20.

Chen, Honglin, Xianqun Fan, Jing Xia, Ping Chen, Xiaojian Zhou, Jin Huang, Jiahui Yu, et Ping Gu. 2011. « Electrospun chitosan-graft-poly (ϵ -caprolactone)/poly (ϵ -caprolactone) nanofibrous scaffolds for retinal tissue engineering ». *International Journal of Nanomedicine* 6:453-61. doi: 10.2147/IJN.S17057.

Cherry, Timothy J., Jeffrey M. Trimarchi, Michael B. Stadler, et Constance L. Cepko. 2009. « Development and Diversification of Retinal Amacrine Interneurons at Single Cell Resolution ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(23):9495. doi: 10.1073/pnas.0903264106.

Choi, Eui-Hwan, Seobin Yoon, Young Eun Koh, Young-Jin Seo, et Keun Pil Kim. 2020. « Maintenance of Genome Integrity and Active Homologous Recombination in Embryonic Stem Cells ». *Experimental & Molecular Medicine* 52(8):1220-29. doi: 10.1038/s12276-020-0481-2.

Choudhary, Parul, Heather Booth, Alex Gutteridge, Beata Surmacz, Irene Louca, Juliette Steer, Julie Kerby, et Paul John Whiting. 2017. « Directing Differentiation of Pluripotent Stem Cells Toward Retinal Pigment Epithelium Lineage ». *Stem Cells Translational Medicine* 6(2):490-501. doi: 10.5966/sctm.2016-0088.

Choy, Siu Wah, et Shuk Han Cheng. 2012. « Hedgehog Signaling ». *Vitamins and Hormones* 88:1-23. doi: 10.1016/B978-0-12-394622-5.00001-8.

Chtcheglova, Lilia A., Andreas Ohlmann, Danila Boytsov, Peter Hinterdorfer, Siegfried G. Priglinger, et Claudia S. Priglinger. 2020. « Nanoscopic Approach to Study the Early Stages of Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) of Human Retinal Pigment Epithelial (RPE) Cells In Vitro ». *Life (Basel, Switzerland)* 10(8):128. doi: 10.3390/life10080128.

Clemons, Traci, Roy Milton, Ronald Klein, Johanna Seddon, et Frederick Ferris. 2005. « Age-Related Eye Disease Study Research Group. Risk factors for the incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS report no. 19 ». *Ophthalmology* 112:533-39. doi: 10.1016/j.ophtha.2004.10.047.

Clérin, Emmanuelle, Myriam Marussig, José-Alain Sahel, et Thierry Lévillard. 2020. « Metabolic and Redox Signaling of the Nucleoredoxin-Like-1 Gene for the Treatment of Genetic Retinal Diseases ». *International Journal of Molecular Sciences* 21(5):1625. doi: 10.3390/ijms21051625.

Costello, F., S. P. Rothenbuehler, P. A. Sibony, S. Hamann, et Optic Disc Drusen Studies Consortium. 2021. « Diagnosing Optic Disc Drusen in the Modern Imaging Era: A Practical Approach ». *Neuro-Ophthalmology (Aeolus Press)* 45(1):1-16. doi: 10.1080/01658107.2020.1810286.

- Couturier, Aude, Guillaume Blot, Lucile Vignaud, Céline Nanteau, Amélie Slembrouck-Brec, Valérie Fradot, Niyazi Acar, José-Alain Sahel, Ramin Tadayoni, Gilles Thuret, Florian Sennlaub, Jerome E. Roger, Olivier Goureau, Xavier Guillonnet, et Sacha Reichman. 2021. « Reproducing Diabetic Retinopathy Features Using Newly Developed Human Induced-Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Müller Glial Cells ». *Glia* 69(7):1679-93. doi: 10.1002/glia.23983.
- Craenen, Kai, Mieke Verslegers, Livine Craeghs, Roel Quintens, Ann Janssen, Amelie Coolkens, Sarah Baatout, Lieve Moons, et Mohammed Abderrafi Benotmane. 2020. « Abnormal Retinal Pigment Epithelium Melanogenesis as a Major Determinant for Radiation-Induced Congenital Eye Defects ». *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)* 91:59-73. doi: 10.1016/j.reprotox.2019.10.002.
- Creuzet, Sophie, et Heather Etchevers. 2017. « Embryologie de l'oeil ». P. 739-56 in *Ophthalmologie pédiatrique : Rapport SFO 2017*, édité par D. Denis, E. Qui Buoc, et A. Aziz Alessi. Elsevier-Masson.
- Crombie, Duncan E., Maciej Daniszewski, Helena H. Liang, Tejal Kulkarni, Fan Li, Grace E. Lidgerwood, Alison Conquest, Damian Hernández, Sandy S. Hung, Katherine P. Gill, Elisabeth De Smit, Lisa S. Kearns, Linda Clarke, Valentin M. Sluch, Xitiz Chamling, Donald J. Zack, Raymond C. B. Wong, Alex W. Hewitt, et Alice Pébay. 2017. « Development of a Modular Automated System for Maintenance and Differentiation of Adherent Human Pluripotent Stem Cells ». *SLAS Discovery* 22(8):1016-25. doi: 10.1177/2472555217696797.
- Croze, Roxanne H., David E. Buchholz, Monte J. Radeke, William J. Thi, Qirui Hu, Peter J. Coffey, et Dennis O. Clegg. 2014. « ROCK Inhibition Extends Passage of Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigmented Epithelium ». *Stem Cells Translational Medicine* 3(9):1066-78. doi: 10.5966/sctm.2014-0079.
- da Cruz, Lyndon, Brian F. Coley, Jessy Dorn, Francesco Merlini, Eugene Filley, Punita Christopher, Fred K. Chen, Varalakshmi Wuyyuru, Jose Sahel, Paulo Stanga, Mark Humayun, Robert J. Greenberg, Gislin Dagnelie, et Argus II Study Group. 2013. « The Argus II Epiretinal Prosthesis System Allows Letter and Word Reading and Long-Term Function in Patients with Profound Vision Loss ». *The British Journal of Ophthalmology* 97(5):632-36. doi: 10.1136/bjophthalmol-2012-301525.
- da Cruz, Lyndon, Kate Fynes, Odysseas Georgiadis, Julie Kerby, Yvonne H. Luo, Ahmad Ahmado, Amanda Vernon, Julie T. Daniels, Britta Nommiste, Shazeen M. Hasan, Sakina B. Gooljar, Amanda-Jayne F. Carr, Anthony Vugler, Conor M. Ramsden, Magda Bictash, Mike Fenster, Juliette Steer, Tricia Harbinson, Anna Wilbrey, Adnan Tufail, Gang Feng, Mark Whitlock, Anthony G. Robson, Graham E. Holder, Mandeep S. Sagoo, Peter T. Loudon, Paul Whiting, et Peter J. Coffey. 2018. « Phase 1 Clinical Study of an Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Patch in Age-Related Macular Degeneration ». *Nature Biotechnology* 36(4):328-37. doi: 10.1038/nbt.4114.
- Cuenca, Nicolás, Laura Fernández-Sánchez, Laura Campello, Victoria Maneu, Pedro De la Villa, Pedro Lax, et Isabel Pinilla. 2014. « Cellular Responses Following Retinal Injuries and Therapeutic Approaches for Neurodegenerative Diseases ». *Progress in Retinal and Eye Research* 43:17-75. doi: 10.1016/j.preteyeres.2014.07.001.
- Curcio, Christine A., et Anita E. Hendrickson. 1991. « Chapter 5 Organization and Development of the Primate Photoreceptor Mosaic ». *Progress in Retinal Research* 10:89-120. doi: 10.1016/0278-4327(91)90010-Y.
- Dacey, Dennis M., Barry B. Lee, Donna K. Stafford, Joel Pokorny, et Vivianne C. Smith. 1996. « Horizontal Cells of the Primate Retina: Cone Specificity Without Spectral Opponency ». *Science* 271(5249):656-59. doi: 10.1126/science.271.5249.656.
- Dalkara, Deniz, Olivier Goureau, Katia Marazova, et José-Alain Sahel. 2016. « Let There Be Light: Gene and Cell Therapy for Blindness ». *Human Gene Therapy* 27(2):134-47. doi: 10.1089/hum.2015.147.
- Dawson, D. W., O. V. Volpert, P. Gillis, S. E. Crawford, H. J. Xu, W. Benedict, et N. P. Bouck. 1999. « Pigment Epithelium-Derived Factor: A Potent Inhibitor of Angiogenesis ». *Science* 285(5425):245-48. doi: 10.1126/science.285.5425.245.
- D'Cruz, P. M., D. Yasumura, J. Weir, M. T. Matthes, H. Abderrahim, M. M. LaVail, et D. Vollrath. 2000. « Mutation of the Receptor Tyrosine Kinase Gene Mertk in the Retinal Dystrophic RCS Rat ». *Human Molecular Genetics* 9(4):645-51. doi: 10.1093/hmg/9.4.645.
- De Moraes, Carlos Gustavo. 2013. « Anatomy of the Visual Pathways ». *Journal of Glaucoma* 22 Suppl 5:S2-7. doi: 10.1097/IJG.0b013e3182934978.
- Del Priore, Lucian V., Tongalp H. Tezel, et Henry J. Kaplan. 2004. « Survival of Allogeneic Porcine Retinal Pigment Epithelial Sheets after Subretinal Transplantation ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 45(3):985-92. doi: 10.1167/iov.03-0662.
- Delplace, Vianney, Arturo Ortin-Martinez, En Leh S. Tsai, Alan N. Amin, Valerie Wallace, et Molly S. Shoichet. 2019. « Controlled Release Strategy Designed for Intravitreal Protein Delivery to the Retina ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 293:10-20. doi: 10.1016/j.jconrel.2018.11.012.
- Devarasetti, Hasini. 2023. « US FDA Approves Apellis's Geographic Atrophy Therapy Syfovre ». *Pharmaceutical Technology*. Consulté 25 avril 2023 (<https://www.pharmaceutical-technology.com/news/fda-apelliss-geographic-atrophy/>).
- Diniz, Bruno, Padmaja Thomas, Biju Thomas, Ramiro Ribeiro, Yuntao Hu, Rodrigo Brant, Ashish Ahuja, Danhong Zhu, Laura Liu, Michael Koss, Mauricio Maia, Gerald Chader, David R. Hinton, et Mark S. Humayun. 2013a. « Subretinal Implantation of Retinal Pigment Epithelial Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells: Improved Survival When Implanted as a Monolayer ».

Investigative Ophthalmology & Visual Science 54(7):5087-96. doi: 10.1167/iovs.12-11239.

Diniz, Bruno, Padmaja Thomas, Biju Thomas, Ramiro Ribeiro, Yuntao Hu, Rodrigo Brant, Ashish Ahuja, Danhong Zhu, Laura Liu, Michael Koss, Mauricio Maia, Gerald Chader, David R. Hinton, et Mark S. Humayun. 2013b. « Subretinal Implantation of Retinal Pigment Epithelial Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells: Improved Survival When Implanted as a Monolayer ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 54(7):5087-96. doi: 10.1167/iovs.12-11239.

Donovan, Stacy L., et Michael A. Dyer. 2005. « Regulation of Proliferation during Central Nervous System Development ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 16(3):407-21. doi: 10.1016/j.semcdb.2005.02.012.

Ducloyer, Jean-Baptiste, Guylène Le Meur, Thérèse Cronin, Oumeya Adjali, et Michel Weber. 2020. « [Gene therapy for retinitis pigmentosa] ». *Medecine Sciences: M/S* 36(6-7):607-15. doi: 10.1051/medsci/2020095.

Dufier, Jean-Louis. 2003. « La rétinopathie pigmentaire à la recherche d'une approche thérapeutique ». *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 187(9):1685-94. doi: 10.1016/S0001-4079(19)33859-2.

Dunn, K. C., A. E. Aotaki-Keen, F. R. Putkey, et L. M. Hjelmeland. 1996. « ARPE-19, a Human Retinal Pigment Epithelial Cell Line with Differentiated Properties ». *Experimental Eye Research* 62(2):155-69. doi: 10.1006/exer.1996.0020.

Echelard, Y., D. J. Epstein, B. St-Jacques, L. Shen, J. Mohler, J. A. McMahon, et A. P. McMahon. 1993. « Sonic Hedgehog, a Member of a Family of Putative Signaling Molecules, Is Implicated in the Regulation of CNS Polarity ». *Cell* 75(7):1417-30. doi: 10.1016/0092-8674(93)90627-3.

Edwards, Malia, et Gerard A. Luty. 2021. « Bruch's Membrane and the Choroid in Age-Related Macular Degeneration ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1256:89-119. doi: 10.1007/978-3-030-66014-7_4.

Edwards, Thomas L., Charles L. Cottrill, Kanmin Xue, Matthew P. Simunovic, James D. Ramsden, Eberhart Zrenner, et Robert E. MacLaren. 2018. « Assessment of the Electronic Retinal Implant Alpha AMS in Restoring Vision to Blind Patients with End-Stage Retinitis Pigmentosa ». *Ophthalmology* 125(3):432-43. doi: 10.1016/j.ophtha.2017.09.019.

Eiraku, Mototsugu, Nozomu Takata, Hiroki Ishibashi, Masako Kawada, Eriko Sakakura, Satoru Okuda, Kiyotoshi Sekiguchi, Taiji Adachi, et Yoshiki Sasai. 2011. « Self-Organizing Optic-Cup Morphogenesis in Three-Dimensional Culture ». *Nature* 472(7341):51-56. doi: 10.1038/nature09941.

Emerson, Mark M., Natalia Surzenko, Jillian J. Goetz, Jeffrey Trimarchi, et Constance L. Cepko. 2013. « Otx2 and Onecut1 Promote the Fates of Cone Photoreceptors and Horizontal Cells and Repress Rod Photoreceptors ». *Developmental Cell* 26(1):59-72. doi: 10.1016/j.devcel.2013.06.005.

Erickson-Davis, Cordelia, et Helma Korzybska. 2021. « What Do Blind People “See” with Retinal Prostheses? Observations and Qualitative Reports of Epiretinal Implant Users ». *PLoS One* 16(2):e0229189. doi: 10.1371/journal.pone.0229189.

Erskine, Lynda, et Eloisa Herrera. 2014. « Connecting the Retina to the Brain ». *ASN NEURO* 6(6):1759091414562107. doi: 10.1177/1759091414562107.

Eshaq, Randa S., William S. Wright, et Norman R. Harris. 2014. « Oxygen delivery, consumption, and conversion to reactive oxygen species in experimental models of diabetic retinopathy ». *Redox Biology* 2:661-66. doi: 10.1016/j.redox.2014.04.006.

Euler, Thomas, Silke Haverkamp, Timm Schubert, et Tom Baden. 2014. « Retinal Bipolar Cells: Elementary Building Blocks of Vision ». *Nature Reviews Neuroscience* 15(8):507-19. doi: 10.1038/nrn3783.

Faber, Hanna, Dorothea Besch, Karl-Ulrich Bartz-Schmidt, Hanna Eisenstein, Johann Roeder, Helmut Sachs, Florian Gekeler, Eberhart Zrenner, et Katarina Stingl. 2020. « Restriction of Eye Motility in Patients with RETINA IMPLANT Alpha AMS ». *Acta Ophthalmologica* 98(8):e998-1003. doi: 10.1111/aos.14435.

Fabian, Eszter, Dora Reglodi, Gabriella Horvath, Balazs Opper, Gabor Toth, Csilla Fazakas, Attila G. Vegh, Imola Wilhelm, et Istvan A. Krizbai. 2019. « Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide Acts against Neovascularization in Retinal Pigment Epithelial Cells ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1455(1):160-72. doi: 10.1111/nyas.14189.

Farrokh-Siar, L., K. A. Rezai, S. C. Patel, et J. T. Ernest. 1999. « Cryoprecipitate: An Autologous Substrate for Human Fetal Retinal Pigment Epithelium ». *Current Eye Research* 19(2):89-94. doi: 10.1076/ceyr.19.2.89.5331.

Faynus, Mohamed A., Jeffrey K. Bailey, Britney O. Pennington, Mika Katsura, Duncan A. Proctor, Ashley K. Yeh, Sneha Menon, Dylan G. Choi, Jane S. Lebkowski, Lincoln V. Johnson, et Dennis O. Clegg. 2022. « Microcarrier-Based Culture of Human Pluripotent Stem-Cell-Derived Retinal Pigmented Epithelium ». *Bioengineering (Basel, Switzerland)* 9(7):297. doi: 10.3390/bioengineering9070297.

Ferguson, Lee R., Sankarathi Balaiya, Bharani K. Mynampati, Kumar Sambhav, et Kakarla V. Chalam. 2015. « Deprivation of BFGF Promotes Spontaneous Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Retinal Pigment Epithelial Cells ». *Journal of Stem Cells* 10(3):159-70.

Fernandes, Rodrigo A. Brant, Francisco R. Stefanini, Paulo Falabella, Michael J. Koss, Trent Wells, Bruno Diniz, Ramiro Ribeiro, Paulo

- Schor, Mauricio Maia, Fernando M. Penha, David R. Hinton, Yu-Chong Tai, et Mark Humayun. 2017. « Development of a New Tissue Injector for Subretinal Transplantation of Human Embryonic Stem Cell Derived Retinal Pigmented Epithelium ». *International Journal of Retina and Vitreous* 3:41. doi: 10.1186/s40942-017-0095-6.
- Ferrari, Stefano, Enzo Di Iorio, Vanessa Barbaro, Diego Ponzin, Francesco S. Sorrentino, et Francesco Parmeggiani. 2011. « Retinitis Pigmentosa: Genes and Disease Mechanisms ». *Current Genomics* 12(4):238-49. doi: 10.2174/138920211795860107.
- Fitzgibbon, J., B. Appukuttan, S. Gayther, D. Wells, J. Delhanty, et D. M. Hunt. 1994. « Localisation of the Human Blue Cone Pigment Gene to Chromosome Band 7q31.3-32 ». *Human Genetics* 93(1):79-80. doi: 10.1007/bf00218919.
- Forsythe, Elizabeth, et Philip L. Beales. 2013. « Bardet-Biedl Syndrome ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 21(1):8-13. doi: 10.1038/ejhg.2012.115.
- Frank, Robert N., Rajesh H. Amin, et James E. Puklin. 1999. « Antioxidant Enzymes in the Macular Retinal Pigment Epithelium of Eyes with Neovascular Age-Related Macular Degeneration ». This Article Is Derived from a Thesis Accepted by the American Ophthalmological Society: Frank RN. Antioxidant Enzymes in the Macular Retinal Pigment Epithelium of Eyes with Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1998;96:635-689. » *American Journal of Ophthalmology* 127(6):694-709. doi: 10.1016/S0002-9394(99)00032-X.
- Fraser-Bell, Samantha, et Mark C. Gillies. 2020. « The impact of the Lucentis, Eylea, Avastin in Vein Occlusion (LEAVO) Study in Australia ». *Eye* 34(2):223-24. doi: 10.1038/s41433-019-0713-7.
- Frederiksen, Henriette Reventlow, Ulrik Doehn, Pernille Tveden-Nyborg, et Kristine K. Freude. 2021. « Non-immunogenic Induced Pluripotent Stem Cells, a Promising Way Forward for Allogenic Transplantations for Neurological Disorders ». *Frontiers in Genome Editing* 2:623717. doi: 10.3389/fgeed.2020.623717.
- Fu, Yingbin, et King-Wai Yau. 2007. « Phototransduction in mouse rods and cones ». *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 454(5):805-19. doi: 10.1007/s00424-006-0194-y.
- Fuchs, E., et D. W. Cleveland. 1998. « A Structural Scaffolding of Intermediate Filaments in Health and Disease ». *Science (New York, N.Y.)* 279(5350):514-19. doi: 10.1126/science.279.5350.514.
- Fuhrmann, Sabine. 2008. « Wnt Signaling in Eye Organogenesis ». *Organogenesis* 4(2):60-67. doi: 10.4161/org.4.2.5850.
- Fuhrmann, Sabine, ChangJiang Zou, et Edward M. Levine. 2014. « Retinal Pigment Epithelium Development, Plasticity, and Tissue Homeostasis ». *Experimental Eye Research* 123:141-50. doi: 10.1016/j.exer.2013.09.003.
- Fujimura, Naoko. 2016. « Crae ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 4:138. doi: 10.3389/fcell.2016.00138.
- Gagliardi, Giuliana, Karim Ben M'Barek, Antoine Chaffiol, Amélie Slembrouck-Brec, Jean-Baptiste Conart, Céline Nanteau, Oriane Rabesandratana, José-Alain Sahel, Jens Duebel, Gael Orioux, Sacha Reichman, et Olivier Goureau. 2018. « Characterization and Transplantation of CD73-Positive Photoreceptors Isolated from Human iPSC-Derived Retinal Organoids ». *Stem Cell Reports* 11(3):665-80. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.07.005.
- Gallardo, Viviana, et Paola Bovolenta. 2018. « Positive and Negative Regulation of Shh Signalling in Vertebrate Retinal Development ». *F1000Research* 7:F1000 Faculty Rev-1934. doi: 10.12688/f1000research.16190.1.
- Gamm, David M., Eric Clark, Elizabeth E. Capowski, et Ruchira Singh. 2019. « 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* 206:113-31. doi: 10.1016/j.ajo.2019.04.033.
- Gamm, David M., Shaomei Wang, Bin Lu, Sergei Girman, Toby Holmes, Nicholas Bischoff, Rebecca L. Shearer, Yves Sauvé, Elizabeth Capowski, Clive N. Svendsen, et Raymond D. Lund. 2007. « Protection of Visual Functions by Human Neural Progenitors in a Rat Model of Retinal Disease ». *PLOS ONE* 2(3):e338. doi: 10.1371/journal.pone.0000338.
- Gao, Jie, Rehan M. Hussain, et Christina Y. Weng. 2020. « Voretigene Neparvovec in Retinal Diseases: A Review of the Current Clinical Evidence ». *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)* 14:3855-69. doi: 10.2147/OPHT.S231804.
- Garcia, T., A. Tourbah, É. Setrouk, A. Ducasse, et C. Arndt. 2012. « [Optical coherence tomography in neuro-ophthalmology] ». *Journal Français D'ophtalmologie* 35(6):454-66. doi: 10.1016/j.jfo.2012.02.002.
- Gasparini, Sylvia J., Karen Tessmer, Miriam Reh, Stephanie Wieneke, Madalena Carido, Manuela Völkner, Oliver Borsch, Anka Swiersy, Marta Zuzic, Olivier Goureau, Thomas Kurth, Volker Busskamp, Günther Zeck, Mike O. Karl, et Marius Ader. 2022. « Transplanted Human Cones Incorporate into the Retina and Function in a Murine Cone Degeneration Model ». *The Journal of Clinical Investigation* 132(12):e154619. doi: 10.1172/JCI154619.
- Giordano, G. G., R. C. Thomson, S. L. Ishaug, A. G. Mikos, S. Cumber, C. A. Garcia, et D. Lahiri-Munir. 1997. « Retinal Pigment Epithelium Cells Cultured on Synthetic Biodegradable Polymers ». *Journal of Biomedical Materials Research* 34(1):87-93. doi: 10.1002/(sici)1097-4636(199701)34:1<87::aid-jbm12>3.0.co;2-m.

- Girotti, Albert W., et Tamas Kriska. 2004. « Role of Lipid Hydroperoxides in Photo-Oxidative Stress Signaling ». *Antioxidants & Redox Signaling* 6(2):301-10. doi: 10.1089/152308604322899369.
- Godement, P., J. Salaün, et M. Imbert. 1984. « Prenatal and Postnatal Development of Retinogeniculate and Retinocollicular Projections in the Mouse ». *The Journal of Comparative Neurology* 230(4):552-75. doi: 10.1002/cne.902300406.
- Gonçalves, Sara, Inês Patrício Rodrigues, Jorge Padrão, João Pedro Silva, Vitor Sencadas, Senentxu Lanceros-Mendez, Henrique Girão, Francisco M. Gama, Fernando Dourado, et Lígia R. Rodrigues. 2016. « Acetylated Bacterial Cellulose Coated with Urinary Bladder Matrix as a Substrate for Retinal Pigment Epithelium ». *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* 139:1-9. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.11.051.
- Gopinathan, Janarthanan, et Insup Noh. 2018. « Recent trends in bioinks for 3D printing ». *Biomaterials Research* 22(1):11. doi: 10.1186/s40824-018-0122-1.
- Gouras, P., M. T. Flood, et H. Kjeldbye. 1984. « Transplantation of Cultured Human Retinal Cells to Monkey Retina ». *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias* 56(4):431-43.
- Greco, Raffaella, Giacomo Oliveira, Maria Teresa Lupo Stanghellini, Luca Vago, Attilio Bondanza, Jacopo Peccatori, Nicoletta Cieri, Sarah Markt, Sara Mastaglio, Claudio Bordignon, Chiara Bonini, et Fabio Ciceri. 2015. « Improving the safety of cell therapy with the TK-suicide gene ». *Frontiers in Pharmacology* 6:95. doi: 10.3389/fphar.2015.00095.
- Gupta, Nisha, Kimberly E. Brown, et Ann H. Milam. 2003. « Activated Microglia in Human Retinitis Pigmentosa, Late-Onset Retinal Degeneration, and Age-Related Macular Degeneration ». *Experimental Eye Research* 76(4):463-71. doi: 10.1016/s0014-4835(02)00332-9.
- Gupta, Santosh, Lyubomyr Lytvynchuk, Taras Ardan, Hana Studenovska, Georgina Faura, Lars Eide, Ljubo Znaor, Slaven Erceg, Knut Stieger, Jan Motlik, Kapil Bharti, et Goran Petrovski. 2023. « Retinal Pigment Epithelium Cell Development: Extrapolating Basic Biology to Stem Cell Research ». *Biomedicines* 11(2):310. doi: 10.3390/biomedicines11020310.
- Gupta, Vivek K., Yuyi You, Veer Bala Gupta, Alexander Klistorner, et Stuart L. Graham. 2013. « TrkB Receptor Signalling: Implications in Neurodegenerative, Psychiatric and Proliferative Disorders ». *International Journal of Molecular Sciences* 14(5):10122-42. doi: 10.3390/ijms140510122.
- Guymer, Robyn H., Alan C. Bird, et Gregory S. Hageman. 2004. « Cytoarchitecture of Choroidal Capillary Endothelial Cells ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 45(6):1660-66. doi: 10.1167/iovs.03-0913.
- Hack, Iris, Leo Peichl, et Johann Helmut Brandstätter. 1999. « An alternative pathway for rod signals in the rodent retina: Rod photoreceptors, cone bipolar cells, and the localization of glutamate receptors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(24):14130-35. doi: 10.1073/pnas.96.24.14130.
- Haeseleer, Françoise, Geeng-Fu Jang, Yoshikazu Imanishi, Carola A. G. G. Driessen, Masazumi Matsumura, Peter S. Nelson, et Krzysztof Palczewski. 2002. « Dual-Substrate Specificity Short Chain Retinol Dehydrogenases from the Vertebrate Retina ». *The Journal of Biological Chemistry* 277(47):45537-46. doi: 10.1074/jbc.M208882200.
- Hamel, Christian. 2006. « Retinitis Pigmentosa ». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 1:40. doi: 10.1186/1750-1172-1-40.
- Hamel, Christian P. 2007. « Cone rod dystrophies ». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2(1):7. doi: 10.1186/1750-1172-2-7.
- Han, Xiao, Mengning Wang, Songwei Duan, Paul J. Franco, Jennifer Hyoje-Ryu Kenty, Preston Hedrick, Yulei Xia, Alana Allen, Leonardo M. R. Ferreira, Jack L. Strominger, Douglas A. Melton, Torsten B. Meissner, et Chad A. Cowan. 2019. « Generation of Hypoimmunogenic Human Pluripotent Stem Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116(21):10441-46. doi: 10.1073/pnas.1902566116.
- Handa, James T., Cathy Bowes Rickman, Andrew D. Dick, Michael B. Gorin, Joan W. Miller, Cynthia A. Toth, Marius Ueffing, Marco Zarbin, et Lindsay A. Farrer. 2019. « A Systems Biology Approach towards Understanding and Treating Non-Neovascular Age-Related Macular Degeneration ». *Nature Communications* 10(1):3347. doi: 10.1038/s41467-019-11262-1.
- Hanus, Jakub, Fangkun Zhao, et Shusheng Wang. 2016. « Current Therapeutic Developments in Atrophic Age-Related Macular Degeneration ». *British Journal of Ophthalmology* 100(1):122-27. doi: 10.1136/bjophthalmol-2015-306972.
- Harada, Takayuki, Chikako Harada, et Luis F. Parada. 2007. « Molecular Regulation of Visual System Development: More than Meets the Eye ». *Genes & Development* 21(4):367-78. doi: 10.1101/gad.1504307.
- Hartong, Dyonne T., Eliot L. Berson, et Thaddeus P. Dryja. 2006. « Retinitis Pigmentosa ». *The Lancet* 368(9549):1795-1809. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69740-7.
- Hartong, Dyonne T., Frank F. Jorritsma, Johannes J. Neve, Bart J. M. Melis-Dankers, et Aart C. Kooijman. 2004. « Improved Mobility and Independence of Night-Blind People Using Night-Vision Goggles ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 45(6):1725-31. doi: 10.1167/iovs.03-1061.

- Hassan-Karimi, Homa, Ebrahim Jafarzadehpur, Bahram Blouri, Hassan Hashemi, Arash Zare Sadeghi, et Ali Mirzajani. 2012. « Frequency Domain Electroretinography in Retinitis Pigmentosa versus Normal Eyes ». *Journal of Ophthalmic & Vision Research* 7(1):34-38.
- Hayden, Christopher M., et Emily K. Meseck. 2021. « Transmission Electron Microscopy of the Retina: A Method for Sample Preparation and Evaluation ». *Toxicologic Pathology* 49(3):521-27. doi: 10.1177/0192623320954124.
- Heavner, Whitney, et Larysa Pevny. 2012. « Eye Development and Retinogenesis ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4(12):a008391. doi: 10.1101/cshperspect.a008391.
- Heckenlively, J. 1982. « The Frequency of Posterior Subcapsular Cataract in the Hereditary Retinal Degenerations ». *American Journal of Ophthalmology* 93(6):733-38. doi: 10.1016/0002-9394(82)90469-x.
- Heisterkamp, Patrick, Oliver Borsch, Nundehui Diaz Lezama, Sylvia Gasparini, Adeeba Fathima, Livia S. Carvalho, Felix Wagner, Mike O. Karl, Michael Schlierf, et Marius Ader. 2022. « Evidence for Endogenous Exchange of Cytoplasmic Material between a Subset of Cone and Rod Photoreceptors within the Adult Mammalian Retina via Direct Cell-Cell Connections ». *Experimental Eye Research* 219:109033. doi: 10.1016/j.exer.2022.109033.
- Henderson, J. Michael, et Chiara Zurzolo. 2021. « Seeing Eye to Eye: Photoreceptors Employ Nanotube-like Connections for Material Transfer ». *The EMBO Journal* 40(22):e109727. doi: 10.15252/embj.2021109727.
- Hirami, Yasuhiko, Fumitaka Osakada, Kazutoshi Takahashi, Keisuke Okita, Shinya Yamanaka, Hanako Ikeda, Nagahisa Yoshimura, et Masayo Takahashi. 2009. « Generation of Retinal Cells from Mouse and Human Induced Pluripotent Stem Cells ». *Neuroscience Letters* 458(3):126-31. doi: 10.1016/j.neulet.2009.04.035.
- Hochmann, Sarah, Jan Kaslin, Stefan Hans, Anke Weber, Anja Machate, Michaela Geffarth, Richard H. W. Funk, et Michael Brand. 2012. « Fgf Signaling is Required for Photoreceptor Maintenance in the Adult Zebrafish Retina ». *PLoS ONE* 7(1):e30365. doi: 10.1371/journal.pone.0030365.
- Holt, C. E., T. W. Bertsch, H. M. Ellis, et W. A. Harris. 1988. « Cellular Determination in the Xenopus Retina Is Independent of Lineage and Birth Date ». *Neuron* 1(1):15-26. doi: 10.1016/0896-6273(88)90205-x.
- Hong, Cheol-Hwa, Hyun-Jung Sohn, Hyun-Joo Lee, Hyun-Il Cho, et Tai-Gyu Kim. 2017. « Antigen Presentation by Individually Transferred HLA Class I Genes in HLA-A, HLA-B, HLA-C Null Human Cell Line Generated Using the Multiplex CRISPR-Cas9 System ». *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)* 40(6):201-10. doi: 10.1097/CJI.0000000000000176.
- Horsford, D. Jonathan, Minh-Thanh T. Nguyen, Grant C. Sellar, Rashmi Kothary, Heinz Arnheiter, et Roderick R. McInnes. 2005. « Chx10 Repression of Mitf Is Required for the Maintenance of Mammalian Neuroretinal Identity ». *Development (Cambridge, England)* 132(1):177-87. doi: 10.1242/dev.01571.
- Hoshino, Akina, Rinki Ratnapriya, Matthew J. Brooks, Vijender Chaitankar, Matthew S. Wilken, Chi Zhang, Margaret R. Starostik, Linn Gieser, Anna La Torre, Mario Nishio, Olivia Bates, Ashley Walton, Olivia Bermingham-McDonogh, Ian A. Glass, Rachel O. L. Wong, Anand Swaroop, et Thomas A. Reh. 2017. « Molecular anatomy of the developing human retina ». *Developmental cell* 43(6):763-779.e4. doi: 10.1016/j.devcel.2017.10.029.
- Hsiung, Jamie, Danhong Zhu, et David R. Hinton. 2015. « Polarized Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cell Monolayers Have Higher Resistance to Oxidative Stress-Induced Cell Death than Nonpolarized Cultures ». *Stem Cells Translational Medicine* 4(1):10-20. doi: 10.5966/sctm.2014-0205.
- Hu, Monica L., Thomas L. Edwards, Fleur O'Hare, Doron G. Hickey, Jiang-Hui Wang, Zhengyang Liu, et Lauren N. Ayton. 2021. « Gene Therapy for Inherited Retinal Diseases: Progress and Possibilities ». *Clinical & Experimental Optometry* 104(4):444-54. doi: 10.1080/08164622.2021.1880863.
- Hughes, R. E., P. S. Brzovic, R. E. Klevit, et J. B. Hurley. 1995. « Calcium-Dependent Solvation of the Myristoyl Group of Recoverin ». *Biochemistry* 34(36):11410-16. doi: 10.1021/bi00036a013.
- Humayun, Mark S., Jessy D. Dorn, Lyndon da Cruz, Gislin Dagnelie, José-Alain Sahel, Paulo E. Stanga, Artur V. Cideciyan, Jacque L. Duncan, Dean Elliott, Eugene Filley, Allen C. Ho, Arturo Santos, Avinoam B. Safran, Aries Arditi, Lucian V. Del Priore, et Robert J. Greenberg. 2012. « Interim Results from the International Trial of Second Sight's Visual Prosthesis ». *Ophthalmology* 119(4):779-88. doi: 10.1016/j.ophtha.2011.09.028.
- Hussain, Ali A., Yunhee Lee, et John Marshall. 2020. « Understanding the Complexity of the Matrix Metalloproteinase System and Its Relevance to Age-Related Diseases: Age-Related Macular Degeneration and Alzheimer's Disease ». *Progress in Retinal and Eye Research* 74:100775. doi: 10.1016/j.preteyeres.2019.100775.
- Idelson, Maria, Ruslana Alper, Alexey Obolensky, Etti Ben-Shushan, Itzhak Hemo, Nurit Yachimovich-Cohen, Hanita Khaner, Yoav Smith, Ofer Wisner, Michal Gropp, Malkiel A. Cohen, Sharona Even-Ram, Yael Berman-Zaken, Limor Matzrafi, Gideon Rechavi, Eyal Banin, et Benjamin Reubinoff. 2009. « Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Functional Retinal Pigment Epithelium Cells ». *Cell Stem Cell* 5(4):396-408. doi: 10.1016/j.stem.2009.07.002.

- Ikeda, Yasuhiro, Shunji Nakatake, Jun Funatsu, Kohta Fujiwara, Takashi Tachibana, Yusuke Murakami, Toshio Hisatomi, Shigeo Yoshida, Hiroshi Enaida, Tatsuro Ishibashi, et Koh-Hei Sonoda. 2019. « Night-Vision Aid Using See-through Display for Patients with Retinitis Pigmentosa ». *Japanese Journal of Ophthalmology* 63(2):181-85. doi: 10.1007/s10384-018-00644-5.
- Imbert, Michel. 1988. « La vision naturelle. Le traitement neuronal de l'information visuelle ». *Intellectica* 5(1):3-31. doi: 10.3406/intel.1988.859.
- Ingram, Norianne T., Alapakkam P. Sampath, et Gordon L. Fain. 2016. « Why Are Rods More Sensitive than Cones? » *The Journal of Physiology* 594(19):5415-26. doi: 10.1113/JP272556.
- Inoue, Yuji, Aya Iriyama, Shuji Ueno, Hidenori Takahashi, Mineo Kondo, Yasuhiro Tamaki, Makoto Araie, et Yasuo Yanagi. 2007. « Subretinal Transplantation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Delays Retinal Degeneration in the RCS Rat Model of Retinal Degeneration ». *Experimental Eye Research* 85(2):234-41. doi: 10.1016/j.exer.2007.04.007.
- Iraha, Satoshi, Hung-Ya Tu, Suguru Yamasaki, Takahiro Kagawa, Motohito Goto, Riichi Takahashi, Takehito Watanabe, Sunao Sugita, Shigenobu Yonemura, Genshiro A. Sunagawa, Take Matsuyama, Momo Fujii, Atsushi Kuwahara, Akiyoshi Kishino, Naoshi Koide, Mototsugu Eiraku, Hidenobu Tanihara, Masayo Takahashi, et Michiko Mandai. 2018. « Establishment of Immunodeficient Retinal Degeneration Model Mice and Functional Maturation of Human ESC-Derived Retinal Sheets after Transplantation ». *Stem Cell Reports* 10(3):1059-74. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.01.032.
- Ishibashi, Munenori, Joyce Keung, Catherine W. Morgans, Sue A. Aicher, James R. Carroll, Joshua H. Singer, Li Jia, Wei Li, Iris Fahrenfort, Christophe P. Ribelayga, et Stephen C. Massey. 2022. « Analysis of Rod/Cone Gap Junctions from the Reconstruction of Mouse Photoreceptor Terminals ». *ELife* 11:e73039. doi: 10.7554/eLife.73039.
- Jager, Rama D., William F. Mieler, et Joan W. Miller. 2008. « Age-Related Macular Degeneration ». *The New England Journal of Medicine* 358(24):2606-17. doi: 10.1056/NEJMra0801537.
- Jin, Hua, Qian Liang, Tongsheng Chen, et Xiaoping Wang. 2014. « Resveratrol Protects Chondrocytes from Apoptosis via Altering the Ultrastructural and Biomechanical Properties: An AFM Study ». *PloS One* 9(3):e91611. doi: 10.1371/journal.pone.0091611.
- Jonas, J B, A. M. Schmidt, J. A. Müller-Bergh, U. M. Schlötzer-Schrehardt, et G. O. Naumann. 1992. « Human optic nerve fiber count and optic disc size. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 33(6):2012-18.
- Jonas, J. B., U. Schneider, et G. O. Naumann. 1992a. « Count and Density of Human Retinal Photoreceptors ». *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht Von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie* 230(6):505-10. doi: 10.1007/BF00181769.
- Jonas, J. B., U. Schneider, et G. O. Naumann. 1992b. « Count and Density of Human Retinal Photoreceptors ». *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht Von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie* 230(6):505-10. doi: 10.1007/BF00181769.
- Jones, B. W., R. L. Pfeiffer, W. D. Ferrell, C. B. Watt, M. Marmor, et R. E. Marc. 2016. « Retinal Remodeling in Human Retinitis Pigmentosa ». *Experimental Eye Research* 150:149-65. doi: 10.1016/j.exer.2016.03.018.
- Jones, Bryan W., Carl B. Watt, Jeanne M. Frederick, Wolfgang Baehr, Ching-Kang Chen, Edward M. Levine, Ann H. Milam, Matthew M. Lavail, et Robert E. Marc. 2003. « Retinal Remodeling Triggered by Photoreceptor Degenerations ». *The Journal of Comparative Neurology* 464(1):1-16. doi: 10.1002/cne.10703.
- Jones, I. L., M. Warner, et J. D. Stevens. 1992. « Mathematical Modelling of the Elastic Properties of Retina: A Determination of Young's Modulus ». *Eye (London, England)* 6 (Pt 6):556-59. doi: 10.1038/eye.1992.121.
- Jung, Yei Hwan, M. Joseph Phillips, Juhwan Lee, Ruosen Xie, Allison L. Ludwig, Guojun Chen, Qifeng Zheng, Tong June Kim, Huilong Zhang, Patrick Barney, Jee Min, Katherine Barlow, Shaoqin Gong, David M. Gamm, et Zhenqiang Ma. 2018. « 3D Microstructured Scaffolds to Support Photoreceptor Polarization and Maturation ». *Advanced Materials* 30(39):1803550. doi: https://doi.org/10.1002/adma.201803550.
- Jusuf, Patricia R., Shahad Albadri, Alessio Paolini, Peter D. Currie, Francesco Argenton, Shin-ichi Higashijima, William A. Harris, et Lucia Poggi. 2012. « Biasing Amacrine Subtypes in the Atoh7 Lineage through Expression of Barhl2 ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32(40):13929-44. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2073-12.2012.
- K, Stingl, et Zrenner E. 2013. « Electronic Approaches to Restitute Vision in Patients with Neurodegenerative Diseases of the Retina ». *Ophthalmic Research* 50(4). doi: 10.1159/000354424.
- Kalargyrou, Aikaterini A., Mark Basche, Aura Hare, Emma L. West, Alexander J. Smith, Robin R. Ali, et Rachael A. Pearson. 2021. « Nanotube-like Processes Facilitate Material Transfer between Photoreceptors ». *EMBO Reports* 22(11):e53732. doi: 10.15252/embr.202153732.
- Kamaraj, Balu, et Rituraj Purohit. 2014. « Mutational Analysis of Oculocutaneous Albinism: A Compact Review ». *BioMed Research International* 2014:905472. doi: 10.1155/2014/905472.

- Kanda, Genki N., Taku Tsuzuki, Motoki Terada, Noriko Sakai, Naohiro Motozawa, Tomohiro Masuda, Mitsuhiro Nishida, Chihaya T. Watanabe, Tatsuki Higashi, Shuhei A. Horiguchi, Taku Kudo, Motohisa Kamei, Genshiro A. Sunagawa, Kenji Matsukuma, Takeshi Sakurada, Yosuke Ozawa, Masayo Takahashi, Koichi Takahashi, et Tohru Natsume. 2022. « Robotic search for optimal cell culture in regenerative medicine » édité par S. Méndez-Ferrer, M. Zaidi, S. Méndez-Ferrer, S. Sebastian, et C. Monville. *eLife* 11:e77007. doi: 10.7554/eLife.77007.
- Kashani, Amir H., Jane S. Lebkowski, David R. Hinton, Danhong Zhu, Mohamed A. Faynus, Sanford Chen, Firas M. Rahhal, Robert L. Avery, Hani Salehi-Had, Clement Chan, Neal Palejwala, April Ingram, Wei Dang, Chih-Min Lin, Debbie Mitra, Juan Carlos Martinez-Camarillo, Jeff Bailey, Cassidy Arnold, Britney O. Pennington, Narsing Rao, Lincoln V. Johnson, Dennis O. Clegg, et Mark S. Humayun. 2022. « Survival of an HLA-Mismatched, Bioengineered RPE Implant in Dry Age-Related Macular Degeneration ». *Stem Cell Reports* 17(3):448-58. doi: 10.1016/j.stemcr.2022.01.001.
- Kashani, Amir H., Jane S. Lebkowski, Firas M. Rahhal, Robert L. Avery, Hani Salehi-Had, Sanford Chen, Clement Chan, Neal Palejwala, April Ingram, Wei Dang, Chih-Min Lin, Debbie Mitra, Britney O. Pennington, Cassidy Hinman, Mohamed A. Faynus, Jeffrey K. Bailey, Sukriti Mohan, Narsing Rao, Lincoln V. Johnson, Dennis O. Clegg, David R. Hinton, et Mark S. Humayun. 2021. « One-Year Follow-Up in a Phase 1/2a Clinical Trial of an Allogeneic RPE Cell Bioengineered Implant for Advanced Dry Age-Related Macular Degeneration ». *Translational Vision Science & Technology* 10(10):13. doi: 10.1167/tvst.10.10.13.
- Kashani, Amir H., Jane S. Lebkowski, Firas M. Rahhal, Robert L. Avery, Hani Salehi-Had, Wei Dang, Chih-Min Lin, Debbie Mitra, Danhong Zhu, Biju B. Thomas, Sherry T. Hikita, Britney O. Pennington, Lincoln V. Johnson, Dennis O. Clegg, David R. Hinton, et Mark S. Humayun. 2018. « A Bioengineered Retinal Pigment Epithelial Monolayer for Advanced, Dry Age-Related Macular Degeneration ». *Science Translational Medicine* 10(435):eaao4097. doi: 10.1126/scitranslmed.aao4097.
- Kauper, Konrad, Cahil McGovern, Sandy Sherman, Pam Heatherton, Rob Rapoza, Paul Stabila, Brenda Dean, Alice Lee, Suzanna Borges, Bruce Bouchard, et Weng Tao. 2012. « Two-Year Intraocular Delivery of Ciliary Neurotrophic Factor by Encapsulated Cell Technology Implants in Patients with Chronic Retinal Degenerative Diseases ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53(12):7484-91. doi: 10.1167/iovs.12-9970.
- Kawamura, Satoru, et Shuji Tachibanaki. 2008. « Rod and Cone Photoreceptors: Molecular Basis of the Difference in Their Physiology ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 150(4):369-77. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.04.600.
- Kels, Barry D., Andrzej Grzybowski, et Jane M. Grant-Kels. 2015. « Human Ocular Anatomy ». *Clinics in Dermatology* 33(2):140-46. doi: 10.1016/j.clindermatol.2014.10.006.
- Kevany, Brian M., et Krzysztof Palczewski. 2010. « Phagocytosis of Retinal Rod and Cone Photoreceptors ». *Physiology (Bethesda, Md.)* 25(1):8-15. doi: 10.1152/physiol.00038.2009.
- Kim, K., A. Doi, B. Wen, K. Ng, R. Zhao, P. Cahan, J. Kim, M. J. Aryee, H. Ji, L. I. R. Ehrlich, A. Yabuuchi, A. Takeuchi, K. C. Cunniff, H. Hongguang, S. McKinney-Freeman, O. Naveiras, T. J. Yoon, R. A. Irizarry, N. Jung, J. Seita, J. Hanna, P. Murakami, R. Jaenisch, R. Weissleder, S. H. Orkin, I. L. Weissman, A. P. Feinberg, et G. Q. Daley. 2010. « Epigenetic Memory in Induced Pluripotent Stem Cells ». *Nature* 467(7313):285-90. doi: 10.1038/nature09342.
- Kitano, Yuko, Sayaka Nishimura, Tomoaki M. Kato, Anna Ueda, Kaho Takigawa, Masafumi Umekage, Masaki Nomura, Ayane Kawakami, Haruna Ogawa, Huaigeng Xu, Akitsu Hotta, Naoko Takasu, et Masayoshi Tsukahara. 2022. « Generation of Hypoimmunogenic Induced Pluripotent Stem Cells by CRISPR-Cas9 System and Detailed Evaluation for Clinical Application ». *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 26:15-25. doi: 10.1016/j.omtm.2022.05.010.
- Kitratschky, Veronique B. D., Katarina Stingl, Barbara Wilhelm, Tobias Peters, Dorothea Besch, Helmut Sachs, Florian Gekeler, Karl Ulrich Bartz-Schmidt, et Eberhart Zrenner. 2015. « Safety Evaluation of "Retina Implant Alpha IMS"--a Prospective Clinical Trial ». *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht Von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie* 253(3):381-87. doi: 10.1007/s00417-014-2797-x.
- Klimanskaya, Irina, Jason Hipp, Kourous A. Rezai, Michael West, Anthony Atala, et Robert Lanza. 2004. « Derivation and Comparative Assessment of Retinal Pigment Epithelium from Human Embryonic Stem Cells Using Transcriptomics ». *Cloning and Stem Cells* 6(3):217-45. doi: 10.1089/clo.2004.6.217.
- Kobat, Sabiha Gungor, et Burak Turgut. 2020. « Importance of Müller Cells ». *Beyoglu Eye Journal* 5(2):59-63. doi: 10.14744/bej.2020.28290.
- Kokkinaki, Maria, Niaz Sahibzada, et Nady Golestaneh. 2011. « 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 (Dayton, Ohio)* 29(5):825-35. doi: 10.1002/stem.635.
- Koontz, M. A., L. E. Hendrickson, S. T. Brace, et A. E. Hendrickson. 1993. « Immunocytochemical Localization of GABA and Glycine in Amacrine and Displaced Amacrine Cells of Macaque Monkey Retina ». *Vision Research* 33(18):2617-28. doi: 10.1016/0042-6989(93)90220-q.

- Kukura, Philipp, David W. McCamant, Sangwoon Yoon, Daniel B. Wandschneider, et Richard A. Mathies. 2005. « Structural Observation of the Primary Isomerization in Vision with Femtosecond-Stimulated Raman ». *Science* 310(5750):1006-9. doi: 10.1126/science.1118379.
- Kumar, A., V. Novoselov, A. J. Celeste, N. M. Wolfman, P. ten Dijke, et M. R. Kuehn. 2001. « Nodal Signaling Uses Activin and Transforming Growth Factor-Beta Receptor-Regulated Smads ». *The Journal of Biological Chemistry* 276(1):656-61. doi: 10.1074/jbc.M004649200.
- La, Chtcheglova, Ohlmann A, Boytsov D, Hinterdorfer P, Priglinger Sg, et Priglinger Cs. 2020. « Nanoscopic Approach to Study the Early Stages of Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) of Human Retinal Pigment Epithelial (RPE) Cells In Vitro ». *Life (Basel, Switzerland)* 10(8). doi: 10.3390/life10080128.
- Laboisonniere, Lauren A., Jillian J. Goetz, Gregory M. Martin, Ran Bi, Terry J. S. Lund, Laura Ellson, Madison R. Lynch, Bailey Mooney, Hannah Wickham, Peng Liu, Gregory W. Schwartz, et Jeffrey M. Trimarchi. 2019. « Molecular Signatures of Retinal Ganglion Cells Revealed through Single Cell Profiling ». *Scientific Reports* 9(1):15778. doi: 10.1038/s41598-019-52215-4.
- Lakowski, Jörn, Emily Welby, Dimitri Budinger, Fabiana Di Marco, Valentina Di Foggia, James W. B. Bainbridge, Kyle Wallace, David M. Gamm, Robin R. Ali, et Jane C. Sowden. 2018. « Isolation of Human Photoreceptor Precursors via a Cell Surface Marker Panel from Stem Cell-Derived Retinal Organoids and Fetal Retinae ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 36(5):709-22. doi: 10.1002/stem.2775.
- Lam, Phuong T., Christian Gutierrez, Katia Del Rio-Tsonis, et Michael L. Robinson. 2020. « Generation of a Retina Reporter HiPSC Line to Label Progenitor, Ganglion, and Photoreceptor Cell Types ». *Translational Vision Science & Technology* 9(3):21. doi: 10.1167/tvst.9.3.21.
- Lamba, Deepak A., Juliane Gust, et Thomas A. Reh. 2009. « Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Photoreceptors Restores Some Visual Function in Crx-Deficient Mice ». *Cell Stem Cell* 4(1):73-79. doi: 10.1016/j.stem.2008.10.015.
- Lamba, Deepak A., Mike O. Karl, Carol B. Ware, et Thomas A. Reh. 2006. « 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(34):12769-74. doi: 10.1073/pnas.0601990103.
- Lavik, E. B., H. Klassen, K. Warfvinge, R. Langer, et M. J. Young. 2005. « Fabrication of Degradable Polymer Scaffolds to Direct the Integration and Differentiation of Retinal Progenitors ». *Biomaterials* 26(16):3187-96. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.08.022.
- Lawrence, J. M., Y. Sauvé, D. J. Keegan, P. J. Coffey, L. Hetherington, S. Girman, S. J. Whiteley, A. S. Kwan, T. Pheby, et R. D. Lund. 2000. « Schwann Cell Grafting into the Retina of the Dystrophic RCS Rat Limits Functional Deterioration. Royal College of Surgeons ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41(2):518-28.
- Leach, Lyndsay L., David E. Buchholz, Vignesh P. Nadar, Stefan E. Lowenstein, et Dennis O. Clegg. 2015. « Canonical/ β -Catenin Wnt Pathway Activation Improves Retinal Pigmented Epithelium Derivation from Human Embryonic Stem Cells ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 56(2):1002-13. doi: 10.1167/iovs.14-15835.
- Lee, Gabriel Y. H., et Chwee T. Lim. 2007. « Biomechanics Approaches to Studying Human Diseases ». *Trends in Biotechnology* 25(3):111-18. doi: 10.1016/j.tibtech.2007.01.005.
- Lee, In-Kyu, Allison L. Ludwig, M. Joseph Phillips, Juhwan Lee, Ruosen Xie, Benjamin S. Sajdak, Lindsey D. Jager, Shaoqin Gong, David M. Gamm, et Zhenqiang Ma. 2021. « Ultrathin Micromolded 3D Scaffolds for High-Density Photoreceptor Layer Reconstruction ». *Science Advances* 7(17):eabf0344. doi: 10.1126/sciadv.abf0344.
- Léveillard, Thierry, et José-Alain Sahel. 2010. « Rod-Derived Cone Viability Factor for Treating Blinding Diseases: From Clinic to Redox Signaling ». *Science Translational Medicine* 2(26):26ps16. doi: 10.1126/scitranslmed.3000866.
- Levine, Edward M., Henk Roelink, Jennifer Turner, et Thomas A. Reh. 1997. « Sonic Hedgehog Promotes Rod Photoreceptor Differentiation in Mammalian Retinal Cells In Vitro ». *The Journal of Neuroscience* 17(16):6277-88. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-16-06277.1997.
- Lhor, Mustapha, et Christian Saesle. 2014. « Retinol Dehydrogenases: Membrane-Bound Enzymes for the Visual Function ». *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 92(6):510-23. doi: 10.1139/bcb-2014-0082.
- Li, Lingyun, Huan Zhao, Haohuan Xie, Tasneem Akhtar, Yichuan Yao, Yuan Cai, Kai Dong, Yonghao Gu, Jin Bao, Jutao Chen, Mei Zhang, Kai Zhong, Weiping Xu, et Tian Xue. 2021. « Electrophysiological Characterization of Photoreceptor-like Cells in Human Inducible Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Organoids during in Vitro Maturation ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 39(7):959-74. doi: 10.1002/stem.3363.
- Lin, Bin, Richard H. Masland, et Enrica Strettoi. 2009. « Remodeling of Cone Photoreceptor Cells after Rod Degeneration in Rd Mice ». *Experimental Eye Research* 88(3):589-99. doi: 10.1016/j.exer.2008.11.022.
- Linberg, Kenneth A., Geoffrey P. Lewis, Brian Matsumoto, et Steven K. Fisher. 2006. « Immunocytochemical Evidence That Rod-Connected Horizontal Cell Axon Terminals Remodel in Response to Experimental Retinal Detachment in the Cat ». *Molecular Vision*

12:1674-86.

Little, C. W., B. Castillo, D. A. DiLoreto, C. Cox, J. Wyatt, C. del Cerro, et M. del Cerro. 1996. « Transplantation of Human Fetal Retinal Pigment Epithelium Rescues Photoreceptor Cells from Degeneration in the Royal College of Surgeons Rat Retina ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 37(1):204-11.

Liu, Hang, Linzhi Jing, Jie Sun, et Dejian Huang. 2021. « An Overview of Scaffolds for Retinal Pigment Epithelium Research ». *Procedia Manufacturing* 53:492-99. doi: 10.1016/j.promfg.2021.06.051.

Liu, I. S., J. D. Chen, L. Ploder, D. Vidgen, D. van der Kooy, V. I. Kalnins, et R. R. McInnes. 1994. « Developmental Expression of a Novel Murine Homeobox Gene (Chx10): Evidence for Roles in Determination of the Neuroretina and Inner Nuclear Layer ». *Neuron* 13(2):377-93. doi: 10.1016/0896-6273(94)90354-9.

Liu, Wanqin, Shanshan Liu, Ping Li, et Kai Yao. 2022. « Retinitis Pigmentosa: Progress in Molecular Pathology and Biotherapeutical Strategies ». *International Journal of Molecular Sciences* 23(9):4883. doi: 10.3390/ijms23094883.

Loai, Sadi, Benjamin R. Kingston, Zongjie Wang, David N. Philpott, Mingyang Tao, et Hai-Ling Margaret Cheng. 2019. « Clinical Perspectives on 3D Bioprinting Paradigms for Regenerative Medicine ». *Regenerative Medicine Frontiers* 1(1). doi: 10.20900/rmf20190004.

Lu, Bin, Christopher Malcuit, Shaomei Wang, Sergej Girman, Peter Francis, Linda Lemieux, Robert Lanza, et Raymond Lund. 2009. « Long-Term Safety and Function of RPE from Human Embryonic Stem Cells in Preclinical Models of Macular Degeneration ». *STEM CELLS* 27(9):2126-35. doi: <https://doi.org/10.1002/stem.149>.

Lu, Bo, Danhong Zhu, David Hinton, Mark S. Humayun, et Yu-Chong Tai. 2012. « Mesh-Supported Submicron Parylene-C Membranes for Culturing Retinal Pigment Epithelial Cells ». *Biomedical Microdevices* 14(4):659-67. doi: 10.1007/s10544-012-9645-8.

Lu, James T., Christina J. Lee, Stacey F. Bent, Harvey A. Fishman, et Eric E. Sabelman. 2007. « Thin Collagen Film Scaffolds for Retinal Epithelial Cell Culture ». *Biomaterials* 28(8):1486-94. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.11.023.

Lu, L., M. J. Yaszemski, et A. G. Mikos. 2001. « Retinal Pigment Epithelium Engineering Using Synthetic Biodegradable Polymers ». *Biomaterials* 22(24):3345-55. doi: 10.1016/s0142-9612(01)00172-7.

Lund, Raymond D., Shaomei Wang, Irina Klimanskaya, Toby Holmes, Rebeca Ramos-Kelsey, Bin Lu, Sergej Girman, N. Bischoff, Yves Sauvé, et Robert Lanza. 2006. « Human Embryonic Stem Cell-Derived Cells Rescue Visual Function in Dystrophic RCS Rats ». *Cloning and Stem Cells* 8(3):189-99. doi: 10.1089/clo.2006.8.189.

Lund, Raymond D., Shaomei Wang, Bin Lu, Sergej Girman, Toby Holmes, Yves Sauvé, Darin J. Messina, Ian R. Harris, Anthony J. Kihm, Alexander M. Harmon, Feng-Yi Chin, Anna Gosiewska, et Sanjay K. Mistry. 2007. « Cells Isolated from Umbilical Cord Tissue Rescue Photoreceptors and Visual Functions in a Rodent Model of Retinal Disease ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 25(3):602-11. doi: 10.1634/stemcells.2006-0308.

Lv, Zhongping, Lirong Xiao, Yunjing Tang, Yongjiang Chen, et Danian Chen. 2021. « Rb Deficiency Induces P21cip1 Expression and Delays Retinal Degeneration in Rd1 Mice ». *Experimental Eye Research* 210:108701. doi: 10.1016/j.exer.2021.108701.

Ma, Melinda A., et Elizabeth H. Morrison. 2023. « Neuroanatomy, Nucleus Suprachiasmatic ». in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

Ma, Mingming, Bing Li, Mingliang Zhang, Lei Zhou, Fuhua Yang, Feifei Ma, Hui Shao, Qiutang Li, Xiaorong Li, et Xiaomin Zhang. 2020. « Therapeutic Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes on Retinal Detachment ». *Experimental Eye Research* 191:107899. doi: 10.1016/j.exer.2019.107899.

MacLaren, R. E., R. A. Pearson, A. MacNeil, R. H. Douglas, T. E. Salt, M. Akimoto, A. Swaroop, J. C. Sowden, et R. R. Ali. 2006. « Retinal Repair by Transplantation of Photoreceptor Precursors ». *Nature* 444(7116):203-7. doi: 10.1038/nature05161.

Maeda, Tadao, Michiko Mandai, Sunao Sugita, Cody Kime, et Masayo Takahashi. 2022. « Strategies of Pluripotent Stem Cell-Based Therapy for Retinal Degeneration: Update and Challenges ». *Trends in Molecular Medicine* 28(5):388-404. doi: 10.1016/j.molmed.2022.03.001.

Maminishkis, Arvydas, Shan Chen, Stephen Jalickee, Tina Banzon, Guangpu Shi, Fei E. Wang, Todd Ehalt, Jeffrey A. Hammer, et Sheldon S. Miller. 2006. « Confluent Monolayers of Cultured Human Fetal Retinal Pigment Epithelium Exhibit Morphology and Physiology of Native Tissue ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47(8):3612-24. doi: 10.1167/iovs.05-1622.

Mandai, Michiko, Akira Watanabe, Yasuo Kurimoto, Yasuhiko Hirami, Chikako Morinaga, Takashi Daimon, Masashi Fujihara, Hiroshi Akimaru, Noriko Sakai, Yumiko Shibata, Motoki Terada, Yui Nomiya, Shigeki Tanishima, Masahiro Nakamura, Hiroyuki Kamao, Sunao Sugita, Akishi Onishi, Tomoko Ito, Kanako Fujita, Shin Kawamata, Masahiro J. Go, Chikara Shinohara, Ken-Ichiro Hata, Masanori Sawada, Midori Yamamoto, Sachiko Ohta, Yasuo Ohara, Kenichi Yoshida, Junko Kuwahara, Yuko Kitano, Naoki Amano, Masafumi Umekage, Fumiyo Kitaoka, Azusa Tanaka, Chihiro Okada, Naoko Takasu, Seishi Ogawa, Shinya Yamanaka, et Masayo Takahashi. 2017. « Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration ». *The New England Journal of*

Medicine 376(11):1038-46. doi: 10.1056/NEJMoa1608368.

Marc, Robert E., B. W. Jones, C. B. Watt, F. Vazquez-Chona, D. K. Vaughan, et D. T. Organisciak. 2008. « Extreme Retinal Remodeling Triggered by Light Damage: Implications for Age Related Macular Degeneration ». *Molecular Vision* 14:782-806.

Marc, Robert E., Bryan W. Jones, James R. Anderson, Krista Kinard, David W. Marshak, John H. Wilson, Theodore Wensel, et Robert J. Lucas. 2007. « Neural Reprogramming in Retinal Degeneration ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48(7):3364-71. doi: 10.1167/iops.07-0032.

Marc, Robert E., Bryan W. Jones, Carl B. Watt, et Enrica Strettoi. 2003. « Neural Remodeling in Retinal Degeneration ». *Progress in Retinal and Eye Research* 22(5):607-55. doi: 10.1016/s1350-9462(03)00039-9.

Marmorstein, Alan D. 2001. « The Polarity of the Retinal Pigment Epithelium ». *Traffic* 2(12):867-72. doi: 10.1034/j.1600-0854.2001.21202.x.

Marshall, Jan D., Jean Muller, Gayle B. Collin, Gabriella Milan, Stephen F. Kingsmore, Darrell Dinwiddie, Emily G. Farrow, Neil A. Miller, Francesca Favaretto, Pietro Maffei, Hélène Dollfus, Roberto Vettor, et Jürgen K. Naggert. 2015. « Alström Syndrome: Mutation Spectrum of ALMS1 ». *Human Mutation* 36(7):660-68. doi: 10.1002/humu.22796.

Martinez-Vidal, Laura, Valentina Murdica, Chiara Venegoni, Filippo Pederzoli, Marco Bandini, Andrea Necchi, Andrea Salonia, et Massimo Alfano. 2021. « Causal Contributors to Tissue Stiffness and Clinical Relevance in Urology ». *Communications Biology* 4(1):1011. doi: 10.1038/s42003-021-02539-7.

Martins, Albino, Elisabete D. Pinho, Susana Faria, Iva Pashkuleva, Alexandra P. Marques, Rui L. Reis, et Nuno M. Neves. 2009. « Surface Modification of Electrospun Polycaprolactone Nanofiber Meshes by Plasma Treatment to Enhance Biological Performance ». *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 5(10):1195-1206. doi: 10.1002/sml.200801648.

Martins, Rodrigo A. P., et Rachael A. Pearson. 2008. « Control of Cell Proliferation by Neurotransmitters in the Developing Vertebrate Retina ». *Brain Research* 1192:37-60. doi: 10.1016/j.brainres.2007.04.076.

Matsumoto, Erino, Naoshi Koide, Hiroko Hanzawa, Masaharu Kiyama, Mari Ohta, Junichi Kuwabara, Shizu Takeda, et Masayo Takahashi. 2019. « Fabricating Retinal Pigment Epithelial Cell Sheets Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells in an Automated Closed Culture System for Regenerative Medicine ». *PLOS ONE* 14(3):e0212369. doi: 10.1371/journal.pone.0212369.

Matsumoto, Makiko, Yuichi Makino, Tetsuhiro Tanaka, Hirotohi Tanaka, Nobuhiro Ishizaka, Eisei Noiri, Toshiro Fujita, et Masaomi Nangaku. 2003. « Induction of Renoprotective Gene Expression by Cobalt Ameliorates Ischemic Injury of the Kidney in Rats ». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 14(7):1825-32. doi: 10.1097/01.asn.0000074239.22357.06.

Matsuoka, Fumiko, Ichiro Takeuchi, Hideki Agata, Hideaki Kagami, Hirofumi Shiono, Yasujiro Kiyota, Hiroyuki Honda, et Ryuji Kato. 2013. « Morphology-Based Prediction of Osteogenic Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells ». *PLoS One* 8(2):e55082. doi: 10.1371/journal.pone.0055082.

Mattapally, Saidulu, Kevin M. Pawlik, Vladimir G. Fast, Esther Zumaquero, Frances E. Lund, Troy D. Randall, Tim M. Townes, et Jianyi Zhang. 2018. « Human Leukocyte Antigen Class I and II Knockout Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cells: Universal Donor for Cell Therapy ». *Journal of the American Heart Association* 7(23):e010239. doi: 10.1161/JAHA.118.010239.

Maury, Yves, Julien Côme, Rebecca A. Piskorowski, Nouzha Salah-Mohellibi, Vivien Chevalere, Marc Peschanski, Cécile Martinat, et Stéphane Nedelec. 2015. « Combinatorial Analysis of Developmental Cues Efficiently Converts Human Pluripotent Stem Cells into Multiple Neuronal Subtypes ». *Nature Biotechnology* 33(1):89-96. doi: 10.1038/nbt.3049.

McGregor, Juliette E., Tyler Godat, Kamal R. Dhakal, Keith Parkins, Jennifer M. Strazzeri, Brittany A. Bateman, William S. Fischer, David R. Williams, et William H. Merigan. 2020. « Optogenetic restoration of retinal ganglion cell activity in the living primate ». *Nature Communications* 11:1703. doi: 10.1038/s41467-020-15317-6.

McHugh, Kevin J., Sarah L. Tao, et Magali Saint-Geniez. 2014. « Porous Poly(ϵ -Caprolactone) Scaffolds for Retinal Pigment Epithelium Transplantation ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 55(3):1754-62. doi: 10.1167/iops.13-12833.

McLelland, Bryce T., Bin Lin, Anuradha Mathur, Robert B. Aramant, Biju B. Thomas, Gabriel Nistor, Hans S. Keirstead, et Magdalene J. Seiler. 2018. « Transplanted HESC-Derived Retina Organoid Sheets Differentiate, Integrate, and Improve Visual Function in Retinal Degenerate Rats ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 59(6):2586-2603. doi: 10.1167/iops.17-23646.

Mead, Ben, et Stanislav Tomarev. 2020. « Extracellular Vesicle Therapy for Retinal Diseases ». *Progress in Retinal and Eye Research* 79:100849. doi: 10.1016/j.preteyeres.2020.100849.

Mellough, Carla B., Joseph Collin, Mahmoud Khazim, Kathryn White, Evelyne Sernagor, David H. W. Steel, et Majlinda Lako. 2015. « IGF-1 Signaling Plays an Important Role in the Formation of Three-Dimensional Laminated Neural Retina and Other Ocular Structures From Human Embryonic Stem Cells ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 33(8):2416-30. doi: 10.1002/stem.2023.

Menasché, Philippe, Valérie Vanneaux, Albert Hagège, Alain Bel, Bernard Cholley, Alexandre Parouchev, Isabelle Cacciapuoti, Reem

- Al-Daccak, Nadine Benhamouda, Hélène Blons, Onnik Agbulut, Lucie Tosca, Jean-Hugues Trouvin, Jean-Roch Fabreguettes, Valérie Bellamy, Dominique Charron, Eric Tartour, Gérard Tachdjian, Michel Desnos, et Jérôme Larghero. 2018. « Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitors for Severe Ischemic Left Ventricular Dysfunction ». *Journal of the American College of Cardiology* 71(4):429-38. doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.047.
- Meyer, Jason S., Sara E. Howden, Kyle A. Wallace, Amelia D. Verhoeven, Lynda S. Wright, Elizabeth E. Capowski, Isabel Pinilla, Jessica M. Martin, Shulan Tian, Ron Stewart, Bikash Pattnaik, James A. Thomson, et David M. Gamm. 2011. « Optic Vesicle-like Structures Derived from Human Pluripotent Stem Cells Facilitate a Customized Approach to Retinal Disease Treatment ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 29(8):1206-18. doi: 10.1002/stem.674.
- Meyer, Jason S., Rebecca L. Shearer, Elizabeth E. Capowski, Lynda S. Wright, Kyle A. Wallace, Erin L. McMillan, Su-Chun Zhang, et David M. Gamm. 2009. « Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(39):16698-703. doi: 10.1073/pnas.0905245106.
- Miesfeld, Joel B., et Nadean L. Brown. 2019. « Eye Organogenesis: A Hierarchical View of Ocular Development ». P. 351-93 in *Current Topics in Developmental Biology*. Vol. 132. Elsevier.
- Mitchell, Paul, Gerald Liew, Bamini Gopinath, et Tien Y. Wong. 2018. « Age-Related Macular Degeneration ». *The Lancet* 392(10153):1147-59. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31550-2.
- Moraru, Andreea Dana, Dănuț Costin, Raluca Eugenia Iorga, Mihnea Munteanu, Radu Lucian Moraru, et Daniel Constantin Branisteanu. 2022. « Current trends in gene therapy for retinal diseases (Review) ». *Experimental and Therapeutic Medicine* 23(1):26. doi: 10.3892/etm.2021.10948.
- Morizur, Lise, Elise Herardot, Christelle Monville, et Karim Ben M'Barek. 2020. « Human pluripotent stem cells: A toolbox to understand and treat retinal degeneration ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 107:103523. doi: 10.1016/j.mcn.2020.103523.
- Nakano, Tokushige, Satoshi Ando, Nozomu Takata, Masako Kawada, Keiko Muguruma, Kiyotoshi Sekiguchi, Koichi Saito, Shigenobu Yonemura, Mototsugu Eiraku, et Yoshiki Sasai. 2012. « Self-Formation of Optic Cups and Storable Stratified Neural Retina from Human ESCs ». *Cell Stem Cell* 10(6):771-85. doi: 10.1016/j.stem.2012.05.009.
- Nasser, Fadi, Nicole Weisschuh, Pietro Maffei, Gabriella Milan, Corina Heller, Eberhart Zrenner, Susanne Kohl, et Laura Kuehlewein. 2018. « Ophthalmic Features of Cone-Rod Dystrophy Caused by Pathogenic Variants in the ALMS1 Gene ». *Acta Ophthalmologica* 96(4):e445-54. doi: 10.1111/aos.13612.
- Neeley, William L., Stephen Redenti, Henry Klassen, Sarah Tao, Tejal Desai, Michael J. Young, et Robert Langer. 2008. « A Microfabricated Scaffold for Retinal Progenitor Cell Grafting ». *Biomaterials* 29(4):418-26. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.10.007.
- Nekouian, Soraya, Mahdi Sojoodi, et Samad Nadri. 2019. « Fabrication of Conductive Fibrous Scaffold for Photoreceptor Differentiation of Mesenchymal Stem Cell ». *Journal of Cellular Physiology*. doi: 10.1002/jcp.28238.
- Ng, L., J. B. Hurley, B. Dierks, M. Srinivas, C. Saltó, B. Vennström, T. A. Reh, et D. Forrest. 2001. « A Thyroid Hormone Receptor That Is Required for the Development of Green Cone Photoreceptors ». *Nature Genetics* 27(1):94-98. doi: 10.1038/83829.
- Ni, Y., Y. Qin, Z. Fang, et Z. Zhang. 2017. « ROCK Inhibitor Y-27632 Promotes Human Retinal Pigment Epithelium Survival by Altering Cellular Biomechanical Properties ». *Current Molecular Medicine* 17(9):637-46. doi: 10.2174/1566524018666180316150936.
- Nii, Teruki, et Yoshiki Katayama. 2021. « Biomaterial-Assisted Regenerative Medicine ». *International Journal of Molecular Sciences* 22(16):8657. doi: 10.3390/ijms22168657.
- Nishida, Mitsuhiro, Yuji Tanaka, Yo Tanaka, Satoshi Amaya, Nobuyuki Tanaka, Hirofumi Uyama, Tomohiro Masuda, Akishi Onishi, Junki Sho, Satoshi Yokota, Masayo Takahashi, et Michiko Mandai. 2021. « Human iPS cell derived RPE strips for secure delivery of graft cells at a target place with minimal surgical invasion ». *Scientific Reports* 11:21421. doi: 10.1038/s41598-021-00703-x.
- Nittala, Muneeswar Gupta, Ravi Metlapally, Michael Ip, Usha Chakravarthy, Frank G. Holz, Giovanni Staurenghi, Nadia Waheed, Swetha Bindu Velaga, Sophiana Lindenberg, Ayesha Karamat, John Koester, Ramiro Ribeiro, et Srinivas Sadda. 2022. « Association of Pegcetacoplan With Progression of Incomplete Retinal Pigment Epithelium and Outer Retinal Atrophy in Age-Related Macular Degeneration: A Post Hoc Analysis of the FILLY Randomized Clinical Trial ». *JAMA Ophthalmology* 140(3):243-49. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2021.6067.
- Niwa, Masayuki, Hitomi Aoki, Akihiro Hirata, Hirofumi Tomita, Paul G. Green, et Akira Hara. 2016. « Retinal Cell Degeneration in Animal Models ». *International Journal of Molecular Sciences* 17(1):110. doi: 10.3390/ijms17010110.
- Noguchi, Hirofumi, Chika Miyagi-Shiohira, et Yoshiki Nakashima. 2018. « Induced Tissue-Specific Stem Cells and Epigenetic Memory in Induced Pluripotent Stem Cells ». *International Journal of Molecular Sciences* 19(4):930. doi: 10.3390/ijms19040930.
- Oh, Edwin C. T., Hong Cheng, Hong Hao, Lin Jia, Naheed Wali Khan, et Anand Swaroop. 2008. « Rod differentiation factor NRL activates the expression of nuclear receptor NR2E3 to suppress the development of cone photoreceptors ». *Brain research* 1236:16-29. doi: 10.1016/j.brainres.2008.01.028.

- Oh, Jin Kyun, Yan Nuzbrokh, Jose Ronaldo Lima de Carvalho, Joseph Ryu, et Stephen H. Tsang. 2020. « Optical Coherence Tomography in the Evaluation of Retinitis Pigmentosa ». *Ophthalmic genetics* 41(5):413-19. doi: 10.1080/13816810.2020.1780619.
- O'Hara-Wright, Michelle, et Anai Gonzalez-Cordero. 2020. « Retinal Organoids: A Window into Human Retinal Development ». *Development (Cambridge, England)* 147(24):dev189746. doi: 10.1242/dev.189746.
- Ohno-Matsui, Kyoko, Keisuke Mori, Shizuko Ichinose, Tetsuji Sato, Jiying Wang, Noriaki Shimada, Ariko Kojima, Manabu Mochizuki, et Ikuo Morita. 2006. « In Vitro and in Vivo Characterization of Iris Pigment Epithelial Cells Cultured on Amniotic Membranes ». *Molecular Vision* 12:1022-32.
- Ohnuki, Mari, et Kazutoshi Takahashi. 2015. « Present and Future Challenges of Induced Pluripotent Stem Cells ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 370(1680):20140367. doi: 10.1098/rstb.2014.0367.
- Okita, Keisuke, Tomoko Ichisaka, et Shinya Yamanaka. 2007. « Generation of Germline-Competent Induced Pluripotent Stem Cells ». *Nature* 448(7151):313-17. doi: 10.1038/nature05934.
- O'Leary, Fionn, et Matthew Campbell. 2023. « The Blood-Retina Barrier in Health and Disease ». *The FEBS Journal* 290(4):878-91. doi: 10.1111/febs.16330.
- O'Neal, Teri B., et Euil E. Luther. 2023. « Retinitis Pigmentosa ». in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Ortin-Martinez, Arturo, En Leh Samuel Tsai, Philip E. Nickerson, Miriam Bergeret, Yao Lu, Sheila Smiley, Lacrimioara Comanita, et Valerie A. Wallace. 2017. « A Reinterpretation of Cell Transplantation: GFP Transfer From Donor to Host Photoreceptors ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 35(4):932-39. doi: 10.1002/stem.2552.
- Ortin-Martinez, Arturo, Nicole E. Yan, En Leh Samuel Tsai, Lacrimioara Comanita, Akshay Gurdita, Nobuhiko Tachibana, Zhongda C. Liu, Suying Lu, Parnian Dolati, Neno T. Pokrajac, Ahmed El-Sehemy, Philip E. B. Nickerson, Carol Schuurmans, Rod Bremner, et Valerie A. Wallace. 2021. « Photoreceptor Nanotubes Mediate the in Vivo Exchange of Intracellular Material ». *The EMBO Journal* 40(22):e107264. doi: 10.15252/embj.2020107264.
- Ortolan, Davide, Ruchi Sharma, Andrei Volkov, Arvydas Maminishkis, Nathan A. Hotaling, Laryssa A. Huryn, Catherine Cukras, Stefano Di Marco, Silvia Bisti, et Kapil Bharti. 2022. « Single-cell-resolution map of human retinal pigment epithelium helps discover subpopulations with differential disease sensitivity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119(19):e2117553119. doi: 10.1073/pnas.2117553119.
- Osakada, Fumitaka, Hanako Ikeda, Michiko Mandai, Takafumi Wataya, Kiichi Watanabe, Nagahisa Yoshimura, Akinori Akaïke, Akiori Akaïke, Yoshiki Sasai, et Masayo Takahashi. 2008. « Toward the Generation of Rod and Cone Photoreceptors from Mouse, Monkey and Human Embryonic Stem Cells ». *Nature Biotechnology* 26(2):215-24. doi: 10.1038/nbt1384.
- Osakada, Fumitaka, Zi-Bing Jin, Yasuhiko Hirami, Hanako Ikeda, Teruko Danjyo, Kiichi Watanabe, Yoshiki Sasai, et Masayo Takahashi. 2009. « In Vitro Differentiation of Retinal Cells from Human Pluripotent Stem Cells by Small-Molecule Induction ». *Journal of Cell Science* 122(Pt 17):3169-79. doi: 10.1242/jcs.050393.
- Ouyang, Xiao Mei, Denise Yan, Li Lin Du, J. Fielding. Hejtmancik, Samuel G. Jacobson, Walter E. Nance, An Ren Li, Simon Angeli, Muriel Kaiser, Valerie Newton, Steve D. M. Brown, Thomas Balkany, et Xue Zhong Liu. 2005. « Characterization of Usher Syndrome Type I Gene Mutations in an Usher Syndrome Patient Population ». *Human Genetics* 116(4):292-99. doi: 10.1007/s00439-004-1227-2.
- Pagan-Mercado, Glorivee, et S. Patricia Becerra. 2019. « Signaling Mechanisms Involved in PEDF-Mediated Retinoprotection ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1185:445-49. doi: 10.1007/978-3-030-27378-1_73.
- Pagon, R. A. 1988. « Retinitis Pigmentosa ». *Survey of Ophthalmology* 33(3):137-77. doi: 10.1016/0039-6257(88)90085-9.
- Paisey, Richard B., Rick Steeds, Tim Barrett, Denise Williams, Tarekegn Geberhiwot, et Meral Gunay-Aygun. 1993. « Alström Syndrome ». in *GeneReviews®*, édité par M. P. Adam, G. M. Mirzaa, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, K. W. Gripp, et A. Amemiya. Seattle (WA): University of Washington, Seattle.
- Palanker, Daniel, Yannick Le Mer, Saddek Mohand-Said, Mahiul Muqit, et Jose A. Sahel. 2020. « Photovoltaic Restoration of Central Vision in Atrophic Age-Related Macular Degeneration ». *Ophthalmology* 127(8):1097-1104. doi: 10.1016/j.ophtha.2020.02.024.
- Pandey, Suresh K., et Vidushi Sharma. 2021. « Commentary: Cataract Surgery in Retinitis Pigmentosa ». *Indian Journal of Ophthalmology* 69(7):1757. doi: 10.4103/ijo.IJO_655_21.
- Parker, Ryan O., et Rosalie K. Crouch. 2010. « Retinol Dehydrogenases (RDHs) in the Visual Cycle ». *Experimental Eye Research* 91(6):788-92. doi: 10.1016/j.exer.2010.08.013.
- Pearson, R. A., A. C. Barber, M. Rizzi, C. Hippert, T. Xue, E. L. West, Y. Duran, A. J. Smith, J. Z. Chuang, S. A. Azam, U. F. O. Luhmann, A. Benucci, C. H. Sung, J. W. Bainbridge, M. Carandini, K. W. Yau, J. C. Sowden, et R. R. Ali. 2012. « Restoration of Vision after Transplantation of Photoreceptors ». *Nature* 485(7396):99-103. doi: 10.1038/nature10997.
- Pearson, R. A., A. Gonzalez-Cordero, E. L. West, J. R. Ribeiro, N. Aghaizu, D. Goh, R. D. Sampson, A. Georgiadis, P. V. Waldron, Y.

- Duran, A. Naeem, M. Kloc, E. Cristante, K. Kruczek, K. Warre-Cornish, J. C. Sowden, A. J. Smith, et R. R. Ali. 2016. « Donor and Host Photoreceptors Engage in Material Transfer Following Transplantation of Post-Mitotic Photoreceptor Precursors ». *Nature Communications* 7(1):13029. doi: 10.1038/ncomms13029.
- Pennesi, Mark E., Keith V. Michaels, Sienna S. Magee, Anastasiya Maricle, Sean P. Davin, Anupam K. Garg, Michael J. Gale, Daniel C. Tu, Yuquan Wen, Laura R. Erker, et Peter J. Francis. 2012. « Long-Term Characterization of Retinal Degeneration in rd1 and rd10 Mice Using Spectral Domain Optical Coherence Tomography ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53(8):4644-56. doi: 10.1167/iovs.12-9611.
- Pennington, Britney O., Jeffrey K. Bailey, Mohamed A. Faynus, Cassidy Hinman, Mitchell N. Hee, Rory Ritts, Vignesh Nadar, Danhong Zhu, Debbie Mitra, Juan Carlos Martinez-Camarillo, Tai-Chi Lin, Biju B. Thomas, David R. Hinton, Mark S. Humayun, Jane Lebkowski, Lincoln V. Johnson, et Dennis O. Clegg. 2021. « Xeno-Free Cryopreservation of Adherent Retinal Pigmented Epithelium Yields Viable and Functional Cells in Vitro and in Vivo ». *Scientific Reports* 11(1):6286. doi: 10.1038/s41598-021-85631-6.
- Pezaris, John S., et Emad N. Eskandar. 2009. « Getting Signals into the Brain: Visual Prosthetics through Thalamic Microstimulation ». *Neurosurgical Focus* 27(1):E6. doi: 10.3171/2009.4.FOCUS0986.
- Pfau, Maximilian, Steffen Schmitz-Valckenberg, Ramiro Ribeiro, Reza Safaei, Alex McKeown, Monika Fleckenstein, et Frank G. Holz. 2022. « Association of complement C3 inhibitor pegcetacoplan with reduced photoreceptor degeneration beyond areas of geographic atrophy ». *Scientific Reports* 12:17870. doi: 10.1038/s41598-022-22404-9.
- Pfeffer, Bruce A., et Steven J. Fliesler. 2022. « Reassessing the Suitability of ARPE-19 Cells as a Valid Model of Native RPE Biology ». *Experimental Eye Research* 219:109046. doi: 10.1016/j.exer.2022.109046.
- Pfeiffer, Rebecca L., Robert E. Marc, et Bryan William Jones. 2020. « Persistent Remodeling and Neurodegeneration in Late-Stage Retinal Degeneration ». *Progress in Retinal and Eye Research* 74:100771. doi: 10.1016/j.preteyeres.2019.07.004.
- Phillips, M. Joseph, Kyle A. Wallace, Sarah J. Dickerson, Michael J. Miller, Amelia D. Verhoeven, Jessica M. Martin, Lynda S. Wright, Wei Shen, Elizabeth E. Capowski, E. Ferda Percin, Enio T. Perez, Xiufeng Zhong, Maria V. Canto-Soler, et David M. Gamm. 2012. « Blood-Derived Human IPS Cells Generate Optic Vesicle-like Structures with the Capacity to Form Retinal Laminae and Develop Synapses ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53(4):2007-19. doi: 10.1167/iovs.11-9313.
- Phillips, Stephen J., Srinivas R. Sadda, Mark O. M. Tso, Mark S. Humayan, Eugene de Juan, et Susanne Binder. 2003. « Autologous Transplantation of Retinal Pigment Epithelium after Mechanical Debridement of Bruch's Membrane ». *Current Eye Research* 26(2):81-88. doi: 10.1076/ceyr.26.2.81.14508.
- Philp, Nancy J., Dian Wang, Heeyong Yoon, et Leonard M. Hjelmeland. 2003. « Polarized Expression of Monocarboxylate Transporters in Human Retinal Pigment Epithelium and ARPE-19 Cells ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44(4):1716-21. doi: 10.1167/iovs.02-0287.
- Piccolo, S., E. Agius, L. Leyns, S. Bhattacharyya, H. Grunz, T. Bouwmeester, et E. M. De Robertis. 1999. « The Head Inducer Cerberus Is a Multifunctional Antagonist of Nodal, BMP and Wnt Signals ». *Nature* 397(6721):707-10. doi: 10.1038/17820.
- Pierrottet, C. O., M. Zuntini, M. Digiuni, I. Bazzanella, P. Ferri, R. Paderni, L. M. Rossetti, S. Cecchin, N. Orzalesi, et M. Bertelli. 2014. « Syndromic and Non-Syndromic Forms of Retinitis Pigmentosa: A Comprehensive Italian Clinical and Molecular Study Reveals New Mutations ». *Genetics and Molecular Research* 13(4):8815-33. doi: 10.4238/2014.October.27.23.
- Plodinec, Marija, Marko Loparic, Christophe A. Monnier, Ellen C. Obermann, Rosanna Zanetti-Dallenbach, Philipp Oertle, Janne T. Hyotyla, Ueli Aebi, Mohamed Bentires-Alj, Roderick Y. H. Lim, et Cora-Ann Schoenenberger. 2012. « The Nanomechanical Signature of Breast Cancer ». *Nature Nanotechnology* 7(11):757-65. doi: 10.1038/nnano.2012.167.
- Prado, Dominic A., Marcy Acosta-Acero, et Ramiro S. Maldonado. 2020. « Gene Therapy beyond Luxturna: A New Horizon of the Treatment for Inherited Retinal Disease ». *Current Opinion in Ophthalmology* 31(3):147-54. doi: 10.1097/ICU.0000000000000660.
- Prem Senthil, M., J. Khadka, et K. Pesudovs. 2017. « Seeing through Their Eyes: Lived Experiences of People with Retinitis Pigmentosa ». *Eye* 31(5):741-48. doi: 10.1038/eye.2016.315.
- Purves, Dale, George J. Augustine, David Fitzpatrick, Lawrence C. Katz, Anthony-Samuel LaMantia, James O. McNamara, et S. Mark Williams. 2001. « The Retina ». *Neuroscience. 2nd Edition*.
- Rachitskaya, Aleksandra V., et Alex Yuan. 2016. « Argus II Retinal Prosthesis System: An Update ». *Ophthalmic Genetics* 37(3):260-66. doi: 10.3109/13816810.2015.1130152.
- Radtke, Norman D., Robert B. Aramant, Heywood M. Petry, Parke T. Green, Diane J. Pidwell, et Magdalene J. Seiler. 2008. « Vision Improvement in Retinal Degeneration Patients by Implantation of Retina Together with Retinal Pigment Epithelium ». *American Journal of Ophthalmology* 146(2):172-82. doi: 10.1016/j.ajo.2008.04.009.
- Ranaei Pirmardan, Ehsan, Zahra-Soheila Soheili, Shahram Samiei, Hamid Ahmadi, Seyed Javad Mowlala, Marzieh Naseri, et Narsis Daftarian. 2018. « In Vivo Evaluation of PAX6 Overexpression and NMDA Cytotoxicity to Stimulate Proliferation in the Mouse

- Retina ». *Scientific Reports* 8(1):17700. doi: 10.1038/s41598-018-35884-5.
- Reese, Benjamin E. 2011. « Development of the Retina and Optic Pathway ». *Vision Research* 51(7):613-32. doi: 10.1016/j.visres.2010.07.010.
- Regent, Florian, Lise Morizur, Léa Lesueur, Walter Habeler, Alexandra Plancheron, Karim Ben M'Barek, et Christelle Monville. 2019. « Automation of human pluripotent stem cell differentiation toward retinal pigment epithelial cells for large-scale productions ». *Scientific Reports* 9:10646. doi: 10.1038/s41598-019-47123-6.
- Reichenbach, Andreas, et Andreas Bringmann. 2013. « New Functions of Müller Cells ». *Glia* 61(5):651-78. doi: 10.1002/glia.22477.
- Reichman, Sacha, Amélie Slembrouck, Giuliana Gagliardi, Antoine Chaffiol, Angélique Terray, Céline Nanteau, Anais Potey, Morgane Belle, Oriane Rabesandratana, Jens Duebel, Gaël Orioux, Emeline F. Nandrot, José-Alain Sahel, et Olivier Goureau. 2017. « Generation of Storable Retinal Organoids and Retinal Pigmented Epithelium from Adherent Human IPS Cells in Xeno-Free and Feeder-Free Conditions ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 35(5):1176-88. doi: 10.1002/stem.2586.
- Reichman, Sacha, Angélique Terray, Amélie Slembrouck, Céline Nanteau, Gaël Orioux, Walter Habeler, Emeline F. Nandrot, José-Alain Sahel, Christelle Monville, et Olivier Goureau. 2014. « 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(23):8518-23. doi: 10.1073/pnas.1324212111.
- Ribeiro, Joana, Christopher A. Procyk, Emma L. West, Michelle O'Hara-Wright, Monica F. Martins, Majid Moshtagh Khorasani, Aura Hare, Mark Basche, Milan Fernando, Debbie Goh, Neeraj Jumbo, Matteo Rizzi, Kate Powell, Menahil Tariq, Michel Michaelides, James W. B. Bainbridge, Alexander J. Smith, Rachael A. Pearson, Anai Gonzalez-Cordero, et Robin R. Ali. 2021. « Restoration of Visual Function in Advanced Disease after Transplantation of Purified Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cone Photoreceptors ». *Cell Reports* 35(3):109022. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109022.
- Rigaudière, Florence. 2012. « III-1 : LA RETINE : ORGANISATION SCHEMATIQUE ». in *OEIL ET PHYSIOLOGIE DE LA VISION*. Rigaudière(Florence).
- Rizzolo, Lawrence. 2008. « Glucose Transporters in Retinal Pigment Epithelium Development ». P. 185-99 in *Ophthalmology Research: Ocular Transporters in Ophthalmic Diseases and Drug Delivery*.
- Rizzolo, Lawrence J., Igor O. Nasonkin, et Ron A. Adelman. 2022. « Retinal Cell Transplantation, Biomaterials, and In Vitro Models for Developing Next-Generation Therapies of Age-Related Macular Degeneration ». *Stem Cells Translational Medicine* 11(3):269-81. doi: 10.1093/stcltm/szac001.
- Rodgers, Jessica, Steven Hughes, Moritz Lindner, Annette E. Allen, Aghileh S. Ebrahimi, Riccardo Storchi, Stuart N. Peirson, Robert J. Lucas, et Mark W. Hankins. 2023. « Functional Integrity of Visual Coding Following Advanced Photoreceptor Degeneration ». *Current Biology: CB* 33(3):474-486.e5. doi: 10.1016/j.cub.2022.12.026.
- Rogulska, Olena, Jarmila Havelkova, et Yuriy Petrenko. 2023. « Cryopreservation of Organoids ». *Cryoletters* 44(2):65-75. doi: 10.54680/fr23210110112.
- Rolling, F., Guylène Le Meur, Knut Stieger, Alexander J. Smith, Michel Weber, Jack Yves Deschamps, Delphine Nivard, Alexandra Mendes-Madeira, Nathalie Provost, Yann Péréon, Yan Cherel, Robin R. Ali, Christian Hamel, Philippe Moullier, et Fabienne Rolling. 2006. « Gene Therapeutic Prospects in Early Onset of Severe Retinal Dystrophy: Restoration of Vision in RPE65 Briard Dogs Using an AAV Serotype 4 Vector That Specifically Targets the Retinal Pigmented Epithelium ». *Bulletin Et Memoires De l'Academie Royale De Medecine De Belgique* 161(10-12):497-508; discussion 508-509.
- Roska, Botond, et José-Alain Sahel. 2018. « Restoring Vision ». *Nature* 557(7705):359-67. doi: 10.1038/s41586-018-0076-4.
- Roy, Achira, Jimmy de Melo, Dhananjay Chaturvedi, Thuzar Thein, Alfredo Cabrera-Socorro, Corinne Houart, Gundela Meyer, Seth Blackshaw, et Shubha Tole. 2013. « LHX2 Is Necessary for the Maintenance of Optic Identity and for the Progression of Optic Morphogenesis ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33(16):6877-84. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4216-12.2013.
- Rózanowski, Bartosz, Janice M. Burke, Michael E. Boulton, Tadeusz Sarna, et Małgorzata Rózanowska. 2008. « Human RPE Melanosomes Protect from Photosensitized and Iron-Mediated Oxidation but Become Pro-oxidant in the Presence of Iron upon Photodegradation ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49(7):2838-47. doi: 10.1167/iovs.08-1700.
- Ruiz-Alonso, Sandra, Ilia Villate-Beitia, Idoia Gallego, Markel Lafuente-Merchan, Gustavo Puras, Laura Saenz-del-Burgo, et José Luis Pedraz. 2021. « Current Insights into 3D Bioprinting: An Advanced Approach for Eye Tissue Regeneration ». *Pharmaceutics* 13(3):308. doi: 10.3390/pharmaceutics13030308.
- Saari, J. C., et D. L. Bredberg. 1989. « Lecithin:Retinol Acyltransferase in Retinal Pigment Epithelial Microsomes ». *The Journal of Biological Chemistry* 264(15):8636-40.
- Sahel, José-Alain, Elise Boulanger-Scemama, Chloé Pagot, Angelo Arleo, Francesco Galluppi, Joseph N. Martel, Simona Degli Esposti,

- Alexandre Delaux, Jean-Baptiste de Saint Aubert, Caroline de Montleau, Emmanuel Gutman, Isabelle Audo, Jens Duebel, Serge Picaud, Deniz Dalkara, Laure Blouin, Magali Taiel, et Botond Roska. 2021. « Partial Recovery of Visual Function in a Blind Patient after Optogenetic Therapy ». *Nature Medicine* 27(7):1223-29. doi: 10.1038/s41591-021-01351-4.
- Sakai, Daiki, Hiroshi Tomita, et Akiko Maeda. 2022. « Optogenetic Therapy for Visual Restoration ». *International Journal of Molecular Sciences* 23(23):15041. doi: 10.3390/ijms232315041.
- Salesse, C. 2017. « [Physiology of the visual retinal signal: From phototransduction to the visual cycle] ». *Journal Francais D'ophtalmologie* 40(3):239-50. doi: 10.1016/j.jfo.2016.12.006.
- Sanjurjo-Soriano, Carla, Nejla Erkilic, Krishna Damodar, Hassan Boukhaddaoui, Michalitsa Diakatou, Marcela Garita-Hernandez, Daria Mamaeva, Gregor Dubois, Zhour Jazouli, Carla Jimenez-Medina, Olivier Goureau, Isabelle Meunier, et Vasiliki Kalatzis. 2022. « Retinoic Acid Delays Initial Photoreceptor Differentiation and Results in a Highly Structured Mature Retinal Organoid ». *Stem Cell Research & Therapy* 13(1):478. doi: 10.1186/s13287-022-03146-x.
- Santos-Ferreira, Tiago, Sílvia Llonch, Oliver Borsch, Kai Postel, Jochen Haas, et Marius Ader. 2016. « Retinal Transplantation of Photoreceptors Results in Donor-Host Cytoplasmic Exchange ». *Nature Communications* 7:13028. doi: 10.1038/ncomms13028.
- Sarna, Michal, Magdalena Olchawa, Andrzej Zadło, Dawid Wnuk, et Tadeusz Sarna. 2017. « The Nanomechanical Role of Melanin Granules in the Retinal Pigment Epithelium ». *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 13(3):801-7. doi: 10.1016/j.nano.2016.11.020.
- Sasaki, Hiroto, Ichiro Takeuchi, Mai Okada, Rumi Sawada, Kei Kanie, Yasujiro Kiyota, Hiroyuki Honda, et Ryuji Kato. 2014. « Label-Free Morphology-Based Prediction of Multiple Differentiation Potentials of Human Mesenchymal Stem Cells for Early Evaluation of Intact Cells ». *PLoS One* 9(4):e93952. doi: 10.1371/journal.pone.0093952.
- Sayed, Nilofer, Prince Allawadhi, Amit Khurana, Vishakha Singh, Umashanker Navik, Sravan Kumar Pasumarthi, Isha Khurana, Anil Kumar Banothu, Ralf Weiskirchen, et Kala Kumar Bharani. 2022. « Gene Therapy: Comprehensive Overview and Therapeutic Applications ». *Life Sciences* 294:120375. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120375.
- Schmidt, Ryan, et Kathrin Plath. 2012. « The roles of the reprogramming factors Oct4, Sox2 and Klf4 in resetting the somatic cell epigenome during induced pluripotent stem cell generation ». *Genome Biology* 13(10):251. doi: 10.1186/gb-2012-13-10-251.
- Schmidt, Tiffany M., Michael Tri H. Do, Dennis Dacey, Robert Lucas, Samer Hattar, et Anna Matynia. 2011. « Melanopsin-Positive Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells: From Form to Function ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31(45):16094-101. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4132-11.2011.
- Schnapf, J. L., B. J. Nunn, M. Meister, et D. A. Baylor. 1990. « Visual Transduction in Cones of the Monkey *Macaca Fascicularis* ». *The Journal of Physiology* 427:681-713. doi: 10.1113/jphysiol.1990.sp018193.
- Schraermeyer, U., V. Enzmann, L. Kohen, K. Addicks, P. Wiedemann, et K. Heimann. 1997. « Porcine Iris Pigment Epithelial Cells Can Take up Retinal Outer Segments ». *Experimental Eye Research* 65(2):277-87. doi: 10.1006/exer.1997.0339.
- Schwartz, Shalom H., Jan Ciecuch, Michele Vecchione, Eldad Davidov, Ronald Fischer, Constanze Beierlein, Alice Ramos, Markku Verkasalo, Jan-Erik Lönnqvist, Kursad Demirutku, Ozlem Dirilen-Gumus, et Mark Konty. 2012. « Refining the Theory of Basic Individual Values ». *Journal of Personality and Social Psychology* 103(4):663-88. doi: 10.1037/a0029393.
- Schwartz, Steven D., Jean-Pierre Hubschman, Gad Heilwell, Valentina Franco-Cardenas, Carolyn K. Pan, Rosaleen M. Ostrick, Edmund Mickunas, Roger Gay, Irina Klimanskaya, et Robert Lanza. 2012. « Embryonic Stem Cell Trials for Macular Degeneration: A Preliminary Report ». *Lancet (London, England)* 379(9817):713-20. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60028-2.
- Schwartz, Steven D., Carl D. Regillo, Byron L. Lam, Dean Elliott, Philip J. Rosenfeld, Ninel Z. Gregori, Jean-Pierre Hubschman, Janet L. Davis, Gad Heilwell, Marc Sporn, Joseph Maguire, Roger Gay, Jane Bateman, Rosaleen M. Ostrick, Debra Morris, Matthew Vincent, Eddy Anglade, Lucian V. Del Priore, et Robert Lanza. 2015. « Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium in Patients with Age-Related Macular Degeneration and Stargardt's Macular Dystrophy: Follow-up of Two Open-Label Phase 1/2 Studies ». *Lancet (London, England)* 385(9967):509-16. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61376-3.
- Schwartz, Steven D., Gavin Tan, Hamid Hosseini, et Aaron Nagiel. 2016. « Subretinal Transplantation of Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium for the Treatment of Macular Degeneration: An Assessment at 4 Years ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 57(5):ORSFc1-9. doi: 10.1167/iovs.15-18681.
- Sengupta, Abhishek, Antoine Chaffiol, Emilie Macé, Romain Caplette, Mélissa Desrosiers, Maruša Lampič, Valérie Forster, Olivier Marre, John Y. Lin, José-Alain Sahel, Serge Picaud, Deniz Dalkara, et Jens Duebel. 2016. « Red-Shifted Channelrhodopsin Stimulation Restores Light Responses in Blind Mice, Macaque Retina, and Human Retina ». *EMBO Molecular Medicine* 8(11):1248-64. doi: 10.15252/emmm.201505699.
- Sethi, Charanjit S., Geoffrey P. Lewis, Steven K. Fisher, William P. Leitner, Derrick L. Mann, Philip J. Luthert, et David G. Charteris. 2005. « Glial Remodeling and Neural Plasticity in Human Retinal Detachment with Proliferative Vitreoretinopathy ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46(1):329-42. doi: 10.1167/iovs.03-0518.

- Shabajee, Preety, Albane Gaudeau, Céline Legros, Thierry Dorval, et Jean-Philippe Stéphan. 2021. « Du criblage à haut contenu à la déconvolution de cibles - Nouvelle donne pour les approches phénotypiques ». *médecine/sciences* 37(3):249-57. doi: 10.1051/medsci/2021013.
- Shadforth, Audra M. A., Karina A. George, Anthony S. Kwan, Traian V. Chirila, et Damien G. Harkin. 2012. « The Cultivation of Human Retinal Pigment Epithelial Cells on Bombyx Mori Silk Fibroin ». *Biomaterials* 33(16):4110-17. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.02.040.
- Sharma, Ruchi, Vladimir Khristov, Aaron Rising, Balendu Shekhar Jha, Roba Dejene, Nathan Hotaling, Yichao Li, Jonathan Stoddard, Casey Stankewicz, Qin Wan, Connie Zhang, Mercedes Maria Campos, Kiyoharu J. Miyagishima, David McGaughey, Rafael Villasmil, Mary Mattapallil, Boris Stanzel, Haohua Qian, Wai Wong, Lucas Chase, Steve Charles, Trevor McGill, Sheldon Miller, Arvydas Maminishkis, Juan Amaral, et Kapil Bharti. 2019. « Clinical-Grade Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Patch Rescues Retinal Degeneration in Rodents and Pigs ». *Science Translational Medicine* 11(475):eaat5580. doi: 10.1126/scitranslmed.aat5580.
- Sharpe, Lindsay T., et Andrew Stockman. 1999. « Rod Pathways: The Importance of Seeing Nothing ». *Trends in Neurosciences* 22(11):497-504. doi: 10.1016/S0166-2236(99)01458-7.
- Sheng, Y., P. Gouras, H. Cao, L. Berglin, H. Kjeldbye, R. Lopez, et H. Rosskothén. 1995. « Patch Transplants of Human Fetal Retinal Pigment Epithelium in Rabbit and Monkey Retina ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 36(2):381-90.
- Shi, Lei, Wenjing Li, Yang Liu, Zhenyu Chen, Yi Hui, Pengcheng Hao, Xiangjie Xu, Shuwei Zhang, Hexi Feng, Bowen Zhang, Shanshan Zhou, Nan Li, Lei Xiao, Ling Liu, Lin Ma, et Xiaoqing Zhang. 2020. « Generation of Hypoimmunogenic Human Pluripotent Stem Cells via Expression of Membrane-Bound and Secreted B2m-HLA-G Fusion Proteins ». *STEM CELLS* 38(11):1423-37. doi: 10.1002/stem.3269.
- Shi, Pujiang, Tan Yong Sheng Edgar, Wai Yee Yeong, et Augustinus Laude. 2017. « Hybrid Three-Dimensional (3D) Bioprinting of Retina Equivalent for Ocular Research ». *International Journal of Bioprinting* 3(2):008. doi: 10.18063/IJB.2017.02.008.
- Shirai, Hiroshi, et Michiko Mandai. 2016. « Retinal Regeneration by Transplantation of Retinal Tissue Derived from Human Embryonic or Induced Pluripotent Stem Cells ». *Inflammation and Regeneration* 36(1):2. doi: 10.1186/s41232-016-0004-7.
- Shirai, Hiroshi, Michiko Mandai, Keizo Matsushita, Atsushi Kuwahara, Shigenobu Yonemura, Tokushige Nakano, Juthaporn Assawachananont, Toru Kimura, Koichi Saito, Hiroko Terasaki, Mototsugu Eiraku, Yoshiki Sasai, et Masayo Takahashi. 2016. « Transplantation of human embryonic stem cell-derived retinal tissue in two primate models of retinal degeneration ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(1):E81-90. doi: 10.1073/pnas.1512590113.
- Shrestha, Arwin, Brittany N. Allen, Luke A. Wiley, Budd A. Tucker, et Kristan S. Worthington. 2020. « Development of High-Resolution Three-Dimensional-Printed Extracellular Matrix Scaffolds and Their Compatibility with Pluripotent Stem Cells and Early Retinal Cells ». *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics: The Official Journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* 36(1):42-55. doi: 10.1089/jop.2018.0146.
- Simó, Rafael, Marta Villarrol, Lúdia Corraliza, Cristina Hernández, et Marta Garcia-Ramírez. 2010. « The Retinal Pigment Epithelium: Something More than a Constituent of the Blood-Retinal Barrier—Implications for the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy ». *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010:e190724. doi: 10.1155/2010/190724.
- Simunovic, M. P., W. Shen, J. Y. Lin, D. A. Protti, L. Lisowski, et M. C. Gillies. 2019. « Optogenetic Approaches to Vision Restoration ». *Experimental Eye Research* 178:15-26. doi: 10.1016/j.exer.2018.09.003.
- Singh, Mandeep S., Jasmin Balmer, Alun R. Barnard, Sher A. Aslam, Daniela Moralli, Catherine M. Green, Alona Barnea-Cramer, Isabel Duncan, et Robert E. MacLaren. 2016. « Transplanted Photoreceptor Precursors Transfer Proteins to Host Photoreceptors by a Mechanism of Cytoplasmic Fusion ». *Nature Communications* 7:13537. doi: 10.1038/ncomms13537.
- Singh, Ruchira, M. Joseph Phillips, David Kuai, Jackelyn Meyer, Jessica M. Martin, Molly A. Smith, Enio T. Perez, Wei Shen, Kyle A. Wallace, Elizabeth E. Capowski, Lynda S. Wright, et David M. Gamm. 2013. « Functional Analysis of Serially Expanded Human IPS Cell-Derived RPE Cultures ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 54(10):6767-78. doi: 10.1167/iov.13-11943.
- Sluch, Valentin M., Chung-ha O. Davis, Vinod Ranganathan, Justin M. Kerr, Kellin Krick, Russ Martin, Cynthia A. Berlinicke, Nicholas Marsh-Armstrong, Jeffrey S. Diamond, Hai-Quan Mao, et Donald J. Zack. 2015. « Differentiation of Human ESCs to Retinal Ganglion Cells Using a CRISPR Engineered Reporter Cell Line ». *Scientific Reports* 5(1):16595. doi: 10.1038/srep16595.
- Smirnov, E. B., et V. F. Puchkov. 2004. « Characteristics of Cellular Proliferation in the Developing Human Retina ». *Neuroscience and Behavioral Physiology* 34(6):643-48. doi: 10.1023/b:neab.0000028299.76009.1c.
- Smith, Joseph R., Ludovic Vallier, Giuseppe Lupo, Morgan Alexander, William A. Harris, et Roger A. Pedersen. 2008. « Inhibition of Activin/Nodal Signaling Promotes Specification of Human Embryonic Stem Cells into Neuroectoderm ». *Developmental Biology* 313(1):107-17. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.10.003.
- Snellman, Josefin, Tejinder Kaur, Yin Shen, et Scott Nawy. 2008. « Regulation of ON Bipolar Cell Activity ». *Progress in retinal and eye research* 27(4):450-63. doi: 10.1016/j.preteyeres.2008.03.003.

- Song, Won Kyung, Kyung-Mi Park, Hyun-Ju Kim, Jae Ho Lee, Jinjung Choi, So Young Chong, Sung Han Shim, Lucian V. Del Priore, et Robert Lanza. 2015. « Treatment of Macular Degeneration Using Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium: Preliminary Results in Asian Patients ». *Stem Cell Reports* 4(5):860-72. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.04.005.
- Sonoda, Shozo, Parameswaran G. Sreekumar, Satoru Kase, Christine Spee, Stephen J. Ryan, Ram Kannan, et David R. Hinton. 2009. « Attainment of Polarity Promotes Growth Factor Secretion by Retinal Pigment Epithelial Cells: Relevance to Age-Related Macular Degeneration ». *Aging* 2(1):28-42. doi: 10.18632/aging.100111.
- Sorkio, Anni, Suvi Haimi, Vincent Verdoold, Kati Juuti-Uusitalo, Dirk Grijpma, et Heli Skottman. 2017. « Poly(Trimethylene Carbonate) as an Elastic Biodegradable Film for Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells ». *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 11(11):3134-44. doi: 10.1002/term.2221.
- Stamer, W. Daniel, Dean Bok, Jane Hu, Glenn J. Jaffe, et Brian S. McKay. 2003. « Aquaporin-1 Channels in Human Retinal Pigment Epithelium: Role in Transepithelial Water Movement ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44(6):2803-8. doi: 10.1167/iovs.03-0001.
- Stanzel, Boris V., Zengping Liu, Sudawadee Somboonthanakij, Warapat Wongsawad, Ralf Brinken, Nicole Eter, Barbara Corneo, Frank G. Holz, Sally Temple, Jeffrey H. Stern, et Timothy A. Blenkinsop. 2014. « Human RPE Stem Cells Grown into Polarized RPE Monolayers on a Polyester Matrix Are Maintained after Grafting into Rabbit Subretinal Space ». *Stem Cell Reports* 2(1):64-77. doi: 10.1016/j.stemcr.2013.11.005.
- Stephen, Ricardo, Sławomir Filipek, Krzysztof Palczewski, et Marcelo Carlos Sousa. 2008. « Ca²⁺-Dependent Regulation of Phototransduction[†] ». *Photochemistry and Photobiology* 84(4):903-10. doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00323.x.
- Stiles, Noelle R. B., Vivek R. Patel, et James D. Weiland. 2021. « Multisensory Perception in Argus II Retinal Prosthesis Patients: Leveraging Auditory-Visual Mappings to Enhance Prosthesis Outcomes ». *Vision Research* 182:58-68. doi: 10.1016/j.visres.2021.01.008.
- Strauss, Olaf. 2005. « The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function ». *Physiological Reviews* 85(3):845-81. doi: 10.1152/physrev.00021.2004.
- Strauß, Olaf. 2016. « Pharmacology of the Retinal Pigment Epithelium, the Interface between Retina and Body System ». *European Journal of Pharmacology* 787:84-93. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.03.066.
- Strettoi, E., et V. Pignatelli. 2000. « Modifications of Retinal Neurons in a Mouse Model of Retinitis Pigmentosa ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(20):11020-25. doi: 10.1073/pnas.190291097.
- Strettoi, Enrica, Vincenzo Pignatelli, Chiara Rossi, Vittorio Porciatti, et Benedetto Falsini. 2003a. « Remodeling of Second-Order Neurons in the Retina of Rd/Rd Mutant Mice ». *Vision Research* 43(8):867-77. doi: 10.1016/S0042-6989(02)00594-1.
- Strettoi, Enrica, Vincenzo Pignatelli, Chiara Rossi, Vittorio Porciatti, et Benedetto Falsini. 2003b. « Remodeling of Second-Order Neurons in the Retina of Rd/Rd Mutant Mice ». *Vision Research* 43(8):867-77. doi: 10.1016/S0042-6989(02)00594-1.
- Sugita, Sunao, Michiko Mandai, Yasuhiko Hirami, Seiji Takagi, Tadao Maeda, Masashi Fujihara, Mitsuhiro Matsuzaki, Midori Yamamoto, Kyoko Iseki, Naoko Hayashi, Ayumi Hono, Shoko Fujino, Naoshi Koide, Noriko Sakai, Yumiko Shibata, Motoki Terada, Mitsuhiro Nishida, Hiromi Dohi, Masaki Nomura, Naoki Amano, Hirokazu Sakaguchi, Chikako Hara, Kazuichi Maruyama, Takashi Daimon, Masataka Igeta, Toshihiko Oda, Utako Shirono, Misato Tozaki, Kota Totani, Satoshi Sugiyama, Kohji Nishida, Yasuo Kurimoto, et Masayo Takahashi. 2020. « HLA-Matched Allogeneic IPS Cells-Derived RPE Transplantation for Macular Degeneration ». *Journal of Clinical Medicine* 9(7):2217. doi: 10.3390/jcm9072217.
- Sugita, Sunao, Michiko Mandai, Hiroyuki Kamao, et Masayo Takahashi. 2021. « Immunological Aspects of RPE Cell Transplantation ». *Progress in Retinal and Eye Research* 84:100950. doi: 10.1016/j.preteyeres.2021.100950.
- Sumi, T., N. Tsuneyoshi, N. Nakatsuji, et H. Suemori. 2007. « Apoptosis and Differentiation of Human Embryonic Stem Cells Induced by Sustained Activation of C-Myc ». *Oncogene* 26(38):5564-76. doi: 10.1038/sj.onc.1210353.
- Tachibanaki, Shuji, Daisuke Arinobu, Yoshie Shimauchi-Matsukawa, Sawae Tsushima, et Satoru Kawamura. 2005. « Highly Effective Phosphorylation by G Protein-Coupled Receptor Kinase 7 of Light-Activated Visual Pigment in Cones ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(26):9329-34. doi: 10.1073/pnas.0501875102.
- Takahashi, Kazutoshi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, et Shinya Yamanaka. 2007. « Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors ». *Cell* 131(5):861-72. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- Takahashi, Kazutoshi, et Shinya Yamanaka. 2006. « Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors ». *Cell* 126(4):663-76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Tavassoli, Hossein, Sanaz Naghavi Alhosseini, Andy Tay, Peggy P. Y. Chan, Steve Kah Weng Oh, et Majid Ebrahimi Warkiani. 2018. « Large-Scale Production of Stem Cells Utilizing Microcarriers: A Biomaterials Engineering Perspective from Academic Research to

Commercialized Products ». *Biomaterials* 181:333-46. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.07.016.

Thomas, Catherine J., Rukhsana G. Mirza, et Manjot K. Gill. 2021. « Age-Related Macular Degeneration ». *Medical Clinics of North America* 105(3):473-91. doi: 10.1016/j.mcna.2021.01.003.

Thomas, Gawain, Nancy A. Burnham, Terri Anne Camesano, et Qi Wen. 2013. « Measuring the Mechanical Properties of Living Cells Using Atomic Force Microscopy ». *Journal of Visualized Experiments : JoVE* (76):50497. doi: 10.3791/50497.

Thompson, Jessica R., Kristan S. Worthington, Brian J. Green, Nathaniel K. Mullin, Chunhua Jiao, Emily E. Kaalberg, Luke A. Wiley, Ian C. Han, Stephen R. Russell, Elliott H. Sohn, C. Allan Guymon, Robert F. Mullins, Edwin M. Stone, et Budd A. Tucker. 2019. « Two-Photon Polymerized Poly(Caprolactone) Retinal Cell Delivery Scaffolds and Their Systemic and Retinal Biocompatibility ». *Acta Biomaterialia* 94:204-18. doi: 10.1016/j.actbio.2019.04.057.

Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, et J. M. Jones. 1998. « Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts ». *Science (New York, N.Y.)* 282(5391):1145-47. doi: 10.1126/science.282.5391.1145.

Thomson, R. C., G. G. Giordano, J. H. Collier, S. L. Ishaug, A. G. Mikos, D. Lahiri-Munir, et C. A. Garcia. 1996. « Manufacture and Characterization of Poly(Alpha-Hydroxy Ester) Thin Films as Temporary Substrates for Retinal Pigment Epithelium Cells ». *Biomaterials* 17(3):321-27. doi: 10.1016/0142-9612(96)85570-0.

Thumann, G., U. Schraermeyer, K. U. Bartz-Schmidt, et K. Heimann. 1997. « Descemet's Membrane as Membranous Support in RPE/IPE Transplantation ». *Current Eye Research* 16(12):1236-38. doi: 10.1076/ceyr.16.12.1236.5031.

Tomita, Minoru, Erin Lavik, Henry Klassen, Tasneem Zahir, Robert Langer, et Michael J. Young. 2005. « Biodegradable Polymer Composite Grafts Promote the Survival and Differentiation of Retinal Progenitor Cells ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 23(10):1579-88. doi: 10.1634/stemcells.2005-0111.

Trehanne, Andrew J., Martin C. Grossel, Andrew J. Lotery, et Heather A. Thomson. 2011. « The Chemistry of Retinal Transplantation: The Influence of Polymer Scaffold Properties on Retinal Cell Adhesion and Control ». *The British Journal of Ophthalmology* 95(6):768-73. doi: 10.1136/bjo.2010.184002.

Truong, Vincent, Kevin Viken, Zhaohui Geng, Samantha Barkan, Blake Johnson, Mara C. Ebeling, Sandra R. Montezuma, Deborah A. Ferrington, et James R. Dutton. 2021. « Automating Human Induced Pluripotent Stem Cell Culture and Differentiation of iPSC-Derived Retinal Pigment Epithelium for Personalized Drug Testing ». *SLAS Technology* 26(3):287-99. doi: 10.1177/2472630320972110.

Tsang, Stephen H., Alicia R. P. Aycinena, et Tarun Sharma. 2018a. « Ciliopathy: Bardet-Biedl Syndrome ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1085:171-74. doi: 10.1007/978-3-319-95046-4_33.

Tsang, Stephen H., Alicia R. P. Aycinena, et Tarun Sharma. 2018b. « Ciliopathy: Usher Syndrome ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1085:167-70. doi: 10.1007/978-3-319-95046-4_32.

Tsin, Andrew, Brandi Betts-Obregon, et Jeffery Grigsby. 2018. « Visual Cycle Proteins: Structure, Function, and Roles in Human Retinal Disease ». *Journal of Biological Chemistry* 293(34):13016-21. doi: 10.1074/jbc.AW118.003228.

Tsujikawa, Motokazu, Yuko Wada, Marie Sukegawa, Miki Sawa, Fumi Gomi, Kohji Nishida, et Yasuo Tano. 2008. « Age at Onset Curves of Retinitis Pigmentosa ». *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)* 126(3):337-40. doi: 10.1001/archoph.126.3.337.

Tu, Hung-Ya, Takehito Watanabe, Hiroshi Shirai, Suguru Yamasaki, Masaharu Kinoshita, Keizo Matsushita, Tomoyo Hashiguchi, Hirota Onoe, Take Matsuyama, Atsushi Kuwahara, Akiyoshi Kishino, Toru Kimura, Mototsugu Eiraku, Kiyoshi Suzuma, Takashi Kitaoka, Masayo Takahashi, et Michiko Mandai. 2019. « Medium- to Long-Term Survival and Functional Examination of Human iPSC-Derived Retinas in Rat and Primate Models of Retinal Degeneration ». *EBioMedicine* 39:562-74. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.11.028.

Tworig, Joshua M., et Marla B. Feller. 2022. « Müller Glia in Retinal Development: From Specification to Circuit Integration ». *Frontiers in Neural Circuits* 15.

Verbakel, Sanne K., Ramon A. C. van Huet, Camiel J. F. Boon, Anneke I. den Hollander, Rob W. J. Collin, Caroline C. W. Klaver, Carel B. Hoyng, Ronald Roepman, et B. Jeroen Klevering. 2018. « Non-Syndromic Retinitis Pigmentosa ». *Progress in Retinal and Eye Research* 66:157-86. doi: 10.1016/j.preteyeres.2018.03.005.

Viets, Kayla, Kiara C. Eldred, et Robert J. Johnston. 2016. « Mechanisms of Photoreceptor Patterning in Vertebrates and Invertebrates ». *Trends in Genetics* 32(10):638-59. doi: 10.1016/j.tig.2016.07.004.

Vohra, Rupali, et Miriam Kolko. 2020. « Lactate: More Than Merely a Metabolic Waste Product in the Inner Retina ». *Molecular Neurobiology* 57(4):2021-37. doi: 10.1007/s12035-019-01863-8.

Vugler, Anthony, Amanda-Jayne Carr, Jean Lawrence, Li Li Chen, Kelly Burrell, Andrew Wright, Peter Lundh, Ma'ayan Semo, Ahmad Ahmado, Carlos Gias, Lyndon da Cruz, Harry Moore, Peter Andrews, James Walsh, et Peter Coffey. 2008. « Elucidating the Phenomenon of HESC-Derived RPE: Anatomy of Cell Genesis, Expansion and Retinal Transplantation ». *Experimental Neurology* 214(2):347-61. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.09.007.

- Walkden, Andrew. 2020. « Amniotic Membrane Transplantation in Ophthalmology: An Updated Perspective ». *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)* 14:2057-72. doi: 10.2147/OPHT.S208008.
- Wang, Shaomei, Sergej Girman, Bin Lu, Nicholas Bischoff, Toby Holmes, Rebecca Shearer, Lynda S. Wright, Clive N. Svendsen, David M. Gamm, et Raymond D. Lund. 2008. « Long-term Vision Rescue by Human Neural Progenitors in a Rat Model of Photoreceptor Degeneration ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49(7):3201-6. doi: 10.1167/iovs.08-1831.
- Wang, Sui, et Constance L. Cepko. 2016. « Photoreceptor Fate Determination in the Vertebrate Retina ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 57(5):ORSFe1-6. doi: 10.1167/iovs.15-17672.
- Wang, Wei, Sang Joon Lee, Patrick A. Scott, Xiaoqin Lu, Douglas Emery, Yongqin Liu, Toshihiko Ezashi, Michael R. Roberts, Jason W. Ross, Henry J. Kaplan, et Douglas C. Dean. 2016. « Two-Step Reactivation of Dormant Cones in Retinitis Pigmentosa ». *Cell reports* 15(2):372-85. doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.022.
- Wang, Xiaokai, Meng Lu, Xiaoyu Tian, Yansong Ren, Yijun Li, Meng Xiang, et Sifeng Chen. 2020. « Diminished expression of major histocompatibility complex facilitates the use of human induced pluripotent stem cells in monkey ». *Stem Cell Research & Therapy* 11:334. doi: 10.1186/s13287-020-01847-9.
- Watari, Kenji, Suguru Yamasaki, Hung-Ya Tu, Masayuki Shikamura, Tatsuya Kamei, Hideki Adachi, Tomoaki Tochtani, Yasuyuki Kita, Aya Nakamura, Kazuki Ueyama, Keiichi Ono, Chikako Morinaga, Take Matsuyama, Junki Sho, Miyuki Nakamura, Masayo Fujiwara, Yoriko Hori, Anna Tanabe, Rina Hirai, Ori Terai, Osamu Ohno, Hidetaka Ohara, Tetsuya Hayama, Atsushi Ikeda, Daiki Nukaya, Keizo Matsushita, Masayo Takahashi, Akiyoshi Kishino, Toru Kimura, Shin Kawamata, Michiko Mandai, et Atsushi Kuwahara. 2023. « Self-Organization, Quality Control, and Preclinical Studies of Human iPSC-Derived Retinal Sheets for Tissue-Transplantation Therapy ». *Communications Biology* 6(1):164. doi: 10.1038/s42003-023-04543-5.
- Weibel, Douglas B., Willow R. Diluzio, et George M. Whitesides. 2007. « Microfabrication Meets Microbiology ». *Nature Reviews. Microbiology* 5(3):209-18. doi: 10.1038/nrmicro1616.
- Weiss, E. R., M. H. Ducceschi, T. J. Horner, A. Li, C. M. Craft, et S. Osawa. 2001. « Species-Specific Differences in Expression of G-Protein-Coupled Receptor Kinase (GRK) 7 and GRK1 in Mammalian Cone Photoreceptor Cells: Implications for Cone Cell Phototransduction ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21(23):9175-84.
- Welby, Emily, Jom Lakowski, Valentina Di Foggia, Dimitri Budinger, Anai Gonzalez-Cordero, Aaron T. L. Lun, Michael Epstein, Aara Patel, Elisa Cuevas, Kamil Kruczek, Arifa Naem, Federico Minneci, Mike Hubank, David T. Jones, John C. Marioni, Robin R. Ali, et Jane C. Sowden. 2017. « Isolation and Comparative Transcriptome Analysis of Human Fetal and iPSC-Derived Cone Photoreceptor Cells ». *Stem Cell Reports* 9(6):1898-1915. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.10.018.
- Whitaker, Christopher M., Gina Nobles, Munenori Ishibashi, et Stephen C. Massey. 2021. « Rod and Cone Connections With Bipolar Cells in the Rabbit Retina ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 15.
- White, Corina E., et Ronke M. Olabisi. 2017. « Scaffolds for Retinal Pigment Epithelial Cell Transplantation in Age-Related Macular Degeneration ». *Journal of Tissue Engineering* 8:2041731417720841. doi: 10.1177/2041731417720841.
- Wiktor, Anna, Michal Sarna, Dawid Wnuk, et Tadeusz Sarna. 2018. « Lipofuscin-Mediated Photodynamic Stress Induces Adverse Changes in Nanomechanical Properties of Retinal Pigment Epithelium Cells ». *Scientific Reports* 8(1):17929. doi: 10.1038/s41598-018-36322-2.
- Wiley, Luke A., Erin R. Burnight, Adam P. DeLuca, Kristin R. Anfinson, Cathryn M. Cranston, Emily E. Kaalberg, Jessica A. Penticoff, Louisa M. Affatigato, Robert F. Mullins, Edwin M. Stone, et Budd A. Tucker. 2016. « cGMP production of patient-specific iPSCs and photoreceptor precursor cells to treat retinal degenerative blindness ». *Scientific Reports* 6:30742. doi: 10.1038/srep30742.
- Wong, Wan Ling, Xinyi Su, Xiang Li, Chui Ming G. Cheung, Ronald Klein, Ching-Yu Cheng, et Tien Yin Wong. 2014. « Global Prevalence of Age-Related Macular Degeneration and Disease Burden Projection for 2020 and 2040: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *The Lancet Global Health* 2(2):e106-16. doi: 10.1016/S2214-109X(13)70145-1.
- Wörgötter, F., et C. Koch. 1991. « A Detailed Model of the Primary Visual Pathway in the Cat: Comparison of Afferent Excitatory and Intracortical Inhibitory Connection Schemes for Orientation Selectivity ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 11(7):1959-79.
- World Medical Association. 2013. « World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects ». *JAMA* 310(20):2191-94. doi: 10.1001/jama.2013.281053.
- Worthington, Kristan S., Luke A. Wiley, Emily E. Kaalberg, Malia M. Collins, Robert F. Mullins, Edwin M. Stone, et Budd A. Tucker. 2017. « Two-Photon Polymerization for Production of Human iPSC-Derived Retinal Cell Grafts ». *Acta Biomaterialia* 55:385-95. doi: 10.1016/j.actbio.2017.03.039.
- Wu, Hongxi, Jia Li, Xinbang Mao, Guodong Li, Lin Xie, et Zhipeng You. 2018. « Transplantation of Rat Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Cells Restores Visual Function in the Royal College of Surgeons Rats ». *Documenta Ophthalmologica* 137(2):71-78. doi: 10.1007/s10633-018-9648-8.

- Wuputra, Kenly, Chia-Chen Ku, Deng-Chyang Wu, Ying-Chu Lin, Shigeo Saito, et Kazunari K. Yokoyama. 2020. « Prevention of tumor risk associated with the reprogramming of human pluripotent stem cells ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 39(1):100. doi: 10.1186/s13046-020-01584-0.
- Xiang, Ping, Kun-Chao Wu, Ying Zhu, Lue Xiang, Chong Li, Deng-Long Chen, Feng Chen, Guotong Xu, Aijun Wang, Min Li, et Zi-Bing Jin. 2014. « A Novel Bruch's Membrane-Mimetic Electrospun Substrate Scaffold for Human Retinal Pigment Epithelium Cells ». *Biomaterials* 35(37):9777-88. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.08.040.
- Xu, Huaigeng, Bo Wang, Miyuki Ono, Akihiro Kagita, Kaho Fujii, Noriko Sasakawa, Tatsuki Ueda, Peter Gee, Misato Nishikawa, Masaki Nomura, Fumiyo Kitaoka, Tomoko Takahashi, Keisuke Okita, Yoshinori Yoshida, Shin Kaneko, et Akitsu Hotta. 2019. « Targeted Disruption of HLA Genes via CRISPR-Cas9 Generates iPSCs with Enhanced Immune Compatibility ». *Cell Stem Cell* 24(4):566-578.e7. doi: 10.1016/j.stem.2019.02.005.
- Yamasaki, Suguru, Hung-Ya Tu, Take Matsuyama, Matsuri Horiuchi, Tomoyo Hashiguchi, Junki Sho, Atsushi Kuwahara, Akiyoshi Kishino, Toru Kimura, Masayo Takahashi, et Michiko Mandai. 2022. « A Genetic Modification That Reduces ON-Bipolar Cells in HESC-Derived Retinas Enhances Functional Integration after Transplantation ». *iScience* 25(1):103657. doi: 10.1016/j.isci.2021.103657.
- Ye, Ke, Yuto Takemoto, Arisa Ito, Masanari Onda, Nao Morimoto, Michiko Mandai, Masayo Takahashi, Ryuji Kato, et Fumitaka Osakada. 2020. « Reproducible Production and Image-Based Quality Evaluation of Retinal Pigment Epithelium Sheets from Human Induced Pluripotent Stem Cells ». *Scientific Reports* 10(1):14387. doi: 10.1038/s41598-020-70979-y.
- Yeong, Wai Yee, et Chee Kai Chua. 2014. *Bioprinting: Principles And Applications*. World Scientific Publishing Co Inc.
- Yoshida, Shinsuke, Tomoaki M. Kato, Yoshiko Sato, Masafumi Umekage, Tomoko Ichisaka, Masayoshi Tsukahara, Naoko Takasu, et Shinya Yamanaka. 2023. « A Clinical-Grade HLA Haplobank of Human Induced Pluripotent Stem Cells Matching Approximately 40% of the Japanese Population ». *Med* 4(1):51-66.e10. doi: 10.1016/j.medj.2022.10.003.
- Young, R. W. 1971. « The Renewal of Rod and Cone Outer Segments in the Rhesus Monkey ». *The Journal of Cell Biology* 49(2):303-18. doi: 10.1083/jcb.49.2.303.
- Young, R. W. 1985. « Cell Proliferation during Postnatal Development of the Retina in the Mouse ». *Brain Research* 353(2):229-39. doi: 10.1016/0165-3806(85)90211-1.
- Yu, Bo, Hui Shao, Chang Su, Yuanfeng Jiang, Xiteng Chen, Lingling Bai, Yan Zhang, Qiutang Li, Xiaomin Zhang, et Xiaorong Li. 2016. « Exosomes Derived from MSCs Ameliorate Retinal Laser Injury Partially by Inhibition of MCP-1 ». *Scientific Reports* 6:34562. doi: 10.1038/srep34562.
- Yu, Junying, Maxim A. Vodyanik, Kim Smuga-Otto, Jessica Antosiewicz-Bourget, Jennifer L. Frane, Shulan Tian, Jeff Nie, Gudrun A. Jonsdottir, Victor Ruotti, Ron Stewart, Igor I. Slukvin, et James A. Thomson. 2007. « Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 318(5858):1917-20. doi: 10.1126/science.1151526.
- Yun, Sanghee, Yukio Saijoh, Karla E. Hirokawa, Daniel Kopinke, L. Charles Murtaugh, Edwin S. Monuki, et Edward M. Levine. 2009. « Lhx2 Links the Intrinsic and Extrinsic Factors That Control Optic Cup Formation ». *Development (Cambridge, England)* 136(23):3895-3906. doi: 10.1242/dev.041202.
- Zénon, Alexandre, et Rich Krauzlis. 2014. « Le colliculus supérieur ». *Medecine sciences : M/S* 30(6-7):637-43. doi: 10.1051/medsci/20143006013.
- Zhang, Feng, Li-Ping Wang, Martin Brauner, Jana F. Liewald, Kenneth Kay, Natalie Watzke, Phillip G. Wood, Ernst Bamberg, Georg Nagel, Alexander Gottschalk, et Karl Deisseroth. 2007. « Multimodal Fast Optical Interrogation of Neural Circuitry ». *Nature* 446(7136):633-39. doi: 10.1038/nature05744.
- Zhao, Cuiping, Qingjie Wang, et Sally Temple. 2017. « Stem Cell Therapies for Retinal Diseases: Recapitulating Development to Replace Degenerated Cells ». *Development (Cambridge, England)* 144(8):1368-81. doi: 10.1242/dev.133108.
- Zheng, Minhua, Zifeng Zhang, Xingcheng Zhao, Yuqiang Ding, et Hua Han. 2010. « The Notch Signaling Pathway in Retinal Dysplasia and Retina Vascular Homeostasis ». *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao* 37(9):573-82. doi: 10.1016/S1673-8527(09)60077-1.
- Zhong, Xiufeng, Christian Gutierrez, Tian Xue, Christopher Hampton, M. Natalia Vergara, Li-Hui Cao, Ann Peters, Tea Soon Park, Elias T. Zambidis, Jason S. Meyer, David M. Gamm, King-Wai Yau, et M. Valeria Canto-Soler. 2014. « Generation of Three-Dimensional Retinal Tissue with Functional Photoreceptors from Human iPSCs ». *Nature Communications* 5:4047. doi: 10.1038/ncomms5047.
- Zhou, Ru, et Rachel R. Caspi. 2010. « Ocular Immune Privilege ». *F1000Prime Rep* 2(3).
- Zhou, Shufeng, Anthony Flamier, Mohamed Abdouh, Nicolas Tétreault, Andrea Barabino, Shashi Wadhwa, et Gilbert Bernier. 2015. « Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Cone Photoreceptors through Simultaneous Inhibition of BMP, TGFβ and Wnt

Signaling ». *Development (Cambridge, England)* 142(19):3294-3306. doi: 10.1242/dev.125385.

Zhu, Huiguang, Jian Ji, et Jiacong Shen. 2004. « Construction of Multilayer Coating onto Poly-(DL-Lactide) to Promote Cytocompatibility ». *Biomaterials* 25(1):109-17. doi: 10.1016/s0142-9612(03)00481-2.

Zhu, M., J. M. Provis, et P. L. Penfold. 1998. « Isolation, Culture and Characteristics of Human Foetal and Adult Retinal Pigment Epithelium ». *Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology* 26 Suppl 1:S50-52. doi: 10.1111/j.1442-9071.1998.tb01371.x.

Zrenner, Eberhart, Karl Ulrich Bartz-Schmidt, Heval Benav, Dorothea Besch, Anna Bruckmann, Veit-Peter Gabel, Florian Gekeler, Udo Greppmaier, Alex Harscher, Steffen Kibbel, Johannes Koch, Akos Kusnyerik, Tobias Peters, Katarina Stingl, Helmut Sachs, Alfred Stett, Peter Szurman, Barbara Wilhelm, et Robert Wilke. 2011. « Subretinal Electronic Chips Allow Blind Patients to Read Letters and Combine Them to Words ». *Proceedings. Biological Sciences* 278(1711):1489-97. doi: 10.1098/rspb.2010.1747.

Zuber, Michael E. 2010. « Eye Field Specification in *Xenopus Laevis* ». *Current Topics in Developmental Biology* 93:29-60. doi: 10.1016/B978-0-12-385044-7.00002-3.

Zuber, Michael E., Gaia Gestri, Andrea S. Viczian, Giuseppina Barsacchi, et William A. Harris. 2003. « Specification of the Vertebrate Eye by a Network of Eye Field Transcription Factors ». *Development (Cambridge, England)* 130(21):5155-67. doi: 10.1242/dev.00723.

VII. Annexes

1 Annexe n°1

1

DESCRIPTION

**TITRE : ECHAFAUDAGE MICROSTRUCTURE POUR LA PREPARATION D'UN IMPLANT
TISSULAIRE**

5 La présente invention concerne la préparation d'un échafaudage microstructuré correspondant à un matériau de support de type membrane biocompatible pour la culture cellulaire. La présente invention concerne également une composition comprenant l'échafaudage microstructuré et des cellules en particulier des photorécepteurs, avec ou sans cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien. La présente invention s'applique notamment à la préparation d'un greffon implantable pour le traitement de maladies de l'épithélium pigmentaire rétinien et de la rétine neurale.

10

La rétine est la couche sensorielle qui tapisse la face postérieure de l'œil, reçoit l'image formée par la lentille, et traduit cette image en impulsions neuronales qui sont transmises au cerveau par le nerf optique. La rétine est un tissu neuronal qui interagit de façon critique avec l'épithélium pigmentaire rétinien qui lui est nécessaire à sa survie et son bon fonctionnement. La macula constituant la partie centrale de la rétine, est enrichie en photorécepteurs capables de percevoir les différentes couleurs et les détails visuels fins. La macula est cruciale notamment pour la reconnaissance faciale et la lecture.

15

20 De nombreuses maladies peuvent affecter l'épithélium pigmentaire rétinien ou la rétine neurale et entraîner une altération de la vision pouvant conduire à la cécité. Parmi ces maladies, on peut citer en particulier les dégénérescences maculaires héréditaires ou liées à l'âge, les dystrophies maculaires, et les rétinites pigmentaires. L'épithélium rétinien ou la rétine neurale peut également présenter des lésions d'origine traumatique ou infectieuse. Des recherches récentes semblent démontrer que les lésions de la rétine peuvent être retardées, arrêtées, voire être réparées par la transplantation de cellules d'épithélium pigmentaire rétinien ou de cellules rétinienne dans l'espace sous-rétinien, ce qui peut prévenir la réduction des capacités visuelles provoquée par ces maladies ou les améliorer dans le cas de greffes de cellules de la rétine neurale.

25

30 On a proposé diverses formes de greffes ou de techniques de transplantation pour tenter de préserver la rétine. Plus récemment, des résultats prometteurs ont été obtenus en

transplantant une culture de cellules d'épithélium pigmentaire rétinien obtenues par différenciation de cellules souches pluripotentes, les cellules étant cultivées sur une membrane biocompatible.

- 5 Dans le cas de maladie de la rétine à un stade avancé, la transplantation seule de cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien n'est pas suffisante. Les photorécepteurs doivent également être remplacés. Les photorécepteurs sont un type cellulaire hautement polarisé et spécialisé avec des segments externes apicaux contenant des photopigments photosensibles et des terminaisons axonales basales.
- 10 La transplantation de photorécepteurs polarisés avec ou sans cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien présente d'importants défis en raison de la nécessité de fournir un greffon multicouche possédant une structure organisée.
- 15 La technologie de microfabrication de support tridimensionnel offre des solutions potentielles à ces problèmes.
C'est ainsi que la fabrication de système d'échafaudage pour la culture cellulaire de photorécepteurs a déjà été proposée.
- 20 Par exemple, le document WO2017164992 décrit un système d'échafaudage microstructuré qui comprend un élément de support comprenant des micropores permettant aux photorécepteurs de croître dans une direction verticale.
- 25 Les micropores de l'échafaudage microstructuré sont constitués d'une partie sphérique ou conique appelée « récepteur de cellule curviligne » connectée à au moins une partie cylindrique appelée « canal de guidage de cellule ».
- 30 La densité des micropores de l'élément de support est un paramètre très important, car il conditionne le nombre de connexions possibles entre les photorécepteurs et les cellules de l'épithélium rétinien. Dans le cas du document WO2017164992, la distance entre 2 micropores adjacents est de 0,1-5 μm (bord à bord) ou de 16 μm de centre à centre. Cet échafaudage est favorable à la réalisation de nombreuses connexions intercellulaires. Mais la profondeur des pores n'est pas favorable à une maturation optimale des photorécepteurs. Une profondeur de l'ordre de 100 μm (correspondant à la taille d'un photorécepteur mature
- 35 humain) est souhaitée pour ce type de cellule. Cependant la réalisation de membranes

microstructurées avec une épaisseur voisine de 100 μm et une périodicité des pores voisine de celle présentée dans le document WO2017164992 ne serait pas compatible actuellement avec les procédés de fabrication. Il y a un risque d'arracher les motifs (de la présente invention) du moule maître lors du démoulage de la membrane du fait que la période est

5 inférieure à la hauteur des motifs (50 μm versus 100-120 μm). Cependant la réalisation de ce type d'échafaudage peut être problématique en raison de contraintes physiques importantes de fabrication, notamment des risques de déchirure de la membrane microstructurée lors de son démoulage.

10 On peut également indiquer que l'état de la technique décrit de nombreux échafaudages microstructurés pour la culture de cellules, en particulier de photorécepteurs comprenant des micropores de forme cylindrique. Lorsqu'un échafaudage de ce type est ensemencé avec des photorécepteurs matures ou immatures, une partie des cellules tombe au fond des micropores, ce qui est problématique.

15 En effet, les photorécepteurs sont des cellules polarisées et orientées avec des segments externes (allongement des photorécepteurs) qui forment des contacts, au niveau basal, avec des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien et au niveau apical, avec des synapses dans un tissu *in vivo*. Sans support de culture adapté et d'indices de signalisation

20 appropriés, l'orientation correcte des photorécepteurs dans un tissu reconstruit *in vitro* pourrait être difficile à obtenir. Pour surmonter cela, la bonne maturation est guidée à travers un échafaudage polymère microstructuré spécialement conçu avec des micropores dans lesquels des photorécepteurs immatures peuvent être ensemencés tandis que leur orientation est imposée par la microstructure d'un tel échafaudage. L'échafaudage

25 microstructuré guide la maturation des photorécepteurs en imposant des contraintes physiques latérales à l'intérieur des micropores au-dessus d'un épithélium pigmentaire rétinien qui fournit des indices pour guider la maturation des photorécepteurs avec l'orientation attendue.

30 Il existe donc un besoin de préparer de nouveaux échafaudages pour la culture cellulaire, qui soient plus faciles à manipuler en raison des contraintes de fabrication et qui permettent une optimisation de la maturation et de l'organisation des photorécepteurs à l'intérieur des micropores.

Un des objectifs de l'invention est donc proposer un échafaudage de type membrane microstructurée pour la culture cellulaire, en particulier de photorécepteur, dont la densité des micropores a été optimisée pour à la fois limiter les problèmes de fabrication de l'échafaudage et de proposer une organisation cellulaire la plus proche possible d'un tissu rétinien *in vivo*.

Dans un premier aspect, l'invention concerne donc un échafaudage qui comprend ou est constitué d'une membrane microstructurée pourvue d'une pluralité de micromicropores traversants de forme conique.

Un autre aspect de l'invention concerne l'échafaudage microstructuré pour son utilisation comme support de culture cellulaire, en particulier de photorécepteur.

Dans un deuxième aspect, l'invention concerne une composition comprenant l'échafaudage microstructuré et des cellules, en particulier des photorécepteurs.

Un autre aspect de l'invention concerne un procédé de préparation d'une composition comprenant l'échafaudage microstructuré et des cellules, en particulier des photorécepteurs.

Dans un troisième aspect, l'invention concerne un greffon implantable comprenant l'échafaudage microstructuré, des cellules, en particulier des photorécepteurs et des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien cultivées sur un support.

Un autre aspect de l'invention concerne un procédé de préparation d'un greffon implantable comprenant l'échafaudage microstructuré, des cellules en particulier des photorécepteurs et des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien cultivées sur un support.

Un autre aspect de l'invention concerne un procédé de préparation d'un échafaudage microstructuré, en particulier par photolithographie.

Le terme « échafaudage » est utilisé ici pour désigner un support biocompatible de type membrane microstructurée utile pour la culture de cellules, en particulier de photorécepteurs.

L'échafaudage selon la présente invention est une membrane microstructurée qui comprend des micropores traversants de forme conique. Les micropores de forme conique sont soit coniques sur toute la hauteur de la membrane, soit partiellement coniques sur une première partie du micropore (hauteur h_1) située dans la partie apicale de la membrane ;
 5 une seconde partie du micropore (hauteur h_2) située dans la partie basale de la membrane est formée d'au moins deux canaux, de préférence trois ou quatre canaux, de forme conique ou sensiblement conique. Lesdits canaux, de préférences ne sont pas de forme cylindrique ou sensiblement cylindrique.

10 Structure de l'échafaudage de culture cellulaire

Au sens de la présente invention, l'échafaudage comprend ou consiste en une membrane microstructurée qui présente des micropores traversants de forme conique. Le diamètre et la distribution des micropores sont différents en fonction de l'orientation de la
 15 membrane. La surface apicale de la membrane (1) correspond à la surface orientée vers le haut. La surface basale de la membrane (2) correspond à la surface de la membrane orientée vers le bas, c'est-à-dire la surface de la membrane qui dans certains modes de réalisation de l'invention se trouve au contact d'une couche de cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien et comprenant des micropores d'un diamètre inférieur à ceux se trouvant sur la surface
 20 apicale de la membrane.

Dans un aspect particulier de l'invention,

-la surface apicale de la membrane (1) présente des micropores d'un diamètre (d_1) supérieur à au moins trois fois, de préférence à au moins quatre fois le diamètre (d_2) des micropores
 25 de la surface basale de la membrane (2).

Dans un aspect particulier de l'invention, l'échafaudage comprend ou est constitué d'une membrane microstructurée comprenant des micropores de forme conique traversants ladite membrane au niveau d'une première surface (1) et au niveau d'une seconde surface
 30 (2) caractérisée en ce que,

-la surface apicale de la membrane (1) présente des micropores d'un diamètre (d_1) supérieur à au moins trois fois, de préférence à au moins quatre fois le diamètre (d_2) des micropores de la surface basale de la membrane (2).

Dans un autre aspect particulier de l'invention, le micropore de forme conique, présente une première partie (apicale) de hauteur (h1) et une seconde partie (basale) de hauteur (h2) qui présente plusieurs canaux formant plusieurs micropores à la surface basale de la membrane (2).

5

La hauteur (h1) du micropore présente une valeur correspondant à environ un quart à la moitié de la hauteur totale du micropore. De préférence, la hauteur (h1) du micropore présente une valeur correspondant à environ un tiers de la hauteur totale du micropore.

10

La hauteur (h1) du micropore présente une valeur comprise de 20 μm à 60 μm , de préférence comprise de 30 μm à 50 μm , de préférence de 30 μm à 40 μm , soit de 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40 μm .

15

La hauteur (h2) du micropore présente une valeur comprise de 40 μm à 80 μm , de préférence comprise de 50 μm à 70 μm , de préférence de 55 μm à 65 μm , soit de 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 ou 65 μm .

20

Selon la présente invention, lorsque le micropore de forme conique présente deux canaux, le micropore est dit bipode ; lorsque le micropore de forme conique présente trois canaux, le micropore est dit tripode et lorsque le micropore de forme conique présente quatre canaux, le micropore est dit quadripode.

25

Dans un aspect particulier de l'invention, les micropores de forme conique sont de type bipode, tripode ou quadripode.

30

Selon la présente invention le micropore de forme conique présente un diamètre (d1) à la surface apicale de la membrane (1) compris de 15 μm à 25 μm , de préférence compris de 18 μm à 22 μm .

Le diamètre (d1) du micropore à la surface apicale de la membrane (1) présente une valeur de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 μm .

35

Selon la présente invention le micropore de forme conique présente un diamètre (d2) à la surface basale de la membrane (2), compris de 4 μm à 8 μm , de préférence compris de 5 μm à 6 μm .

Le diamètre (d2) du micropore à la surface basale de la membrane (2) présente une valeur de 4, 5, 6, 7 ou 8 μm .

Selon la présente invention la membrane microstructurée présente une pluralité de micropores de forme conique de type bipode, tripode, ou quadripode, les micropores étant caractérisés par

- 5 -un diamètre (d1) à la surface apicale de la membrane (1), compris de 15 μm à 25 μm , de préférence compris de 18 μm à 22 μm ,
 - un diamètre (d1') dont la valeur correspond au diamètre (d1) diminué de 2 à 6 μm , de préférence de 3 à 5 μm
 -un diamètre (d2) à la surface basale de la membrane (2), compris de 4 μm à 8 μm , de
 10 préférence compris de 5 μm à 6 μm ,
 - une hauteur h1 comprise de 20 μm à 60 μm ,
 - une hauteur h2 comprise de 40 μm à 80 μm , étant entendu que la hauteur totale (h1+h2) de la membrane microstructurée est comprise de 80 μm à 120 μm .

- 15 Selon la présente invention, le diamètre (d1') du micropore de forme conique de type bipode, tripode, ou quadripode, correspond au diamètre du micropore dans la zone où la partie conique du micropore présente plusieurs canaux, de préférence coniques.

- 20 Selon la présente invention, le diamètre (d1') du micropore de forme conique de type bipode, tripode, ou quadripode est compris de 9 μm à 23 μm , de préférence de 16 μm à 20 μm .

- 25 Dans un aspect particulier de l'invention l'échafaudage comprend ou est constitué d'une membrane microstructurée comprenant des micropores de forme conique traversants ladite membrane au niveau d'une première surface (1) et au niveau d'une seconde surface (2) caractérisée en ce que,
 -la surface apicale de la membrane (1) présente des micropores d'un diamètre (d1) compris de 15 μm à 25 μm , de préférence compris de 18 μm à 22 μm ,
 -la surface basale de la membrane (2) présente des micropores d'un diamètre (d2) compris
 30 de 4 μm à 8 μm , de préférence compris de 5 μm à 6 μm .

- 35 Dans un aspect particulier de l'invention, l'épaisseur de la membrane microstructurée est comprise de 80 μm à 120 μm , de préférence de 90 μm à 110 μm , encore plus de préférence de 95 μm à 105 μm ou encore plus de préférence d'environ 100 μm .

Dans un aspect particulier de l'invention, les micropores sont espacés d'une distance comprise de 20 μm à 40 μm , de préférence de 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40 μm de bord à bord.

5 Pour augmenter le nombre de contacts des photorécepteurs avec les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien, le nombre de micropores du côté basal de la membrane microstructurée est augmenté d'un facteur 2, 3 ou 4 ou plus. Cette stratégie technique améliore le nombre d'interactions cellulaires sans qu'il soit nécessaire d'augmenter la densité des micropores comme c'est le cas dans le document WO2017164992.

10

En raison des contraintes physiques de fabrication de la membrane microstructurée, la densité des micropores de la membrane microstructurée de la présente invention est telle que la distance entre deux micropores adjacents sur la face apicale de la membrane est de 20 μm au minimum, de préférence de 25 μm au minimum, encore plus de préférence de 30 μm au minimum et encore plus de préférence de 35 μm au minimum.

15

Dans un aspect particulier de l'invention l'échafaudage est constitué d'une membrane microstructurée comprenant des micropores de forme conique traversants ladite membrane au niveau d'une première surface (1) et au niveau d'une seconde surface (2) caractérisée en ce que,

20

-la surface apicale de la membrane (1) présente des micropores d'un diamètre (d1) compris de 18 μm à 22 μm , de préférence de 20 μm ,

-la surface basale de la membrane (2) présente des micropores d'un diamètre (d2) compris de 4 μm à 8 μm , de préférence de 5 μm ,

25

-les micropores sont espacés d'une distance comprise de 20 μm à 40 μm , de préférence de 35 μm , de bord à bord,

-l'épaisseur de la membrane microstructurée est comprise de 80 μm à 120 μm , de préférence de 100 μm .

30

L'échafaudage selon la présente invention comprend ou est constitué d'une membrane microstructurée constituée d'un polymère biocompatible, flexible et/ou extensible, et dans certains modes de réalisation particulièrement appropriés, le polymère est biodégradable.

Les polymères appropriés comprennent, sans s'y limiter, les caoutchoucs synthétiques tels que les caoutchoucs de silicone (par exemple, le polydiméthylsiloxane (PDMS)), le caoutchouc polyuréthane, le caoutchouc styrène butadiène et le caoutchouc acrylonitrile butadiène, les caoutchoucs naturels élastomères (par exemple, polyuréthane thermoplastique, copolyester thermoplastique, polyamide thermoplastique), époxy (par exemple, SU-8), polyimides, polyuréthanes, polyamides, polyesters (par exemple, poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA), acide polylactique (PLA), l'acide polyglycolique (PGA), la polycaprolactone (PCL), le poly(sébaçate de glycérol) (PGS)), les polysaccharides (par exemple, le chitosan), le parylène, et leurs combinaisons.

5

Avantageusement, ces polymères sont « de type plastique » ce qui facilite la manipulation de l'échafaudage.

Dans un aspect particulier, le polymère est le PDMS ou le PLGA.

10

Un autre aspect de l'invention concerne une composition comprenant l'échafaudage microstructuré et des cellules, en particulier des photorécepteurs.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, les cellulesensemencées sont en particulier des photorécepteurs, des précurseurs de photorécepteurs ou des progéniteurs rétiniens.

15

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, l'échafaudage est caractérisé en ce que la membrane microstructurée estensemencée avec des cellules en particulier des photorécepteurs, des précurseurs de photorécepteurs ou des progéniteurs rétiniens.

20

La présente composition utile pour une thérapie cellulaire pour traiter un tissu endommagé comprend :

- la membrane microstructurée telle que décrite précédemment, et
- au moins un photorécepteur, ou précurseur de photorécepteur ou progéniteur rétinien par micropore.

25

Les micropores de la membrane microstructurée sont configurés pour permettre l'adhérence d'au moins un photorécepteur (ou précurseur de photorécepteur ou progéniteur rétinien) à la paroi intérieure d'un micropore.

Les micropores de la membrane microstructurée sont configurés pour permettre aux précurseurs de photorécepteur ou aux progéniteurs rétiniens de se différencier en photorécepteur et/ou de maturer.

5 L'échafaudage microstructuré peut permettre de favoriser la maturation, la survie, la différenciation, l'attachement cellulaire et/ou l'intégration cellulaire dans la rétine de l'hôte par l'ajout de différents produits biologiques ou de petites molécules. Ces produits biologiques peuvent être des neurotrophines (par exemple CNTF, BDNF, NT-3, NT-4, NGF, GDNF, IGF1) ou des cytokines (par exemple IL-13, IL-11, IL-10, IL-6, IL-4, IL-1ra, TGF-beta) ou
10 de petites molécules ou protéines d'enrobage (par exemple le collagène, la laminine, la vitronectine, la fibronectine). Ces produits biologiques peuvent être également des vésicules extracellulaires comprenant des exosomes, des microvésicules, des corps apoptotiques qui peuvent être dérivés de divers types cellulaires tels que des cellules souches pluripotentes, des cellules souches mésenchymateuses, des cellules différenciées ou progénitrices dérivées
15 d'embryons ou de fœtus, des cellules différenciées d'adultes (cellules primaires) ou des lignées cellulaires.

Ces produits biologiques sont progressivement libérés lors de la culture cellulaire et/ou après transplantation dans la rétine de l'hôte. Le contrôle de la libération progressive
20 de produits biologiques peut être induit par la dégradation du polymère (si biodégradable) ou par concentration/densité de polymère ou dimension de la matrice polymère ou concentration initiale de produits biologiques. En effet, dans le cas particulier d'un polymère non dégradé, le réseau crée par ce polymère enferme ces produits biologiques et permet un relargage progressif de ceux-ci. Plus le réseau est dense, plus le relargage est lent.

25 Des photorécepteurs ou des précurseurs de photorécepteurs ou des progéniteurs rétiniens (qui peuvent poursuivre la différenciation en photorécepteurs à l'intérieur de l'échafaudage microstructuré) peuvent êtreensemencés dans l'échafaudage microstructuré après dissociation et comptage cellulaire. Ces cellules peuvent êtreensemencées à une
30 concentration allant de 10 000 cellules par cm^2 à 1 000 000 par cm^2 . Ces cellules peuvent être différenciées à partir de cellules souches pluripotentes humaines (cellules souches pluripotentes induites humaines ou cellules souches embryonnaires humaines). La population cellulaireensemencée dans l'échafaudage microstructuré peut être pure ou peut contenir une population mixte de cellules rétiniennes immatures et/ou matures (par
35 exemple des cellules bipolaires, cellules ganglionnaires, cellules amacrines).

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, le nombre de cellules, en particulier de photorécepteurs par micropore est compris de 1 à 20, ou plus, de préférence de 5 à 15, encore plus de préférence de 7 à 12, ou environ 10 c'est-à-dire 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 cellules par micropores de la membrane microstructurée.

5

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, les micropores de la membrane microstructurée sont remplis d'un polymère mou (par exemple, l'acide hyaluronique) ou d'un milieu de culture contenant des nutriments et des facteurs de croissance.

10

Un autre aspect de l'invention, concerne un greffon implantable qui comprend ou est constitué

(1) d'une couche supérieure de photorécepteurs ou de précurseurs de photorécepteurs ou de progéniteurs rétiniensensemencés à l'intérieur (2) d'un échafaudage microstructuré, (3) d'une couche inférieure de cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien cultivées sur (4) un support de nature biologique ou polymérique.

15

Un autre aspect de l'invention concerne une utilisation d'un greffon implantable en tant que composition pharmaceutique, ledit greffon comprend ou est constitué

(1) d'une couche supérieure de photorécepteurs ou de précurseurs de photorécepteurs ou de progéniteurs rétiniensensemencés à l'intérieur (2) d'un échafaudage microstructuré, (3) d'une couche inférieure de cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien cultivées sur (4) un support de nature biologique ou polymérique.

20

Un autre aspect de l'invention, concerne une composition utile pour une thérapie cellulaire pour traiter un tissu endommagé comprenant :

-la membrane microstructurée telle que décrite,

-au moins un photorécepteur (ou précurseur de photorécepteur ou progéniteur rétinien), dans laquelle les micropores sont configurés pour permettre l'adhérence d'au moins un photorécepteur (ou précurseur de photorécepteur ou progéniteur rétinien) à la paroi intérieure d'un micropore, et

30

-une monocouche de cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien,

dans laquelle le au moins un photorécepteur est capable d'interagir physiquement ou par communication à distance via une sécrétion de facteur biologique avec un ou plusieurs type(s) de cellules situées au contact de la première surface (1) de la membrane et au niveau

35

de la seconde surface (2) de la membrane reposant sur la monocouche de cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien.

5 Les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien peuvent être cultivées d'abord afin de former un épithélium fonctionnel au-dessus d'un échafaudage mince qui peut être constitué de polymères flexibles et qui peuvent être extensibles, et biodégradables (PDMS, PLLA/PLGA, parylène, polyester, polyimide, Polyéther uréthanes, membranes PET, PHA : PHB-HV, ePTFE, PCL, polybutylène, PEGDMA, PTMC) ou peut être un substrat biologique (un gel de collagène, un gel de gélatine, un gel de fibrine, une membrane amniotique humaine, 10 une membrane de Bruch, une fibroïne de soie, une cellulose bactérienne ou une membrane en un matériau synthétique biocompatible, biodégradable ou non). Lorsque l'épithélium pigmentaire rétinien est reconstruit in vitro, l'échafaudage microstructuré est placé à la surface de celui-ci.

15 Selon un mode de réalisation, les cellules disposées sur la membrane sont dérivées de cellules souches pluripotentes, de cellules souches adultes multipotentes ou bien sont issues de cultures primaires ou de lignées cellulaires, ou bien correspondent à un type cellulaire de la zone d'implantation, ou bien sont des cellules épithéliales simples ou de différents sous-types, tels que des photorécepteurs, des cellules ganglionnaires, des cellules 20 bipolaires, des cellules amacrines, des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien, des cellules endothéliales. Les cellules souches pluripotentes humaines utilisées pour la mise en œuvre de l'invention ne nécessitent pas la destruction d'embryon humain.

25 Selon un exemple de réalisation, les cellules de la culture sont des cellules d'épithélium pigmentaire rétinien obtenues à partir de cellules souches pluripotentes humaines disposées sur une membrane amniotique dénudée, puis cultivées durant quatre semaines.

30 L'invention peut s'appliquer à d'autres implants que des implants de cellules d'épithélium pigmentaire rétinien. En effet, l'invention peut s'appliquer à la transplantation de cellules de la rétine de sous-types variés et utilisés seuls ou en association (par exemple pour la rétine : des photorécepteurs, des cellules ganglionnaires, des cellules bipolaires, des cellules amacrines, des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien, des cellules 35 endothéliales). Ces cellules peuvent être associées en monocouches ou en couches

pluristratifiées de façon à reconstruire une rétine artificielle. Il peut s'agir également notamment de cellules de la cornée ou de tout autre type de cellules épithéliales. Plus généralement, l'invention peut s'appliquer à tout type d'épithélium ou de culture de cellules en monocouche sur une membrane biologique ou synthétique.

5

Selon un mode particulier de l'invention, la membrane microstructurée ou l'implant selon l'invention présente une hauteur comprise de 80 à 120 μm , une longueur et une largeur comprise de 2 mm à 10 mm, de préférence une hauteur de 120 μm , une longueur et une largeur de 5 mm.

10

Selon un mode particulier de l'invention, la membrane microstructurée présente un nombre de pores/ mm^2 compris de 250 à 1000.

Par exemple, une membrane microstructurée selon l'invention présente 400 pores/ mm^2 soit 10^4 pores pour 25 mm^2 avec une périodicité de 50 μm ou 625 pores / mm^2 pour 25 mm^2 avec une périodicité de 40 μm .

15

Selon un mode particulier de l'invention, la membrane microstructurée comprenant des tripodes présente sur la face basale 3600 pores/ mm^2 soit $9 \cdot 10^4$ pour 25 mm^2 avec une périodicité de 50 μm ou 5625 pores/ mm^2 soit 140625 pour 25 mm^2 avec une périodicité de 40 μm .

20

Des exemples de réalisation de l'invention seront décrits dans ce qui suit, à titre non limitatif en relation avec les figures jointes parmi lesquelles :

[Fig 1]

la figure 1 représente un tissu rétinien modifié composé de 4 éléments comprenant (a) une couche supérieure de photorécepteurs ensemencés à l'intérieur (b) d'une membrane polymère microstructurée et (c) d'une couche inférieure de cellules épithéliales pigmentaires rétiniennes cultivées sur (d) un support biologique ou composé de polymères.

25

[Fig 2]

la figure 2 décrit les étapes principales (a-c) de la préparation d'une membrane microstructurée de l'invention par lithographie 2 photons. Les faces (1) et (2) de l'échafaudage correspondent respectivement aux faces apicales et basales.

30

[Fig 3]

la figure 3 (Image obtenue par microscopie électronique à balayage (MEB)) décrit des structures de forme conique d'un moule maître obtenu par lithographie à 2 photons et utilisé pour réaliser les échafaudages coniques.

35

[Fig 4]

la figure 4 décrit une membrane microstructurée (face 2) (4A) obtenue après moulage/démoulage d'un polymère sur un moule maître de forme conique tripode (4B) obtenu par lithographie à 2 photons.

5 [Fig 5]

la figure 5 représente un schéma d'un micropore conique, d'un micropore conique/tripode et d'un micropore conique hexagonal.

[Fig 6]

10 la figure 6 représente une image obtenue par microscopie à fluorescence confocale de plusieurs micropores d'une membrane microstructurée montrant la croissance verticale de photorécepteurs exprimant la recoverine et reposant sur des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien. (PR= photorécepteurs ; RPE : épithélium pigmentaire rétinien).

Méthodes de préparation de l'échafaudage primaire

15

L'échafaudage selon la présente invention peut être préparé en formant un moule maître.

20 Par exemple, pour préparer un échafaudage primaire, un moule maître comprenant le négatif des micropores (= micropiliers) est préparé en utilisant une lithographie à 2 photons, une gravure au plasma ou toute autre technique connue de l'homme du métier. Plus typiquement, la membrane microstructurée est moulée sur le moule maître puis démolée et enfin les pores sont ouverts à l'aide d'une gravure plasma isotrope.

25 La membrane microstructurée de l'invention est fabriquée à l'aide de polymères moulables (par exemple, PDMS), moulés à partir du moule maître en Silicium sur lequel les micropiliers sont structurés avec de la résine, dans lequel le PDMS ou tout autre polymère (pour l'échafaudage) est coulé par la suite.

30 Bien qu'il soit décrit ici comme la préparation des échafaudages en utilisant la photolithographie, le moulage et la gravure au plasma, il doit être compris que tout moyen pour préparer des échafaudages polymères comme connu dans l'art peut être utilisé sans s'écarter de la présente invention.

D'autres méthodes appropriées incluent, par exemple, l'impression directe à l'aide d'une imprimante 3D ou le moulage à l'aide d'une machine de moulage par micro-injection.

35 Pour préparer l'élément de support, un film polymère ultramince est préparé en utilisant n'importe quel procédé connu dans l'art.

Des exemples de polymères à utiliser comme élément de support comprennent ceux énumérés ci-dessus.

5 Avantageusement, les échafaudages de la présente invention peuvent être utilisés pour la culture cellulaire, la transplantation, la modélisation du développement des cellules, et pour le criblage de médicaments.

Lithographie 3D

10 Dans le domaine de la lithographie par écriture laser, la stéréolithographie par absorption biphotonique ou à 2 photons (anglais : two-photon stereolithography, TPS) est utilisée. Un faisceau laser focalisé balaie point par point un photopolymère dans son volume pour former l'objet 3D désiré. Le recours à des impulsions ultracourtes (en général quelques centaines de femtoseconde) et un fort confinement de l'onde lumineuse permettent de
15 déclencher le phénomène d'absorption biphotonique qui conduit le photoamorceur dans un état excité. A partir de cet état excité, des espèces réactives peuvent être créées pour amorcer une réaction de polymérisation classique.

20 Une méthode courante pour créer des échafaudages microstructurés est la lithographie douce utilisant la résine photosensible à tonalité négative, par exemple SU8, pour répartir les caractéristiques sur des plaquettes de silicium pour créer des maîtres (SU8-Si) pour le moulage de répliques en polymère dur.

25 La figure 2 décrit les étapes principales de la formation de la membrane microstructurée de l'invention.

L'étape a) concerne la préparation d'un substrat en silicium, le dépôt d'une résine par enduction centrifuge sur ledit substrat, et le traitement thermique du substrat enrésiné.

30 L'étape b) concerne la lithographie laser bi-photon (ou à 2 photons). La résine polymérise dans les zones exposées aux rayonnements des 2 lasers focalisés.

L'étape c) concerne la formation des motifs de formes coniques sur le substrat de silicium obtenus après développement de la résine. Les zones non exposées sont solubles dans un développeur. Un séchage du moule maître est réalisé à partir d'un séchage super critique à base de CO₂.

Le moule maître est obtenu avec des motifs de formes coniques (et/ou multipodes) dont la hauteur est d'environ 100 μm . Un traitement spécifique pour assurer les étapes de démoulage est ensuite appliqué sur le moule maître.

5 Le polymère est ensuite déposé par enduction centrifuge sur le moule maître. Une étape de dégazage permet d'évacuer les microbulles d'air. Un film souple enduit d'une couche sacrificielle soluble dans l'eau est ensuite déposée sur le polymère. Une force est appliquée sur le film pour réduire l'épaisseur résiduelle du polymère.

Un recuit est réalisé pour durcir le polymère. Le démoulage est obtenu en décollant le film souple avec la membrane en PDMS qui a été moulée par les motifs du moule maître.

10 La libération de la membrane par rapport au film souple est obtenue par dissolution de la couche sacrificielle.

Une gravure plasma est réalisée pour éliminer l'épaisseur résiduelle du polymère et obtenir des ouvertures traversantes dans la membrane.

15 La figure 3 décrit un exemple de moule maître en silicium avec une résine microstructurée en micropiliers coniques, obtenu par lithographie 2 photons. Les micropiliers d'une hauteur de 100 μm sont espacés bord à bord de 35 μm . L'image a été réalisée au microscope électronique à balayage.

20 La figure 4 correspond à un exemple (A) de face basale (2) d'un échafaudage conique/tripode réalisé en PDMS à partir d'un moule maître (B) en silicium recouvert d'une résine microstructurée en micropiliers d'une hauteur de 100 μm et espacés bord à bord de 35 μm . Le moule maître a été obtenu par la technique de lithographie à 2 photons.

25 Le procédé selon l'invention est utilisé pour la réalisation d'un objet moulé microstructuré particulièrement adapté à la culture de cellules biologiques. Le procédé implique, tout d'abord, une étape dans laquelle une membrane poreuse déformable plastiquement est préparée, ayant une pluralité de micropores. Les micropores sont de préférence configurés comme des micropores et sont répartis régulièrement sur le film. Les micropores sont façonnés pour être continus d'un côté à l'autre du film, de sorte qu'ils soient perméables.

30

La Figure 5 décrit les différents exemples de motifs de micropores utilisés pour réaliser les échafaudages microstructurés. Dans ces exemples, les motifs peuvent être conique simple, conique/tripode ou conique avec des bases hexagonales sur chaque face.

35

EXEMPLES

Exemple 1

Préparation d'un échafaudage

5 Le processus de fabrication d'un l'échafaudage selon la présente invention a été initié par la création d'un moule maître à partir d'un wafer silicium 2 pouces d'orientation [100] et d'une épaisseur de 280 microns. Le wafer a été préalablement nettoyé avec des solvants avant de déposer une résine photosensible du type SU8 par enduction centrifuge à 3000 rotations par minutes (rpm). Un traitement thermique à 180 °C a été réalisé après cette
10 enduction pour permettre l'évaporation du solvant contenu dans la résine.

La lithographie 3D à 2 photons a été réalisée sur la base d'un fichier STL préalablement téléchargé dans l'équipement. Ce fichier comporte tous les motifs tripodes sur une surface de 5 mm x 5 mm avec une périodicité de 50 µm. Après l'écriture des 25 mm² sur le substrat enrésiné, la résine a été développée dans une base puis rincée dans
15 l'isopropanol. Un séchage « support critique » à base de CO₂ pendant 45 minutes a permis de fixer définitivement les motifs conique/tripodes en SU8 d'une hauteur de 120 microns sur le substrat de silicium, l'ensemble formant le moule maître.

Un traitement anti adhésif à base trimethylchlorosilane pendant 5 minutes a été déposé en phase vapeur sur ce moule.

20 Le polymère, du PDMS à l'état liquide a été mélangé avec son catalyseur au platine dans un rapport de 13:1 puis dégazé et déposé sur le moule maître par enduction centrifuge à 900 rpm pendant 60 secondes. Un film souple de 20 µm en polycarbonate enduit d'une couche sacrificielle de 100 nm de PVA soluble dans l'eau a été déposé sur le PDMS. Une pression de 190 Pa a été exercée pour réduire l'épaisseur résiduelle du polymère. Un recuit de 30 min à
25 80°C a permis de durcir le polymère. Le décollement du film avec la membrane se fait manuellement, la membrane microstructurée avec des tripodes de 100 microns de haut a ainsi été séparée du moule maître.

La séparation entre la membrane et le film souple a été obtenue par dissolution de la couche sacrificielle. La gravure de l'épaisseur résiduelle de la membrane microstructurée pour
30 obtenir des trous traversant sur chaque face a été réalisée dans un bâti de type RIE avec un mélange gazeux de O₂ et de CF₄ et une puissance de 25 W. Le temps de gravure est fonction de l'épaisseur résiduelle, typiquement il est compris entre 6 et 7 minutes.

Exemple 2

35

Mode opératoire pour obtenir le tissu composé de photorécepteurs et une couche de RPE selon la figure 6

Dans cet exemple, le tissu composé de photorécepteurs et de cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien a été réalisé selon le mode opératoire suivant :

- 5 Dans un premier temps, des cellules souches embryonnaires humaines ont été différenciées pendant 3 semaines en cellules progénitrices rétiniennes (caractérisées par l'expression des gènes *VSX2* et *PAX6*). Puis d'autres cellules souches embryonnaires humaines ont été différenciées en cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien pendant 3 mois. Ces dernières ont ensuite été congelées en banque d'ampoules dans des cuves d'azote liquide.
- 10 Les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien ont ensuite été décongelées et remises en culture sur un support plastique poreux pour reformer un épithélium pendant 4 semaines. Le milieu de culture a été remplacé deux fois par semaine.
Un échafaudage avec des micropores coniques (réalisé selon l'exemple 1) a été stérilisé par des bains d'éthanol à 70% puis des bains de solution saline. Celui-ci a été recouvert d'une
- 15 solution de matrice commerciale L7 (Lonza) diluée au 1/100^e dans une solution saline contenant du calcium et du magnésium, puis incubé 1heure à 37°C et 5% de dioxyde de carbone.
La solution de matrice a été retirée à l'issue de l'incubation. L'échafaudage a ensuite été placé au-dessus de l'épithélium pigmentaire rétinien. Les progéniteurs rétiniens dérivés des
- 20 cellules souches embryonnaires à 3 semaines de culture ont ensuite été dissociés avec une solution de Tryple puis comptés et ensemencés dans l'échafaudage à la densité de 500 000 cellules par cm². Le milieu de culture a été renouvelé 3 fois par semaine pendant 3 mois.
A l'issue des 3 mois de culture, le tissu a été fixé dans une solution de paraformaldéhyde à 4% pendant 15 minutes. Le tissu a été ensuite rincé et perméabilisé dans une solution saline
- 25 contenant 0,1% de tritonX100. Le tissu a été incubé 30 minutes dans cette même solution contenant 5% de sérum animal puis exposé durant la nuit à un anticorps primaire dirigé contre la protéine récoverine (exprimée par les photorécepteurs matures). Le lendemain, le tissu a été rincé dans une solution saline puis exposé 1 heure à un anticorps secondaire dirigé contre le premier anticorps et couplé à une molécule fluorescente. Le tissu a été ensuite
- 30 rincé, coloré avec du DAPI (pour marquer l'ADN du noyau des cellules) et monté sur des lames de microscopie. L'imagerie du tissu a été réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence confocal.
La figure 6 montre sur l'image de gauche, la reconstruction d'une section réalisée dans l'épaisseur du tissu où sont visualisés sur la partie inférieure les noyaux des cellules de
- 35 l'épithélium pigmentaire rétinien avec juste au-dessus des prolongements des

5 photorécepteurs identifiés par le marquage à la récoverine. L'image de droite est une reconstruction en 3 dimensions du tissu où le signal à la récoverine est visualisé dans chacun des micropores. L'échelle indiquée est en μm . Le signal à la récoverine est un marqueur des photorécepteurs et montre la polarisation verticale des cellules dans les micropores au-dessus des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien.

REVENDEICATIONS

1. Echafaudage qui comprend ou est constitué d'une membrane microstructurée comprenant des micropores de forme conique traversants ladite membrane au niveau d'une première surface apicale (1) et au niveau d'une seconde surface basale (2) caractérisée en ce que,

-la surface apicale (1) de la membrane présente des micropores d'un diamètre supérieur au moins trois fois, de préférence au moins quatre fois au diamètre des micropores de la surface basale (2) de la membrane.

2. Echafaudage selon la revendication 1, caractérisé en ce que,

-la surface apicale de la membrane (1) présente des micropores d'un diamètre (d1) compris de 15 μm à 25 μm , de préférence compris de 18 μm à 22 μm ,

-la surface basale de la membrane (2) présente des micropores d'un diamètre (d2) compris de 4 μm à 8 μm , de préférence compris de 5 μm à 6 μm .

3. Echafaudage selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que les micropores de forme conique sont de type bipode, tripode ou quadripode.

4. Echafaudage selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'épaisseur de la membrane microstructurée est comprise de 80 μm à 120 μm .

5. Echafaudage selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les micropores sont espacés d'une distance comprise de 20 μm à 40 μm de bord à bord.

6. Echafaudage selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la membrane microstructurée est constituée d'un polymère biocompatible, et optionnellement biodégradable.

7. Echafaudage selon la revendication 6, caractérisé en ce que le polymère est le PDMS ou le PLGA.

8. Echafaudage selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la membrane microstructurée estensemencée avec des cellules en particulier des photorécepteurs, des précurseurs de photorécepteurs ou des progéniteurs rétiniens.

9. Utilisation de l'échafaudage selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, pour réaliser un greffon implantable.

10. Utilisation de l'échafaudage selon la revendication 9, caractérisé en ce que le greffon implantable comprend ou est constitué

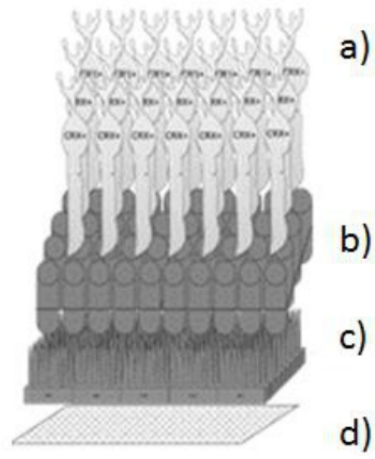
(1) d'une couche supérieure de photorécepteurs ou de précurseurs de photorécepteurs ou de progéniteurs rétiniensensemencés à l'intérieur (2) d'un échafaudage microstructuré, (3) d'une couche inférieure de cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien cultivées sur (4) un support de nature biologique ou polymérique.

ABREGE

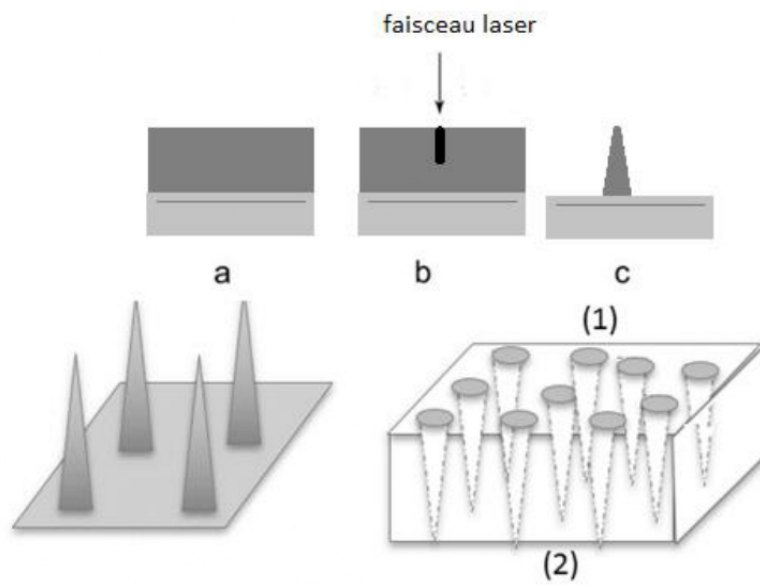
La présente invention concerne la préparation d'un échafaudage microstructuré correspondant à un matériau de support de type membrane biocompatible pour la culture cellulaire. La présente invention concerne également une composition comprenant l'échafaudage microstructuré et des cellules en particulier des photorécepteurs. La présente invention s'applique notamment à la préparation d'un greffon implantable pour le traitement de maladies de l'épithélium pigmentaire rétinien et de la rétine neurale.

Fig. 1

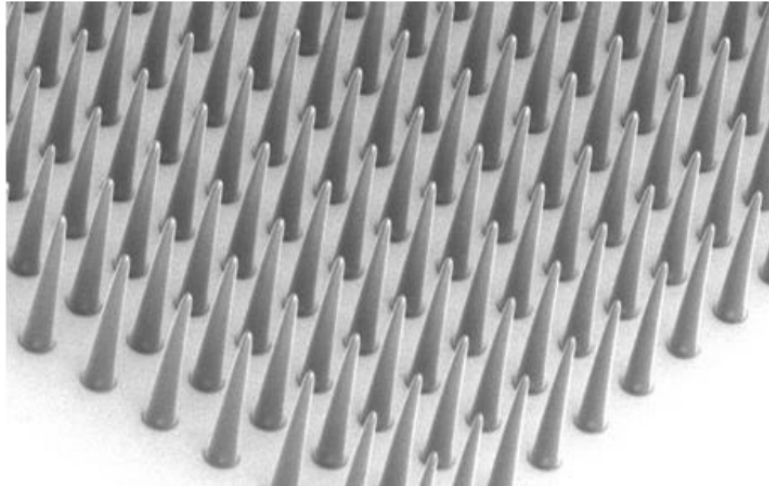
[Fig 1]



[Fig 2]

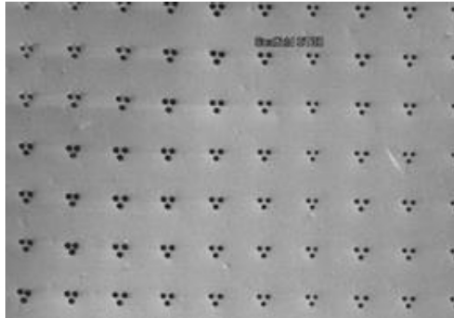


[Fig 3]

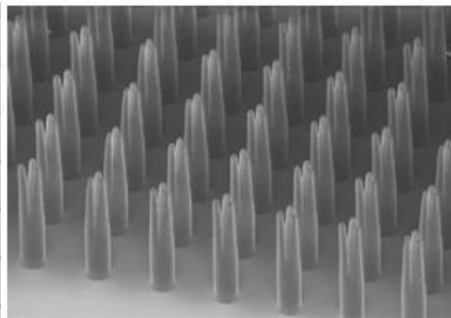


[Fig 4]

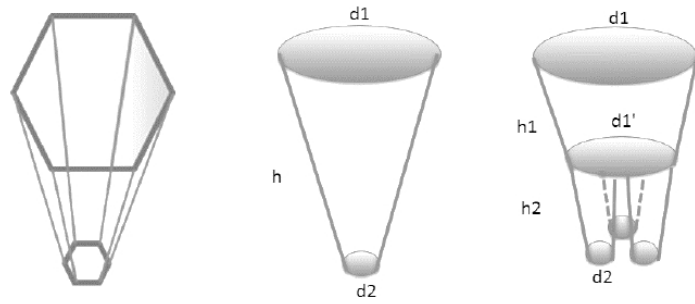
A



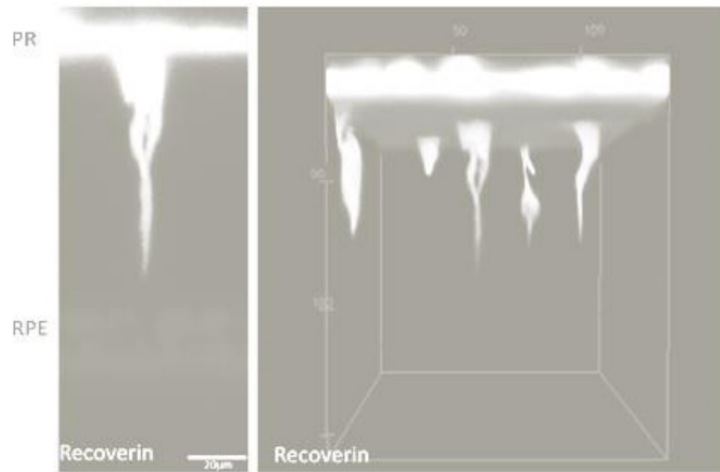
B



[Fig 5]



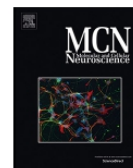
[Fig 6]





Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Neuroscience

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymcne

Human pluripotent stem cells: A toolbox to understand and treat retinal degeneration

Lise Morizur^{a,b,c}, Elise Herardot^{a,b}, Christelle Monville^{a,b,*}, Karim Ben M'Barek^{a,b,c,*}^aINSERM U861, I-Stem, AFM, Institute for Stem Cell Therapy and Exploration of Monogenic Diseases, 91100 Corbeil-Essonnes, France^bUniversité Paris-Saclay, Université d'Evry, U861, 91100 Corbeil-Essonnes, France^cCentre d'Etude des Cellules Souches, 91100 Corbeil-Essonnes, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Human pluripotent stem cells
Retinopathies
Cell therapy
Disease modeling
Age-related Macular Degeneration
Retinitis Pigmentosa

ABSTRACT

Age-related Macular Degeneration (AMD) and Retinitis Pigmentosa (RP) are retinal degenerative disorders that dramatically damage the retina. As there is no therapeutic option for the majority of patients, vision is progressively and irreversibly lost. Owing to their unlimited renewal and potency to give rise to any cell type of the human adult body, human pluripotent stem cells (hPSCs) have been extensively studied in recent years to develop more physiologically relevant *in vitro* cellular models. Such models open new perspectives to investigate the pathological molecular mechanisms of AMD and RP but also in drug screening. Moreover, proof-of-concept of hPSC-derived retinal cell therapy in animal models have led to first clinical trials. This review outlines the recent advances in the use of hPSCs in pathological modeling of retinal degeneration and their use in regenerative medicine. We also address the associated limitations and challenges that need to be overcome when using hPSCs.

1. Introduction

Composed of different neural layers, the retina converts light inputs into electrical signals, which are then transmitted to the brain. Photoreceptors (PRs), cones and rods, are the primary cells involved in light detection. Rods are sensitive to dim light whereas cones detect specific wavelengths allowing color vision. The electrical signal generated by PRs is further processed by other neurons (bipolar, amacrine, horizontal cells) and transmitted to the brain through ganglion cells. A number of retinal diseases, such as Age-related Macular Degeneration and Retinitis Pigmentosa, leads to the degeneration of PRs which ultimately results in vision impairment and in some cases in blindness. Although highly informative, animal models are not able to recapitulate all the pathological hallmarks of these pathologies and human diseased tissues are difficult to obtain. Development of differentiation protocols to generate retinal cells from human pluripotent stem cells (hPSCs) has considerably broaden the access to human cellular models of retinal degeneration. They offer renewed opportunities to better understand the underlying pathological mechanisms and develop new therapeutics. In addition, retinal tissues derived from healthy hPSCs also represent a promising source for regenerative medicine. This review will discuss these different aspects of the use of hPSCs to understand and treat retinal disorders.

2. Retinal degenerative diseases

2.1. Age-related Macular Degeneration

After uncorrected refractive errors and cataracts, AMD is the third leading cause of moderate or severe vision loss worldwide (Flaxman et al., 2017). Projections for 2040 are alarming with an estimated number of people affected with all stages of the disease of 288 million (Wong et al., 2014). Interestingly, the prevalence of all stages of AMD is higher (12.3%) in people with European ancestry than Asian (7.4%) or African (7.5%) populations (Wong et al., 2014). The geographically isolated population of Timor-Leste has an even lower prevalence for AMD - < 0.5% - suggesting the influence of genetic context on disease appearance (Morrison et al., 2015). AMD is classified according to the stage of the disease based on ophthalmic examinations. Early or intermediate AMD is characterized by the presence in the macula of medium drusen (diameter between 63 and 125 μm ; early AMD) or large drusen (larger than 125 μm) and changes in retinal pigmentation (intermediate AMD) (Mitchell et al., 2018). Late AMD is defined by the presence of macular choroidal neovascularisation (wet AMD, corresponding to 10–20% of cases) or macular atrophy (dry AMD, corresponding to 80–90% of cases) (Mitchell et al., 2018; Al-Kharsan et al., 2019). Early AMD is usually asymptomatic (Mitchell et al., 2018). Initial symptoms

* Corresponding authors at: INSERM U861, I-Stem, AFM, Institute for Stem Cell Therapy and Exploration of Monogenic Diseases, 91100 Corbeil-Essonnes, France.
E-mail addresses: cmnville@istem.fr (C. Monville), kbenmbarek@istem.fr (K. Ben M'Barek).

<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2020.103523>

Received 31 January 2020; Received in revised form 24 May 2020; Accepted 30 June 2020

Available online 04 July 2020

1044-7431/ © 2020 The Author(s). Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

are distortion of central vision progressing towards scotomas in the central visual field. In wet AMD, new vessels develop in the macular area and are susceptible to leak and generate hemorrhages, damaging the macula (Handa et al., 2019). Vision loss can be fast and severe in this context. Vision loss in dry AMD is more progressive with the degeneration of the retinal pigment epithelium (RPE) and subsequent atrophy of macular retina.

AMD is caused by a combination of genetic and environmental factors. The major risk factor is age. The prevalence of all stages of AMD is of 3.5% between the ages of 55 and 59 years but rises to 27.3% after 85 years in the European population (Colijn et al., 2017). Smoking is a critical modifiable risk factor in the development of late AMD (Mitchell et al., 2002). Other environmental risks include sunlight exposition, diet, alcohol and hypertension. Among the genes associated with increased risk for AMD, complement factor H (*CFH*) and age-related maculopathy susceptibility 2/high-temperature requirement factor A1 (*ARMS2/HTRA1*) polymorphisms are to date the most important (Handa et al., 2019). Several mechanisms are suggested to play a role in AMD such as inflammation, defective regulation of the complement system, oxidative stress, metabolic dysfunctions, accumulation of lipids and extracellular matrix alterations (Handa et al., 2019; Hussain et al., 2019; Brown et al., 2018). However, the exact pathological mechanisms are still not fully understood. Accumulation of proteins and lipids in the Bruch's membrane is suspected to promote inflammation and affect the circulation of nutrients and liquids, damaging the RPE. In addition, RPE degeneration in dry AMD may precipitate the secondary loss of PRs.

No treatment is currently available for the dry form of AMD. The most effective clinical treatment for wet AMD patients is anti-VEGF therapy delivered at regular intervals to prevent worsening eyesight. Although response to therapy is not systematic, some patients experience a moderate improvement in visual acuity (Al-Kharsan et al., 2019). Patient compliance to treatment protocol could be one of the reasons for incomplete response as injections are frequent (once a month or every 2 months) and expensive. Diet supplementation with zinc and antioxidants in AMD patients has also been suggested to decrease the risk of progression to late AMD (Age-Related Eye Disease Study Research G, 2001).

2.2. Retinitis Pigmentosa

RP is a heterogeneous group of inherited retinal dystrophies, which affects 1.5 million of patients worldwide (Verbakel et al., 2018). The inheritance of RP is autosomal-recessive in 50–60% of all cases and linked to chromosome X in 5–15% of patients (Pfeiffer et al., 2019; Hartong et al., 2006). Syndromic forms of RP account for 20–30% of cases, including Usher's and Bardet-Biedl syndromes (the most frequent ones) (Hartong et al., 2006). The ophthalmic eye fundus examination reveals the classical clinical triad of RP: bone spicule pigmentation, which may correspond to melanin deposits from RPE cells that have migrated into the retina, attenuation of retinal vessels that could be secondary to PR loss and waxy pallor of the optic nerve likely due to the presence of glial cells (Verbakel et al., 2018). While clinical manifestations vary according to the underlying genetic defect, RP patients typically experience night blindness - which may not be noticed by patients at early stages - followed by a progressive reduction of the visual field (tunnel vision). RP patients also report seeing flashes of light (photopsia) which worsen under stress (Bittner et al., 2009; Bittner et al., 2012). Central vision is usually preserved until the later stages of the disease. The median age of symptom appearance is 29-year old (Iftikhar et al., 2019). Of note, the age of onset as well as the clinical manifestation and progression of the disease vary depending on the mutated gene in addition to genetic background and environmental factors. Most patients with RP are legally blind by 40-year old due to severe visual field alterations (Hartong et al., 2006).

The primary cellular defect is localized in rods or, for about 5% of cases, in the RPE (Ben M'Barek et al., 2018a). At advanced stages of the

disease, optical coherence tomography shows that the ganglion cell layer and inner nuclear layer are relatively well preserved while the PR layer is completely depleted. However, a retinal remodeling occurs following the complete loss of PRs leading after decades of degeneration to rewiring, glial hypertrophy and global cell death (Pfeiffer et al., 2019). This important aspect of the pathology suggests that the retinal circuitry does not degenerate immediately after loss of PRs. RP patients could thus be eligible to PR cell transplantation during a specific time window. To date, a vast number of disease-causing variants in > 80 genes for RP have been identified (<https://sph.uth.edu/retnet/sum-dis.htm>). Most of these genes encode proteins that play a role in the photo-transduction cascade, the visual cycle, ciliary structures and transport, RNA splicing as well as intracellular trafficking (Verbakel et al., 2018; Hartong et al., 2006). However, disease-causing mutations are still unknown in 30% of non-syndromic and 50% of autosomal-dominant RP patients (Verbakel et al., 2018; Hartong et al., 2006).

Few therapeutic options are available to treat RP. The only approved treatment is a gene therapy for patients with *RPE65* gene mutations (2% of RP cases, Luxturna®) (Ben M'Barek and Monville, 2019). This therapy was shown to be safe and induced an improvement in navigational abilities and light sensitivity. The effect was found maximal at 30-day post-injection and stable for at least 4 years (Maguire et al., 2019). Vitamin A palmitate as well as docosahexaenoic acid (DHA, an omega-3 fatty acid present in oily fish) supplementations are recommended by some clinicians. While still debated, a few studies reported that such nutritional treatments might delay vision degradation (Hartong et al., 2006; Rayapudi et al., 2013; Zhao et al., 2019). Approximately 40–50% of individuals with RP develop cataracts that further impair their visual acuity. These patients can benefit from cataract surgery with significant visual gain (Bayyoud et al., 2013; Auffarth et al., 1997). Finally, night vision devices (i.e. specific goggles) that amplify light can be used by patients to improve their mobility (Hartong et al., 2004; Ikeda et al., 2019).

3. Generation of retinal cells from human pluripotent stem cells

The development of physiologically relevant cellular models is a key step towards modeling the complexity of retinal diseases. Indeed, it is essential to accurately capture the biological complexity of the retina *in vitro* to better understand the underlying pathological mechanisms and ultimately find new therapeutics. The different cell sources to generate such models include early postnatal PR precursors from animal models, human fetal and adult primary cells or tissues, and more recently hPSCs - including both human embryonic stem cells (hESCs) and human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) (reviewed in (Ben M'Barek and Monville, 2019)). hiPSCs have gained great interest from the research community owing to their unlimited self-renewal potential and their ability to differentiate into any cell type of the adult body. First derived in 1998, hESCs are isolated from the inner cell mass of human blastocyst-stage embryos (Thomson et al., 1998). Sharing the same key properties, hiPSCs are adult cells that have been genetically reprogrammed to an embryonic stem cell-like state by the forced expression of a cocktail of pluripotency factors (Takahashi et al., 2007). Besides their use in disease modeling studies, they also represent a renewable cell source that enable the derivation of large numbers of functional retinal cells for regenerative medicine.

3.1. Eye development

Substantial progress has been made over the last 15 years in the development of robust protocols to differentiate both hESCs and hiPSCs into retinal cells by mimicking *in vitro* the developmental steps occurring in the human embryo. The vertebrate retina is derived from the neuroectoderm, initially through the concomitant inhibition of Activin/Nodal, bone morphogenetic protein (BMP) and Wnt/ β -catenin signaling (Smith et al., 2008; Chambers et al., 2009; Fuhrmann, 2008). Shortly

after gastrulation, the anterior neural plate is specified into the eye field in which cells co-express a unique combination of transcription factors called the eye-field transcription factors (EFTFs). Then the eye field evaginates from the diencephalon to form bilateral optic vesicles containing retinal stem cells that will give rise to the optic stalk, RPE and neural retina (NR) (Fuhrmann, 2010). These retinal stem cells commit towards a specific cell lineage after invagination into the bi-layered optic cup depending on their initial regionalization: while the NR originates from the inner layer, the outer layer gives rise to the RPE (Zhao et al., 2017). Within the naive NR, retinal progenitor cells (RPCs) give rise in a temporal and conserved order to the different retinal cell types, including PR precursors, to form the mature retina with its characteristic laminar cytoarchitecture.

This differentiation process is tightly regulated by exogenous signals coming from adjacent tissues and cell-intrinsic factors, such as Wnt, fibroblast growth factor (FGF), BMP, Notch, sonic hedgehog (SHH), retinoic acid (RA) and activin A signalings (Zhao et al., 2017). Levering on developmental studies, the overall strategy is to expose hPSCs to signaling molecules in a time and dose dependent manner along the differentiation process to generate the retinal cell type of interest. For an in-depth description of differentiation protocols, we refer the reader to excellent review articles (Leach and Clegg, 2015; Llonch et al., 2018; Gagliardi et al., 2019).

3.2. Derivation of RPE cells

Both hESCs and hiPSCs have the potency to differentiate into RPE cells that are equally effective in protecting the retina from degeneration following transplantation into the subretinal space of a RP rodent model (Riera et al., 2016). A summary of selected differentiation protocols to generate RPE cells from hPSCs is listed in Table S1.

Initial studies demonstrated the spontaneous differentiation potential of hPSCs into RPE cells upon FGF2 withdrawal from the culture medium (Klimanskaya et al., 2004; Buchholz et al., 2009; Ferguson et al., 2015; Ben M'Barek et al., 2017). After a few weeks in culture, pigmented areas begin to emerge and cells acquire a distinctive cobblestone morphology. These pigmented patches are manually isolated and amplified to obtain a pure population of RPE cells (Fig. 1). However, such “spontaneous” protocol is highly operator-dependent, time-consuming (2–3 months) and does not allow for the production of large cell banks. To overcome these limitations, studies have focused on directing RPE differentiation by adding signaling molecules that mimic developmental cues known to be important in RPE development and specification at critical time points.

Early work by the group of Masayo Takahashi reported that hPSCs exposed to Wnt and Nodal antagonists using a SFEB (serum-free floating culture of embryoid body-like aggregates) system gave rise to 30–35% of cells positive for the RPE characteristic transcription factors PAX6 and MITF after 6 weeks (Osakada et al., 2008; Hiramami et al., 2009). Two other studies showed that addition of nicotinamide and Activin A, a member of the TGF- β superfamily, promoted the differentiation of hPSCs to neural and subsequently to RPE fate with 80% of pigmented cells after 8 weeks in culture (Idelson et al., 2009; Kokkinaki et al., 2011). Based on previous research (Idelson et al., 2009; Koh, 2010; Lamba et al., 2006), Buchholz et al. further combined use of retinal inducing factors (Noggin, DKK1, insulin-like growth factor-1 (IGF-1), FGF2) and known RPE differentiation factors (nicotinamide, Activin A, FGFR/VEGFR inhibitor SU5402, and vasoactive intestinal peptide - VIP) (Buchholz et al., 2013). Addition of these factors at specific times led to the conversion of approximately 80% of the cells to an RPE phenotype in only 14 days, as evidenced by the expression of pigmentation marker PMEL17 (Buchholz et al., 2013). Although these directed protocols considerably increased the yield of RPE cells from hPSCs compared to that obtained with the spontaneous method, mechanical enrichment of pigmented cells during the course of the differentiation was still required to obtain a homogenous RPE cell

population. The same team improved the protocol by addition of CHIR99021, an activator of the Wnt canonical pathway. It improved significantly the efficiency of RPE derivation from hESCs to 97%, bypassing the necessity of manual enrichment (Leach et al., 2015). However, it is important to note that this protocol did not significantly reduce the differentiation duration from that of the “spontaneous” method as RPE cells were banked after > 100 days in culture (Leach et al., 2015). More recently, our group developed a simplified protocol in which hESCs were treated with nicotinamide, Activin A and CHIR99021 in a sequential manner to obtain highly enriched and functional RPE cells within 84 days (Regent et al., 2019).

As a step towards clinical use in regenerative medicine, differentiation protocols were optimized to obtain RPE cells: i) in conditions using a good manufacturing practice (GMP)-compliant production process and ii) in large numbers to treat the millions of patients affected by RPE-associated retinal degeneration (Fig. 1). Some studies addressed these bottlenecks by developing xeno-free/feeder-free protocols (Reichman et al., 2017; Choudhary et al., 2017; Plaza Reyes et al., 2016; Pennington et al., 2015; Vaajasaari et al., 2011). The development of directed differentiation protocols has fostered the implementation of automated systems to upscale the production process and increase its robustness. The use of a modular platform was reported for the long-term maintenance and passaging of hiPSCs and suggested the potential to differentiate cells to retinal lineages, including RPE (Crombie et al., 2017). Matsumoto et al. further demonstrated the feasibility of the automated culture of hiPSC-derived RPE cell sheets in a closed automated cell-culture system, removing the need for operational skills and facilities (Matsumoto et al., 2019). We recently achieved a fully automated process allowing the large-scale production of RPE cells from hPSCs, considerably upscaling the production capacity as > 16 billion of mature and functional RPE cells could now be produced within 12 weeks with only one round of production (Regent et al., 2019).

3.3. Derivation of photoreceptors

A summary of selected differentiation protocols to generate PRs from hPSCs is presented in Table S2.

Pioneering work from the group of Thomas Reh demonstrated the capacity of hESCs to differentiate *in vitro* into PRs (Fig. 2) (Lamba et al., 2006). Using a combination of the eye field inducer IGF-1, BMP signaling inhibitor Noggin and Wnt/ β -catenin signaling pathway antagonist Dkk1, they were able to direct hESCs into 80% of PAX6 + /VSX2 + retinal progenitors after 3 weeks in culture (Fuhrmann, 2008). However, differentiation of these RPCs into PRs was infrequent with only 12% of CRX-positive PR precursors and < 0.01% of S-Opn- or Rhodopsin-positive mature PRs (Fuhrmann, 2008). In two other studies, Osakada et al. cultured hPSCs as embryoid bodies using a SFEB system in presence of Wnt and Nodal antagonists for 20 days before switching them to adherent culture (3D/2D protocol) with the addition of factors known to be involved in rod genesis (RA, taurine, FGF2, Shh) (Osakada et al., 2008; Osakada et al., 2009). Twenty percent of CRX-positive cells were obtained, giving rise later to approximately 8.5% of Rhodopsin-positive mature PRs by day 200 (Osakada et al., 2008; Osakada et al., 2009). It was also the first demonstration that inhibition of Notch signaling *in vitro* with the γ -secretase inhibitor DAPT induced the cell cycle exit of proliferating RPCs and a concomitant increase in early born ganglion cells and CRX-positive PR precursors (Osakada et al., 2008). Using a similar 3D/2D approach, Meyer and collaborators showed that hPSCs could differentiate into early and late PR phenotypes without the need of exogenous factors in a sequence and time course highly reminiscent of normal retinal development (Meyer et al., 2009). This protocol was further refined into a 3D/2D/3D method to isolate neural rosette-containing cell colonies maintained as cellular aggregates in suspension (Meyer et al., 2011). Using this technique, a subpopulation of aggregates developed optic vesicle characteristics and differentiated

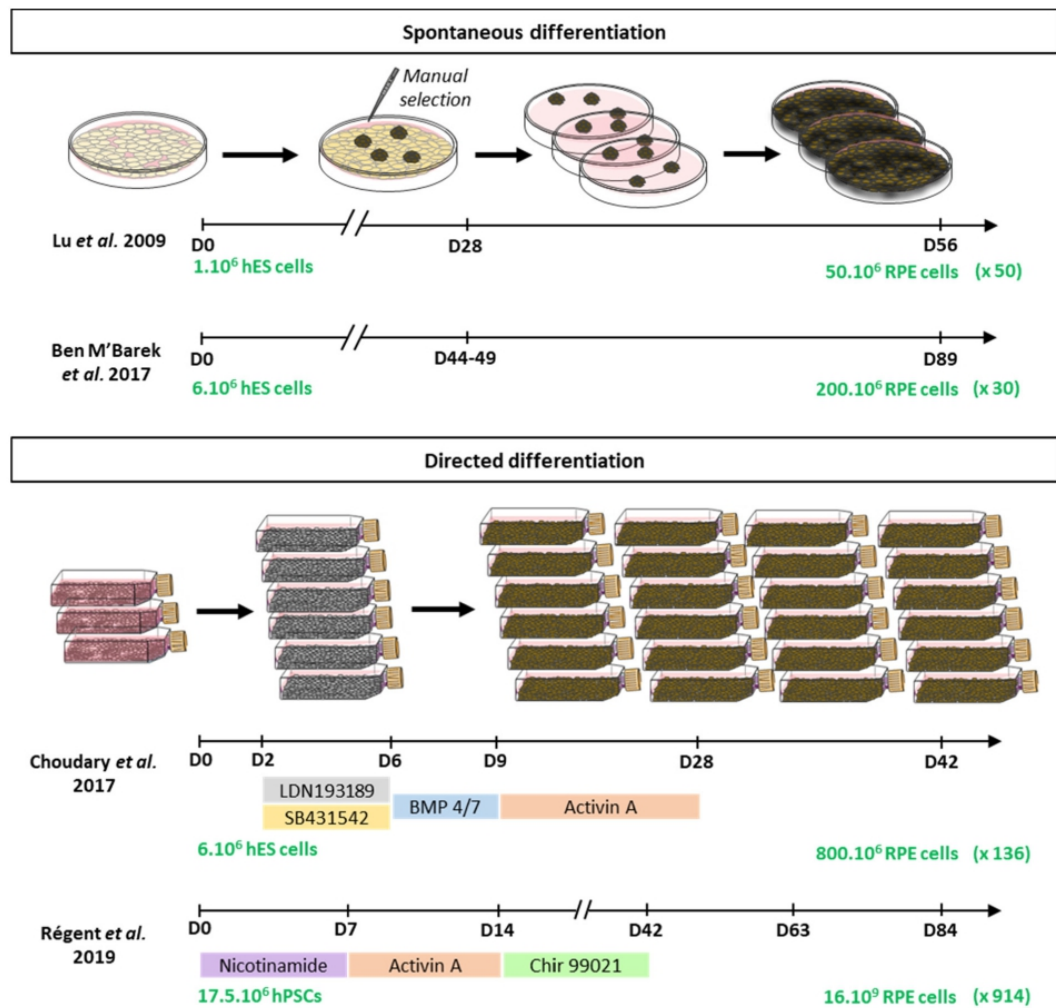


Fig. 1. Schematic representation of spontaneous and directed differentiation methods to obtain RPE cells from hPSCs based on selected studies.

towards the PR lineage with 56% of CRX-positive cells by day 50 (Meyer et al., 2011). Although these studies successfully recapitulated the main steps of retinal development *in vitro*, key structural and functional features of PRs, *i.e.* the presence of outer-segment discs and light sensitivity, were still lacking.

Considerable progress came with the first production of self-organized bi-layered optic cup structures from hESCs that then differentiated into a multilayered neural retina containing retinal cells, including cones and rods (Fig. 2) (Nakano et al., 2012). Importantly, this study was the first to report the formation of PRs with reasonable development of inner segments and connecting cilia (Nakano et al., 2012). Based on the protocol developed by Meyer et al. (Meyer et al., 2009; Meyer et al., 2011), the group of Valeria Canto-Soler more recently demonstrated that hiPSCs could also self-organize into retinal cups that generate a fully laminated 3D retinal tissue in presence of serum, RA and taurine (Zhong et al., 2014). Noteworthy, it was the first evidence that PRs reached an advanced stage of maturation *in vitro* as evidenced by some level of photosensitivity in a limited number of cells and the presence of a minority of PRs with outer-segment discs after 27 weeks of differentiation (Zhong et al., 2014). Although introduction of 3D organoid technology has dramatically improved the generation of

mature PRs, current protocols are still hindered by variability issues. A recent study by Capowski et al. generated retinal organoids from 16 hPSC lines and monitored their appearance and structural organization over time in an attempt to develop a staging system to reduce inconsistencies in cultures (Capowski et al., 2019). Three consistent morphological stages of hPSC-derived retinal organoid development were distinguished by light microscopy, each one corresponding to a specific cellular composition and lamination relative to the timeline of differentiation (Capowski et al., 2019).

For future clinical use of hPSC-derived PRs, recent studies have focused on adapting these research-grade protocols to GMP-grade under feeder-free and xeno-free conditions (Reichman et al., 2017; Choudhary et al., 2017; Wiley et al., 2016). While functional RPE cells are currently derived from hESCs with high yield and purity using GMP-compliant differentiation protocols, challenges remain for PR production. This is notably due to extremely long culturing times required to obtain mature PRs *in vitro* (> 100 days), operator-dependent manual enrichment of neural retina/optic cup structures as well as heterogeneous cellular composition of organoids. Different selection strategies have been developed to enrich PRs from retinal cultures. A screen of human retinal samples and hPSC-derived retinal organoids against a

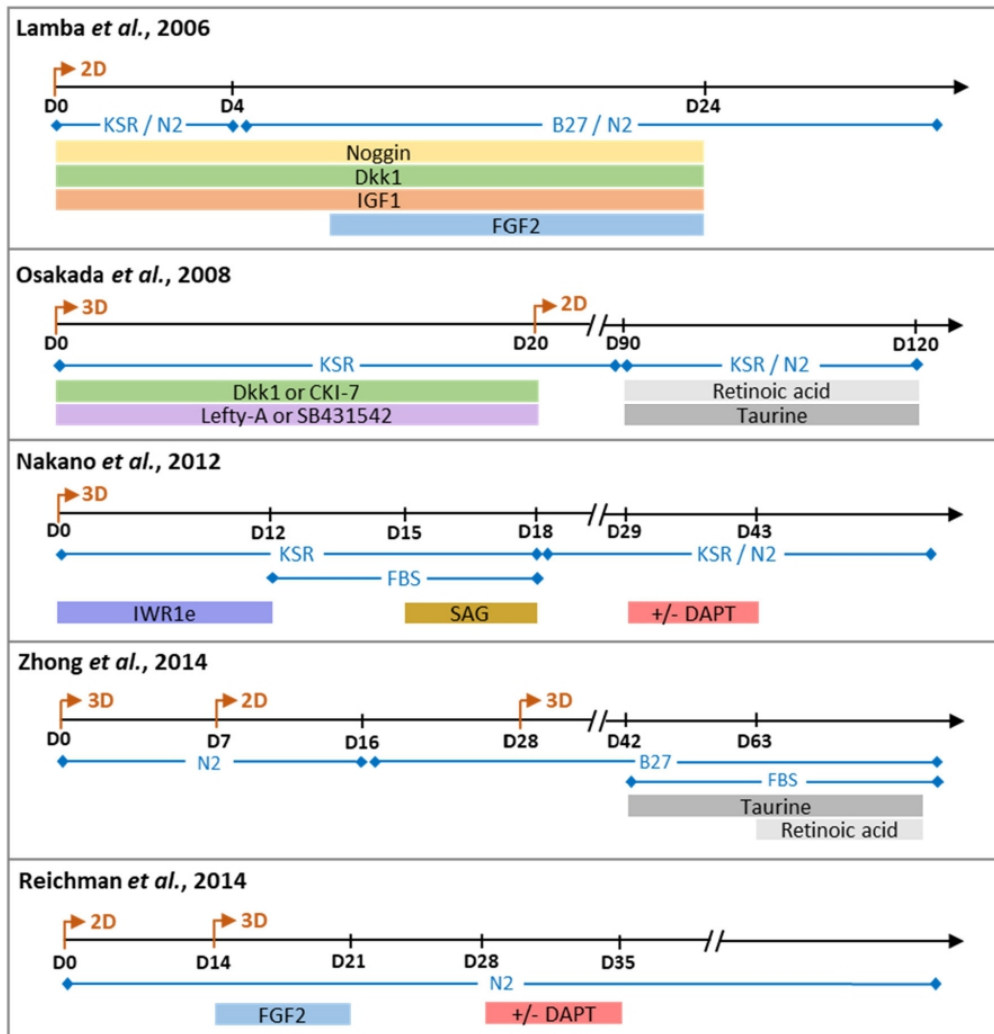


Fig. 2. Main protocols for the differentiation of hPSCs into PRs *in vitro*.

large panel of human monoclonal antibodies using a high throughput flow cytometry approach identified PR-specific cell surface markers (Lakowski et al., 2018). Double negative CD29/SSEA-1 selection increased the enrichment of CRX and Recoverin positive cells from 16.5% to 61% from day 200 retinal organoid cultures (Lakowski et al., 2018). In addition, a cone biomarker panel combining CD markers for positive cone selection (CD26, CD147, CD133) and negative selection of undesirable cells (SSEA-1) successfully enriched L/S-opsin cones from fetal retina and 17–18 week-old hESC-derived retinal samples to 30% and 50% respectively (Welby et al., 2017). The group of Olivier Goureau also showed that CD73 targeting by magnetic-activated cell sorting (MACS), previously described for the enrichment of mouse PSC-derived PRs (Eberle et al., 2011), was an effective strategy to isolate a transplantable population of PRs from hiPSC-derived retinal organoids at day 120 (Gagliardi et al., 2018).

4. Human pluripotent stem cells to model retinal degeneration

4.1. Cellular models

Disease modeling using hPSCs requires a precise experimental design in order to decipher the relevant pathological mechanism with minimal bias. Three parameters are key to define: (1) cell type(s) affected, (2) genetic and/or environmental nature of the disease and (3) appropriate controls.

First, the retinal cell type that is affected should be defined according to the selected disease. If the degeneration/dysfunction is a secondary cause of another cell type, co-cultures or complex assemblies such as organoids might be considered. Cultures of an isolated cell type help to discriminate between molecular mechanisms that are cell autonomous and those that are cell extrinsic. Therefore, these different approaches are complementary to capture the complexity of pathological mechanisms. The second aspect is related to the genetic nature of a disease. A causative gene (RP or other genetic disorders) are relatively easy to model. When susceptibility alleles are identified as suggested for AMD, the variability and inconsistency of the model could be difficult

to predict. For this reason, appropriate controls should be defined early in experimental design. Pioneer studies used one hiPSC line to characterize a disease but this is not sufficient nowadays as troubles with reproducibility were frequently reported. Indeed, the genetic background of patient or control cell lines could interfere with the marker evaluated. Therefore, it is important to reproduce the experiments with other hPSC lines to capture the relevant phenotypes. In addition, CRISPR/Cas9 technology allows precise gene editing that could be used both to restore the corrected gene or protective allele in patient hPSCs or in the opposite case to generate the gene mutation or susceptibility allele in non-affected hPSCs. Such isogenic lines that neutralize the impact of different genetic backgrounds are powerful to isolate contribution of a gene mutation or an allele to a disease mechanism.

4.1.1. Age-related Macular Degeneration

As a multifactorial and late onset disease, AMD is by nature difficult to model. The genetic contribution to the disease is well established with *CFH* and *ARMS2/HTRA1* variants being the most strongly associated (Handa et al., 2019). In a recent genome-wide association study, 52 independent risk variants distributed across 34 loci were also identified (Fritsche et al., 2016). However, their exact roles are still largely unknown. Thus, the global strategy is to evaluate the implication of the different risk alleles associated to AMD, focusing on the most affected cell type (i.e. RPE cells). Thereafter, we will only focus on AMD models linked to *CFH* and *ARMS2/HTRA1* variants.

AMD hiPSC derived RPE (hiPSC-RPE) cells carrying the *ARMS2/HTRA1* high-risk genotype did not present an obvious diseased phenotype but were found similar to 1-year old wildtype monkey RPE (Yang et al., 2014). As lipofuscin fluorophore A2E accumulates with age in normal RPE cells, hiPSC-RPE cells were treated with A2E for 10 days. In that context, hiPSC-RPE cells from AMD patients homozygous for the high-risk haplotype exhibited a reduced protein level and activity of superoxide dismutase 2 (*SOD2*), suggesting a compromised antioxidant capacity (Yang et al., 2014). This was confirmed following exposure to blue light in order to generate oxidative stress (Yang et al., 2014). The same results were also obtained by an exposure to H_2O_2 (Golestaneh et al., 2016). In addition, this last study identified a dysfunction of the NAD-dependent deacetylase sirtuin1 (*SIRT1*) and peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1-alpha (*PGC-1 α*) pathway that is suggested to alter mitochondrial biogenesis and remodeling causing increased reactive oxygen species (ROS) production (Golestaneh et al., 2016). The group of Sally Temple further characterized the effect of the homozygous *ARMS2/HTRA1* risk genotype and evidenced a significantly higher expression of complement and inflammatory factors similarly to what is observed in AMD patients (Saini et al., 2017; Kauppinen et al., 2016) (Fig. 3).

hiPSC-RPE cells carrying the high-risk Y402H polymorphism in *CFH* gene did not exhibit obvious morphological or functional defects (RPE markers, secretion of PEDF, transepithelial resistance, phagocytosis potential). A deeper characterization revealed signs reminiscent of AMD, including increased inflammation, cellular stress, accumulation of lipid droplets and deposition of drusen-like deposits (Hallam et al., 2017) (Fig. 3). *SOD2* gene expression level was, interestingly, also reduced in hiPSC-RPE cells carrying the high risk allele. When *CFH* gene is overexpressed, hiPSC-RPE cells exposed to oxidized lipids are protected from cell death mediated by a caspase dependent apoptosis process (Borras et al., 2019). Taken together, these results suggest that the *CFH* gene function in response to oxidative stress is altered by the high-risk Y402H polymorphism.

4.1.2. Retinitis Pigmentosa

hiPSC technology has also been used over the last decade as a model platform to study RP, the most common form of hereditary retinal disorder (Table 1). In the first report of an *in vitro* disease model, the group of Masayo Takahashi derived hiPSCs from RP patients carrying known causative mutations in the *RP1* axonemal microtubule

associated protein (*RP1*), Pim-1 kinase associated protein (*RP9*), peripherin 2 (*PRPH2*) or rhodopsin (*RHO*) gene (Jin et al., 2011; Jin et al., 2012). As observed in RP, patient-derived rod PRs from all mutations selectively degenerated *in vitro*. These cells expressed markers for endoplasmic reticulum stress (*RHO* mutation) and oxidative stress (*RP9* mutation) (Jin et al., 2011; Jin et al., 2012). hiPSCs derived from a RP patient harboring a different *RHO* mutation (E181K) in another study reproduced these findings (Yoshida et al., 2014). This pathological phenotype was reverted to normal in PRs after correction of the expression of *RHO* using a helper-dependent adenoviral vector (Yoshida et al., 2014). However, it should be noted that the gene correction was performed in hiPSCs, not in derived retinal cells. It is unclear whether this rescue could be also obtained in retinal cells and thus be relevant to gene therapy in RP patients.

In an innovative approach, the exome sequencing of an individual with sporadic RP led to the identification of a homozygous Alu insertion in exon 9 of male germ cell-associated kinase (*MAK*), a protein normally expressed in the inner segments, cell bodies, and axons of rods and cones (Tucker et al., 2011). hiPSCs were then generated from a RP patient homozygous for the Alu insertion and a non-*MAK*-associated RP patient as control. Retinal cells derived from the hiPSCs of the RP patient with the *MAK* Alu insertion presented a loss of a tissue-specific *MAK* splice variant normally found in retinal precursors (Tucker et al., 2011). The same group later used a similar strategy to identify disease-causing *USH2A* mutations in an adult patient with autosomal recessive RP (Tucker et al., 2013). *USH2A* mutations were associated to an up-regulation of GRP78 and GRP94 indicative of protein misfolding and subsequent ER stress in hiPSC-derived PR precursors (Tucker et al., 2013). When grafted in mice's subretinal space, these patient's cells were able to develop and mature as PRs. This suggests that the mutation may not interfere with the normal development of the retina but rather with the survival of PRs later in life. Such patients may therefore be amenable to preventive therapeutic strategies before the onset of degeneration. *TRNT1*, a CCA-adding enzyme which belongs to the tRNA nucleotidyltransferase/poly(A) polymerase family functions by adding CCA to the 3' end of all tRNA precursors. A mutation in this gene was expected to cause protein misfolding and ER stress. However, it was not the case in hiPSC-derived retinal organoids from RP patients with mutations in *TRNT1* (Sharma et al., 2017). The cells rather exhibited a defect in autophagy as evidenced by an accumulation of the microtubule-associated protein LC3-II and elevated levels of oxidative stress (Sharma et al., 2017).

Mutations in the Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator (*RPGR*) and *RP2* gene account respectively for 70–90% and 10–20% of X-linked RP (XLRP) leading to rapid vision loss in boys and young men (Bird, 1975; Hardcastle et al., 1999; Breuer et al., 2002). Using a 3D retinal differentiation protocol, Megaw et al. generated PRs from hiPSCs carrying a *RPGR* mutation to investigate its role in PR maintenance and its molecular pathogenesis mechanisms (Megaw et al., 2017). This group identified an increased actin polymerization in the PR connecting cilia, resulting in rhodopsin mislocalisation to the inner segment and ultimately in cell stress and degeneration (Megaw et al., 2017). CRISPR/Cas9-mediated hiPSC gene editing correction of the mutation rescued both PR structure and electrophysiological properties in retinal organoids (Deng et al., 2018). Mutations in the *RP2* gene are the second most common cause of XLRP. In accordance with early studies hinting at the central role of *RP2* in vesicle trafficking and cilia function, Schwarz et al. characterized the phenotype of hiPSC-RPE cells from an *RP2* patient that lost the *RP2* protein expression. These cells displayed mislocalization of the intraflagellar transport protein IFT20 and a disrupted Golgi cohesion (Schwarz et al., 2015). They later showed in hiPSC-derived 3D optic cups that the *RP2* protein, along with the small GTPase ARL3, were key regulators of the trafficking of ciliary tip kinesins (Schwarz et al., 2017). Interestingly, the use of translational read-through inducing drugs caused an increase in functional *RP2* protein levels, reversing the observed disease phenotypes in hiPSC

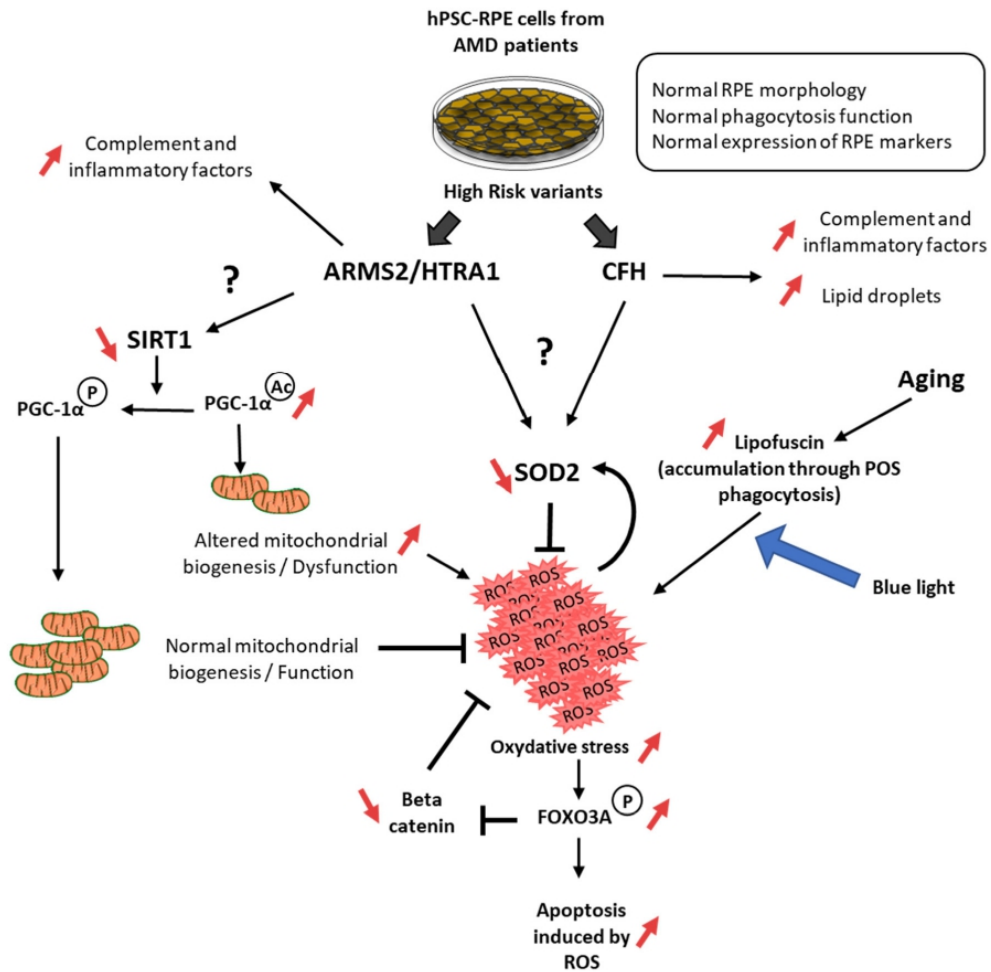


Fig. 3. Current model of pathological mechanisms underlying AMD based on hiPSC-RPE cell studies. Red arrows indicate components that are modulated by the disease (increased or decreased function). P: phosphorylation; Ac: acetylation; RPE: retinal pigment epithelium; POS: photoreceptor outer segment; ROS: reactive oxygen species. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

derived retinal cells (Schwarz et al., 2015; Schwarz et al., 2017).

While the primary cellular defect in RP patients is in most cases localized in PRs, abnormalities in the RPE are also reported in about 5% of cases (Ben M'Barek et al., 2018a). For instance, mutations in Membrane Frizzled-related Protein (*MFRP*), a RPE-specific type II transmembrane protein similar to WNT-binding frizzled proteins, cause autosomal recessive RP. To investigate disease mechanisms, hiPSC-RPE cells were derived from two patients with *MFRP* mutations. These cells had altered actin polymerization, abnormal morphology with less pigments, mislocalized pigment distribution, as well as loss of clear cellular boundaries and cell-to-cell contacts (Li et al., 2014). Furthermore, re-introducing normal *MFRP* expression with AAV vector therapy directly in hiPSC-RPE cells reversed the pathological phenotype (Li et al., 2014). This result suggests that gene therapy could be used to correct disease-causing mutations in RPE cells.

One of the most important functions of RPE cells is their ability to phagocytose shed PR outer segments (POS), a process vital for proper retinal function. Indeed, defects in RPE phagocytosis lead to an accumulation of cellular debris in the subretinal space ultimately resulting in progressive degeneration of PRs, as seen in the RCS rat, a widely used model for recessively inherited retinal degeneration (D'Cruz et al.,

2000). Individuals with mutations in MER receptor tyrosine kinase (*MERTK*), the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, are affected with severe and progressive RP (Gal et al., 2000). *MERTK*-signaling in the retinal pigment epithelium was later shown to be essential for efficient phagocytosis of POS by RPE cells (Feng et al., 2002). In accordance with these observations, hiPSC-RPE cells from individuals harboring mutations in the *MERTK* gene were unable to mediate the engulfment of POS (Ramsden et al., 2017; Lukovic et al., 2015). The use of translational read-through inducing drugs was able to restore *MERTK* expression and phagocytosis function (Ramsden et al., 2017).

4.2. Screening strategies for drug discovery

Besides enabling in-depth mechanistic studies of disease phenotypes *in vitro*, the development of robust differentiation protocols of hPSCs into retinal cells has proven instrumental in the development of high-throughput drug screening strategies to identify novel therapeutic agents. Drug discovery has relied for a long time on molecular target-based approaches, also called "reverse pharmacology" (Zheng et al., 2013). Such hypothesis-driven strategy relies on the identification of a

Table 1
hiPSC based models of RP and associated characteristic phenotypes.

Disease	Mutation	Cell type	Phenotype	Reference
XLRP	RPGR	3D retinal organoids hiPSC-RPE	Mutations perturb RPRGV/gelsolin interaction, compromising gelsolin activation (gelsolin controls actin disassembly in connecting cilium, thereby facilitating rhodopsin transport to POS). Mutations affect cilia length and PR number.	(Megaw et al., 2017) (Beng et al., 2018)
XLRP	RP2	hiPSC-RPE	Complete lack of RP2 protein. IFT20 localization, Gogli cohesion and Gb1 trafficking altered.	(Schwarz et al., 2015)
XLRP	RP2	3D retinal organoids	Decreased number of patient-derived rods <i>in vitro</i> .	(Schwarz et al., 2017)
RP	RP1	Rod photoreceptors	Decreased number of patient-derived rods <i>in vitro</i> .	(Jin et al., 2011)
RP	RP9	Rod photoreceptors	Decreased number of patient-derived rods <i>in vitro</i> . Markers for oxidation or endoplasmic reticulum stress. Oxidation is involved in PR degeneration.	(Jin et al., 2011)
RP	PRPH2	Rod photoreceptors	Decreased number of patient-derived rods <i>in vitro</i> .	(Jin et al., 2011)
RP	RHO	Rod photoreceptors hiPSC-RPE	Decreased number of patient-derived rods <i>in vitro</i> . Markers for oxidation or endoplasmic reticulum stress. Mislocalization of RHO in cytoplasm.	(Jin et al., 2011) (Jin et al., 2012)
RP	MAK	Retinal progenitor cells	MAK is expressed in the inner segments, cell bodies, and axons of PRs. Loss of retina-specific isoform in mutated cells.	(Yoshida et al., 2014)
RP	USH2A	3D retinal organoids hiPSC-RPE	Upregulation of GRP78 and GRP94. Protein misfolding and ER stress. Organoids: Morphological defects, reduced laminin, defect in retinal progenitor cell development, layer formation	(Tucker et al., 2011) (Tucker et al., 2013)
RP	TRNT1	3D retinal organoids	RPE: abnormal morphology, lack of pigment foci, and reduced expression of RPE markers	(Guo et al., 2019)
RP	MFRP	hiPSC-RPE	Autophagy defect. Accumulation of LC3-II. Elevated level of oxidative stress.	(Sharma et al., 2017)
RP	MERTK	hiPSC-RPE	Disorganized actin, loss of RPE cellular morphology and apical microvilli.	(Li et al., 2014)
RP	PRPF31	3D retinal organoids and hiPSC-RPE	Phagocytosis defects.	(Ramsden et al., 2017)
RP	PRPF8	hiPSC-RPE	RPE: disrupted epithelium (polarity, TER) Phagocytosis and cilia defects	(Buskin et al., 2018)
RP	NRL	3D retinal organoids	PR: cilia defects, progressive degeneration and cellular stress	(Brydon et al., 2019)
RP	PDE6B	3D retinal organoids	RPE defects restored by AAV-PRPF31 gene augmentation	(Foltz et al., 2018)
Late onset RP			Near normal phenotype, no difference regarding phagocytosis	(Kallman et al., 2020)
			Retinal organoids with S-opsin dominant PR population	(Gao et al., 2020)
			At D230 modified expression of genes regulating cGMP hydrolysis leading to elevated cGMP levels in patient cells.	

molecular target whose activity or expression is directly associated to a disease pathogenesis. Compounds are then screened for their ability to bind and modulate the target. On the contrary, a phenotypic approach does not require prior understanding of the molecular mechanism of action but rather focuses on identifying compounds capable of reversing a phenotype thought to be representative of the disease. The contribution of phenotypic screening to the discovery of new first-in-class small molecule drugs approved by the US Food and Drug Administration (FDA) between 1999 and 2008 largely exceeded that of target-based approaches (Swinney and Anthony, 2011). A critical efficiency variable of this approach is the use of physiologically relevant cellular models that accurately capture the biological complexity of the disease state *in vitro* (Engle and Vincent, 2014). With the advent of iPSC technology, hiPSC-derived cellular models have gained great interest from the scientific community as an alternative platform for drug screening (Elitt et al., 2018).

The group of Masayo Takahashi first evaluated the potential of candidate drugs in hiPSC-derived PRs (Jin et al., 2011). As rod PRs from RP patients underwent degeneration *in vitro* similarly to what is observed *in vivo*, they assessed effects of antioxidant vitamins α -tocopherol, ascorbic acid, and β -carotene on this cellular model. Interestingly, α -tocopherol treatment significantly increased the number of rhodopsin-positive cells harboring *RP9* mutation, providing proof-of-principle for phenotypic-based drug screening in hiPSC-derived retinal cells (Kokkinaki et al., 2011; Jin et al., 2011). Similarly, Yoshida et al. screened for agents able to protect rods from the accelerated cell loss induced by the rhodopsin mutation (Yoshida et al., 2014). hiPSC-derived PRs were treated with molecules that could modify ER stress-related pathways. In such context, rhodopsin-related cell loss was suppressed, with a concomitant reduction of ER stress and apoptosis markers, after treatment with mTOR inhibition (rapamycin, PP242), AMP kinase activation (AICAR), apoptosis signal-regulating kinase 1 [ASK1] inhibition (NQDI-1), or suppression of protein synthesis (salubrinal) (Yoshida et al., 2014). A proof-of-principle example of a target-based screening approach was also shown in hiPSC-RPE cells from a RP patient with a *MERTK* nonsense mutation (Ramsden et al., 2017). Two translational read-through inducing drugs, G418 and PTC124 demonstrated their ability to restore *MERTK* gene expression and full-length protein level. In addition, PTC124 functionally rescued 12% of the phagocytic function of RP hiPSC-RPE cells (Ramsden et al., 2017).

hiPSC-based models of AMD were also successful in identifying disease-modulating compounds. Following the differentiation of AMD hiPSC into RPE cells, Chang et al. found that these cells displayed an abnormal accumulation of ROS. Therefore, to attenuate oxidative damage, they screened compounds to find an effective scavenger of ROS (Chang et al., 2014). Among several dietary supplements for retinal protection and natural antioxidant compounds, the team demonstrated that curcumin effectively protected AMD hiPSC-RPE cells from H_2O_2 -induced cell death through upregulation of several oxidative stress regulatory proteins and significant reduction of ROS production (Chang et al., 2014). More recently, the group of Sally Temple used a panel of AMD biomarkers combined with transcriptome analysis to demonstrate that nicotinamide treatment improved AMD-related phenotypes. They suggested that this effect was mediated by the inhibition of the production of drusen proteins and VEGF, as well as by decreasing inflammatory and complement factors (Saini et al., 2017). Recent machine learning approaches were developed to predict RPE cell functionality (transepithelial resistance, polarized VEGF secretion) (Schaub et al., 2020). Broaden use of deep neural networks applied to drug screening would be a potent alternative to identify new compounds.

Bruch's membrane (BM), the extracellular matrix in which RPE cells are attached plays a critical function in AMD progression. Therefore, several strategies were developed to reproduce the interaction between BM and RPE cells (Murphy et al., 2020). In particular, non-enzymatic nitration of the extracellular matrix mimics the damages accumulated

in aged BM (Fields et al., 2017). BM is constantly attacked by matrix metalloproteinase and renewed by RPE and choroid (Fields et al., 2019). In a similar manner, an immortalized RPE cell line (ARPE-19) was used *in vitro* to produce a BM-like extracellular matrix (Fields et al., 2017). Alternatively, BM could be obtained from aged human cadavers (Cai et al., 2018). First examples of AMD modeling demonstrated that AMD-like extracellular matrix perturbed functions of normal hiPSC-RPE cells (increased VEGF release, complement activation) (Fields et al., 2017). Moreover, AMD hiPSC-RPE cells had reduced ability to attach and survive on nitrite modified extracellular matrix (Gong et al., 2020). While not yet implemented in drug screening, future studies should take into account RPE matrix modifications on disease modeling as BM could affect both normal and AMD RPE cells.

Although it is now possible to synthesize and test increasingly large compound libraries, theoretically increasing the probability of identifying novel lead compounds, > 85% of drug development programs across all indications fail to progress from phase I clinical trials to approval (Wong et al., 2019). This gap between lead compound identification and success in the clinic might be attributed, at least in part, to the fact that the vast majority of high-throughput screening strategies relies on assays carried out on two-dimensional (2D) cell culture models that do not adequately recapitulate human pathophysiology. Indeed, while 2D models are well suited to study cell intrinsic deficits, they ultimately fail to recapitulate the cellular microenvironment, in particular endogenous signaling and cell-cell as well as cell-extracellular matrix interactions, limiting the extent to which diseases can be modeled. To overcome these shortcomings, three-dimensional (3D) culture systems that more closely resemble the native tissue architecture are becoming part of the drug discovery toolbox. At the forefront of this effort is the generation of retinal organoids that, as discussed before, more faithfully recapitulate some aspects of the histoarchitecture and cellular composition of the developing human retina both spatially and temporally. Although highly informative, it is important to note that retinal organoids might not necessarily be suited for RPE screens as they contain rather low number of RPE cells.

While retinal organoids hold promising advantages over other culture systems, several critical technical limitations still exist. The first concern is that organoids contain immature cells corresponding to a fetal stage, where PRs develop a partially mature organization and neurons display an abnormal synaptic connectivity (Ahmad et al., 2019; Dorgau et al., 2019). The addition of an extracellular matrix might improve connectivity and responsiveness to light (Dorgau et al., 2019). Another concern is the cell death that occurs in organoid centers. Cells self-organize into 3D structures, develop a well-organized initial lamination and correct temporal production of the diverse cell types. However, cells localized in the center of the organoid will disorganize and undergo progressively cell death: this is particularly the case for retinal ganglion cells and inner cell layers (Capowski et al., 2019; Ahmad et al., 2019). Another hurdle to overcome is that existing retinal organoid protocols are not able to generate a specific area of the retina such as the fovea or the macula, which is obviously a limitation when addressing macular degenerative diseases. The last limitation is related to the absence of RPE adjacent to PR. Indeed the microenvironment provided by RPE cells (nutrients, matrix, debris phagocytosis...) might be important particularly for the long culture duration required for PRs as suggested recently (Achberger et al., 2019a; Akhtar et al., 2019). Thus, organoids with current protocols are only a step forward that improve existing 2D models.

Knowing these shortcomings, the use of retinal organoids for drug screening remains the object of intense research to overcome technical constraints. Indeed, incorporating 3D culture systems into miniaturized 384- or 1536-well formats in an automated and cost-effective screening setup is still in infancy (Langhans, 2018). Two of the biggest challenges are the visualization of 3D structures with automated imaging systems as well as the general lack of robust quantitative technologies to analyze organoids on a large scale (Langhans, 2018; Vergara et al., 2017).

To address this need, Vergara et al. developed a screening platform that enabled accurate quantification of fluorescent reporters in complex hiPSC-derived retinal organoids, allowing for quantitative analysis of dynamics of developmental processes and cellular physiological states (Vergara et al., 2017). Of importance, technologies and readout assays that have been developed and successfully implemented in low- to high-throughput strategies in other 3D systems, for example cancer-like spheroids, could be adapted to retinal organoids (Fang and Eglén, 2017; Aasen and Vergara, 2019).

Adding another level of complexity, recent studies have focused on increasing the physiological relevance of hPSC-derived retinal models by juxtaposing a polarized RPE sheet to the retinal structure (Achberger et al., 2019a; Akhtar et al., 2019). Achberger et al. developed a microfluidic platform to create a complex multi-layer structure from hiPSCs that includes all cell types and layers present in retinal organoids in direct interplay with an RPE layer, recapitulating the complex *in vivo* anatomy of the human retina *in vitro* (Achberger et al., 2019a; Achberger et al., 2019b). Combining the two promising technologies, organoids and organ-on-a-chip, they provided a controllable vasculature-like perfusion to the 3D culture system and recapitulated the interaction of mature PR segments with RPE cells. This microfluidic retina-on-a-chip was validated for compound screening and toxicological studies by exposing the system to two molecules whose pathological side effects on the retina had been previously described, the anti-malaria drug chloroquine and the antibiotic gentamicin (Achberger et al., 2019a; Achberger et al., 2019b). While much work remains before complex retina-like 3D *in vitro* systems become standards for toxicity and drug screenings, the rapid development in recent years of organoids, biomaterials and microfluidic technologies are bringing this prospect closer to realization.

5. Human pluripotent stem cells for cell therapy

5.1. Strategies for tissue restoration

Depending on the retinal degenerative disease and its specific stage of progression, different cell types are lost. In AMD, RPE cells stop performing their support functions and degenerate, which then triggers PR death. While the primary cellular defect in RP patients is mostly localized in PRs, dysfunctional RPE cells are also reported in about 5% of cases. Cell therapy products for AMP and RP patients should be designed accordingly to replace or supplement the remaining RPE cells and/or PRs (Fig. 4). The other major aspect of tissue restoration is to determine precisely the injection site as the grafted material cannot cover the totality of the retina. Even if RP affects the peripheral retina first, the macula is ultimately damaged. Thus, in AMD and RP, the macula is the targeted site of implantation to maximize visual recovery as visual acuity mostly relies upon this area.

5.1.1. RPE cell therapy

RPE cells can either be delivered as a cell suspension or as an organized monolayer. The cell suspension formulation offers the advantage of a simplified logistic: cells are sent frozen to the hospital where they can be stored and thawed when desired. In addition, little manipulation is required before transplantation in the subretinal space and a simple syringe is used for eye injection. Delivery of hPSC-RPE cells as a cell suspension into the subretinal space of the RCS rat model slowed down PR degeneration and preserved visual functions (Ben M'Barek et al., 2017; Idelson et al., 2009; Carr et al., 2009; Lu et al., 2009; Lund et al., 2006). The first hPSC-RPE clinical trials based on this strategy targeted AMD and Stargardt's disease. The safety profiles were reassuring as no adverse event related to the use of hPSCs was observed (Schwartz et al., 2012; Schwartz et al., 2015). Moreover, preliminary signs of efficacy were reported in some patients for up to 4 years (Schwartz et al., 2016).

The second formulation approach is to deliver an already formed

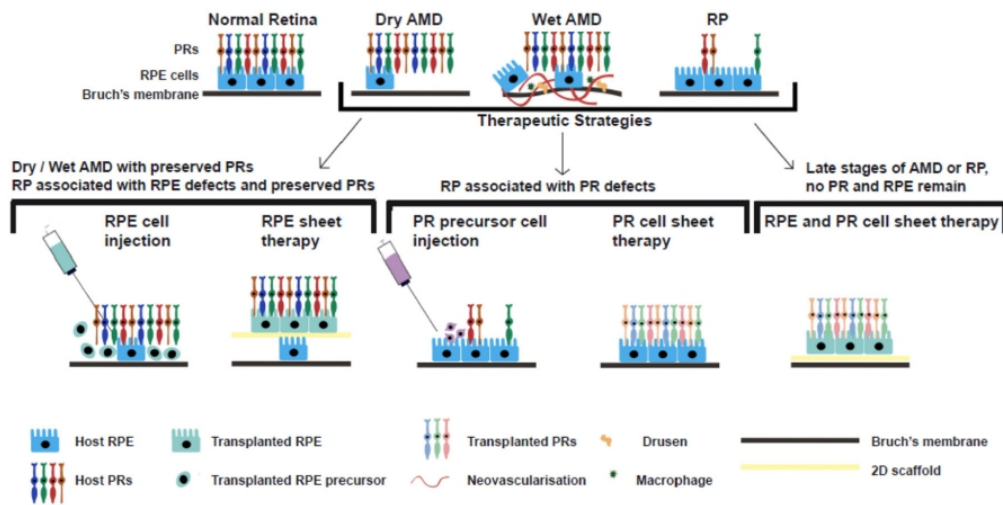


Fig. 4. Schematic representation of retinal degeneration in AMD/RP patients and associated cell therapy strategies. PR: photoreceptor; RPE: retinal pigment epithelium; AMD: Age-related Macular Degeneration; RP: Retinitis Pigmentosa.

hPSC-RPE epithelium. This strategy drastically complicates the transport, storage and subretinal delivery. Indeed, as a living monolayer of cells, the graft can only be kept for a limited period of time in a controlled environment (Hori et al., 2019; Ben M'Barek et al., 2020). A supporting scaffold made of polymers or of biological composition is usually needed *in vitro* during epithelial reformation of hPSC-RPE cells to ensure that cells can be removed from the culture dish (Ben M'Barek et al., 2018a; Ben M'Barek et al., 2018b; Diniz et al., 2013; Sharma et al., 2019; Kashani et al., 2018). For implantation, specific devices have to be developed in order to deliver the hPSC-RPE sheet into the subretinal space (Ben M'Barek et al., 2017; Ben M'Barek et al., 2020; Stanzel et al., 2014; da Cruz et al., 2018; Fernandes et al., 2017). The rationale leading to the development of this strategy is that RPE cells are functional only when organized as an epithelium with the secretion of cytokines (Sonoda et al., 2009). In addition, the diseased environment with oxidative stress and altered BM could limit *in vivo* epithelial reformation of hPSC-RPE cells grafted as a cell suspension. Indeed, hESC-RPE are more resistant to oxidative stress, which is present in AMD and RP, when organized as monolayers (Hsiung et al., 2015). Compared to cell suspension injections, the viability of hPSC-RPE cells grafted in the subretinal space of Nude rat was higher when delivered as a sheet (Diniz et al., 2013). Our group, as well as others, demonstrated that hPSC-RPE sheets improved the therapeutic visual outcomes of RCS rats compared to the same cells injected as a cell suspension (Ben M'Barek et al., 2017; Sharma et al., 2019). Preliminary results of three human clinical trials using a RPE sheet formulation to treat AMD were published recently (Kashani et al., 2018; da Cruz et al., 2018; Mandai et al., 2017a). The graft monolayer was cultured over polyester (da Cruz et al., 2018), parylene (Kashani et al., 2018) or without scaffold (Mandai et al., 2017a). None of these studies reported a serious adverse event related to the grafted hPSC-RPE cells. While these studies were not designed to evaluate efficacy, first data are encouraging. In particular, Prof. Coffey and collaborators treated two severe exudative AMD patients with a hESC-RPE sheet on a polyester scaffold (da Cruz et al., 2018). Such patients had lost dramatically their visual acuity due to retinal dysfunction (Uppal et al., 2007). If untreated, their retinas will degenerate and their vision permanently lost. Existing treatments consist of CNV removal and/or anti-VEGF medication that might improve the visual outcomes but the incidence of RPE rips is more frequent (17%) than without treatment (10%) (Gupta et al., 2017). These RPE rips expose BM and choroids and have a poor visual prognosis. The CNV

removal itself does not improve visual acuity but reduce the risk of severe visual loss (Bressler et al., 2004). In Coffey's study, the CNV might have been removed unintentionally (Jin et al., 2019) and the outcomes should be taken with caution (few treated patients, no control untreated eyes or anti-VEGF treated eyes for comparison). Nevertheless, one of the two patients improved enough his visual acuity that he was able to read again (da Cruz et al., 2018).

5.1.2. PR cell therapy

For successful cell replacement, PR precursors need to integrate into the pre-existing neuronal network of the host retina and mature into the formation of outer segments sensitive to light. Similarly, to RPE cells, they can either be delivered as a cell suspension or as an organized tissue.

5.1.2.1. Cell suspension injection. Pioneer studies provided evidence that stage-specific post-mitotic PR precursors from mice could integrate into the host outer nuclear layer (ONL - corresponding to the layer of PR nuclei), differentiate to acquire the morphological characteristics of mature PRs and improve moderately the vision in murine models of retinal degeneration (Mac Laren et al., 2006; Pearson et al., 2012; Barber et al., 2013; Bartsch et al., 2008). Altogether, these data led researchers to the conclusion that migration and integration of donor PR cells was the underlying mechanism of some visual function recovery.

Five independent back-to-back studies published starting from late 2016 called for a re-evaluation of this paradigm (Pearson et al., 2016; Santos-Ferreira et al., 2016; Singh et al., 2016; Decembrini et al., 2017; Ortin-Martinez et al., 2017). Indeed, the vast majority of transplanted PR precursors did not integrate into the host retina but rather remained in the subretinal space where they exchanged cytoplasmic material with host PRs. Following GFP positive cell grafting into the subretinal space of mice ubiquitously expressing a red fluorescent protein, cells coexpressing both reporters were found in the ONL, which indicates exchange of material (Pearson et al., 2016; Santos-Ferreira et al., 2016; Singh et al., 2016). In complementary experiments, Nr1-GFP mice were injected with the thymidine analogue EdU during development to independently label the nucleus and cytoplasm (Santos-Ferreira et al., 2016; Ortin-Martinez et al., 2017). While the majority of GFP+ donor cells in the subretinal space was EdU+, no EdU labelling was observed in GFP+ cells located in the host ONL. Thus, donor and host cells only

exchanged their cytoplasmic content, not their nuclei. Gender-mismatched transplants confirmed this observation as the nuclei of GFP+ cells in the host ONL contained only the X- or Y-chromosome present in the host (Pearson et al., 2016; Santos-Ferreira et al., 2016; Singh et al., 2016). No polynucleated cells were observed. Such result suggests that GFP protein and/or mRNA was transmitted between donor/recipient cells. In light of these recent findings, we should reevaluate previous reports that had concluded that donor cells could integrate in the host ONL where they expressed donor proteins that were otherwise missing in the endogenous PRs of the recipient (such as rod α -Transducin, Peripherin-2 and Rhodopsin) (Pearson et al., 2012; Barber et al., 2013; Gonzalez-Cordero et al., 2013; Warre-Cornish et al., 2014). It can be inferred that these vision-related proteins may in fact be transferred from donor to host PRs through material exchange.

The Cre/Lox system gave direct evidence for bidirectional exchange of intracellular material between donor and host cells (Pearson et al., 2016; Santos-Ferreira et al., 2016; Singh et al., 2016). Transplantation of donor PRs isolated from floxed reporter mice into PR-specific Cre mice showed expression of the reporter on transplanted cells in the subretinal space, revealing transfer of Cre-recombinase from host PRs to donor cells - and *vice versa*. Together these results demonstrate that while donor PR migration and integration do occur in rare events, the majority of transplanted cells engages in a process of material transfer through molecular mechanisms that remain to be determined. As a result, material transfer of functional proteins from murine donor cells to remaining host PRs after transplantation, rather than their structural integration, could explain partial recovery of visual function in retinal degeneration models. This material exchange appears to be specific between donor PR precursors/host PRs. Indeed, no exchange was observed when GFP proteins were injected directly in the subretinal space or when GFP retinal progenitor cells as well as fibroblasts were transplanted (Pearson et al., 2016). This transfer is also limited to the ONL. Only one report, not confirmed by other studies, suggests that other cell types might be involved, including bipolars and Mullers (Ortin-Martinez et al., 2017). The mechanisms involved in this material exchange are not elucidated but a vector is needed to mediate this intercellular communication. Several options are suggested including a fusion of donor/host plasma membranes or through the exchange of extracellular vesicles (like exosomes or microvesicles) (Singh et al., 2020). This last proposition is attractive as such vesicles allow the transfer of mRNA/miRNA/proteins/lipids from one cell type to another with specificity (van Niel et al., 2018).

It is important to note that all the above-mentioned studies were conducted with mouse donor cells. Recent transplantation experiments using human cells showed that material exchange was rather limited within the rodent eye as the vast majority of donor cells remained in the subretinal space and only few cells integrated into the host ONL (Gagliardi et al., 2018; Gonzalez-Cordero et al., 2017; Garita-Hernandez et al., 2019). Therefore, cell suspension transplantation into primates are required to evaluate the level of material transfer, the integration of human donor cells into the ONL and their capacity to form outer segments *in vivo*.

When reevaluating only studies where donor PRs were transplanted in completely degenerated rodent to avoid cytoplasmic exchanges, visual gain remains unclear. For example, Rd1 mice with a degenerated ONL and zero functionality were transplanted with a GFP photoreceptor cell suspension at 10–12 weeks in 2013 (Singh et al., 2013). The authors suggested an anatomical connection between donor rod and host bipolar cells (rod specific synaptic proteins, GFP labelling). This was correlated with pupil light responses. However, when reevaluating these results in light of material transfer, only separate analysis of cone and rod ERG responses could address each contribution to functionality. Indeed, in this model, cones could remain, even non-functional for a long time and it is not excluded that cones could be functionally rescued following rod transplantation and elicit a pupil light response (Singh et al., 2020). When grafted in degenerated Rd1

mice, hESC derived photoreceptors differentiated into cones and appeared to make connection with bipolar cells as evidenced by histology, but without evaluation of visual functions (Collin et al., 2019). Thus, in atrophic mice, donor PRs are able to make connection with host neurons but without a clear demonstration of visual functionality.

5.1.2.2. Retinal sheet transplantation. An alternative to the injection of PRs as a cell suspension is the transplantation of retinal sheets. This approach, based on the dissection of retinal organoids in small sections, was evaluated after transplantation in rodents, primates and cats (Singh et al., 2019; McLelland et al., 2018; Shirai et al., 2016). In such tissue, PRs are transplanted with other cell types (McLelland et al., 2018; Shirai et al., 2016; Iraha et al., 2018) that might limit the connection with second order neurons of the recipient retina. In addition, implanted retinal sheets tend to form rosettes *in vivo* with outer segments inside, leading to a separation with RPE cells (Singh et al., 2019; McLelland et al., 2018; Iraha et al., 2018).

Despite these limitations, synaptic connections with host retinas and some visual recovery were observed in rodent models of retinal degeneration, as evidenced by multi-electrode array recordings and assessment of visual behavior (McLelland et al., 2018; Iraha et al., 2018; Mandai et al., 2017b; Tu et al., 2019). Similar results were reported in primates (only one animal at 1.5 year post-surgery) by measuring visually-guided saccades (Tu et al., 2019). While the advantage of this strategy is to engraft an already formed and organized layer of PRs, additional work is needed to limit the presence of neurons other than PRs in the graft and to improve the product delivery into the eye in order to reduce rosette formation.

5.2. Future of retinal cell therapy

Both preclinical and clinical studies hint that the use of hPSC derivatives is a safe and viable therapeutic option for the treatment of retinal degenerative diseases. However, a number of important questions must be addressed before this strategy can be part of the arsenal of clinical tools, among which the challenge of transplant immune rejection, the development of more complex retinal grafts through tissue engineering and the potential combined use of optogenetic tools.

5.2.1. Graft rejection: immunological considerations

The success of cell replacement therapies does not rely solely on the quality and maturation of the grafted cell product but also on our understanding of the host immunological responses following transplantation. As ocular immune privilege provides the eye with immune protection, it was initially postulated that transplanted grafts into the eye would largely be protected from immune rejection. However, it is difficult to address the graft immunogenicity as hPSC derived retinal cells are usually grafted in a xenogeneic context and therefore under heavy immune suppression (Ben M'Barek et al., 2017; Gagliardi et al., 2018; Ben M'Barek et al., 2020; Shirai et al., 2016; Iraha et al., 2018; West et al., 2010; Barnea-Cramer et al., 2016; Zhu et al., 2017). In addition, the diseased ocular microenvironment is likely to increase the risk of immune rejection. For example, progressive loss of RPE cells as well as alteration of Bruch's membrane in AMD ultimately compromise the blood-retinal barrier, further degrading the immune privilege of the eye. Besides, the injection procedure itself could also favor transplant rejection by allowing immune cells to enter the retina. The result of this uncertainty is that the best immunosuppression strategy is still debated in ongoing and planned human clinical trials, with current strategies ranging from local to high systemic immunosuppression regimen (Schwartz et al., 2012; Kashani et al., 2018; da Cruz et al., 2018).

One way to evaluate the immune response in an allogeneic context is to transplant monkey iPS-RPE allografts into the non-immune-suppressed subretinal space of monkeys. In that context, retinal tissue damage was observed in major histocompatibility complex (MHC)-mismatched monkeys but not in MHC-matched animals (Sugita et al.,

2016a; Sugita et al., 2016b; McGill et al., 2018). *In vivo* imaging and histological analysis evidenced a strong inflammatory response to MHC-mismatched allografts in a highly localized and aggressive manner by 4 days post-transplantation, continued through 3 weeks, ultimately resulting in the rejection of iPSC-RPE grafts (Sugita et al., 2016b; McGill et al., 2018).

Autologous hPSC-derived cell products could overcome the rejection risk. However, such strategy is not achievable for wide-scale clinical practice. An alternative is to establish hPSC banks from “super-donors” homozygous for conserved human leucocyte antigen (HLA) haplotypes that are representative of a specific population to enable HLA matching and therefore minimize the risk of allograft rejection (Taylor et al., 2011). Current estimates predict that a bank of hiPSCs from 100 to 150 highly selected donors would meet the needs of 50–90% of the recipient population in the UK (Taylor et al., 2012; Gourraud et al., 2012). However, the cost of such banks remains high.

Another promising strategy is the engineering of allogenic hPSCs to be hypoimmunogenic to both adaptive and innate immune responses using CRISPR-Cas9 gene editing. In a recent approach, hypoimmunogenic hESCs were generated after deletion of the highly polymorphic MHC class I and class II molecules and expression of immunomodulatory factors PD-L1, HLA-G, and CD47 (Han et al., 2019). Accordingly, engineered vascular smooth muscle cells derived from these hESCs elicited significantly less T cell- and natural killer cell-mediated immune responses with minimal engulfment by macrophages (Han et al., 2019). CD47 overexpression and ablation of MHC class I and II were later found sufficient to generate hypoimmunogenic hiPSCs (Deuse et al., 2019). Cardiomyocytes, endothelial cells as well as smooth muscle cells derived from these cells reliably escaped immune rejection in MHC-mismatched allogenic recipients and survived long-term without the use of immunosuppression (Deuse et al., 2019). Thus, the generation of hypoimmunogenic hPSCs holds the promise of universal cell grafts from a unique cell bank.

5.2.2. Looking forward: scaffold-based tissue engineering

The final formulation of the cell therapy product has major impact on correct integration and polarization of the grafted material in the host cellular environment (Ben M'Barek and Monville, 2019). Attempts at delivering single cell suspensions of hPSC-derived PRs and RPE cells have led to poor integration rate and limited visual recovery compared to their transplantation as cell sheets (Ben M'Barek et al., 2017; Ben M'Barek et al., 2020; Pearson et al., 2016; Santos-Ferreira et al., 2016; Singh et al., 2016; Shirai et al., 2016; Iraha et al., 2018; Mandai et al., 2017b). Importantly, PRs transplanted as cell sheets from retinal organoids formed synaptic connections and developed polarized segments (Shirai et al., 2016; Iraha et al., 2018; Mandai et al., 2017b). However, the formation of rosettes was also observed, within which outer segments of PRs were separated from the support of endogenous RPE cells (Shirai et al., 2016; Iraha et al., 2018). Levering on the clinical success of RPE sheet transplants grown on biocompatible substrates, the addition of supportive scaffolds is currently explored to deliver PRs in a more physiologically structured way. This may improve implantation and facilitate proper apical-basal polarization of the graft (Thompson et al., 2019; Worthington et al., 2017; Jung et al., 2018). Of importance, Jung et al. recently developed a 3D biodegradable micro-structured scaffold designed to capture PRs in cup-shaped wells that support the correct orientation of axonal processes (Jung et al., 2018). While the long-term biocompatibility and integration of such system within the host retina remains to be investigated *in vivo*, this scaffold-based tissue engineering approach provides an innovative way forward for the development of more complex retinal grafts. In addition, the design of bio-engineering tissues composed of a combination of layers of organized RPE cells and PRs might be a suitable graft for advanced stage of AMD and RP where RPE cells are defective and PRs lost.

5.2.3. Combining stem cell therapy and optogenetics

Optogenetic uses light to control cells genetically modified to express an optogene encoding light-sensitive membrane proteins known as opsins (Garita-Hernandez et al., 2018). The overall strategy is to convert surviving retinal neurons into light-sensitive cells and thereby functionally turn them into artificial PRs able to convert light into electrical signal to restore vision (Klapper et al., 2016). Importantly, the use of optogenetics is a mutation-independent approach that can be used in a wide range of retinal degenerative conditions. Targeted electrical stimulation has been reported in dormant cone PRs lacking their light-sensitive outer segments (Garita-Hernandez et al., 2018; Busskamp et al., 2010; Khabou et al., 2018) as well as in downstream retinal neurons such as RGCs (Zhang et al., 2009; Tomita et al., 2010; Sengupta et al., 2016; Chaffiol et al., 2017) and bipolar cells (Doroudchi et al., 2011; Mace et al., 2015; Cehajic-Kapetanovic et al., 2015). These studies further hinted that the restored light information was transmitted to the visual cortex of formerly blind mice as they exhibited an improvement in visually guided behavioral responses. So far, two clinical trials based on this technology (targeting RGCs) are underway in patients affected with RP (clinicaltrials.gov identifiers: NCT03326336 and NCT02556736). However, rendering RGCs sensitive to light engender the loss of the sophisticated processing that occurs through the retina (from PRs to RGCs) while a small number of dormant cones remains. As significant progress is being made with the generation of more specific and improved opsins, the use of optogenetic tools could be broadened by combining stem cell therapy and optogenetics to counteract the difficulty to obtain functional PRs from hPSCs with light-sensitive outer segments (Gagliardi et al., 2019). This was achieved recently in mice suggesting that this strategy may be viable (Garita-Hernandez et al., 2019).

6. Conclusion

As highlighted in this review, hPSCs have become valuable tools to investigate the different stages of retinal degeneration and help tailor therapeutic strategies for the future. Before the complete loss of PRs, drug compounds identified through high throughput screening on RP/AMD hPSC models could be delivered to patients. When the degeneration is at an advanced stage, hPSCs differentiated into retinal cells could be transplanted into the eye to replace lost cells or to support remaining PRs through cytoplasmic exchanges. While significant roadblocks need to be addressed, the fast development of more physiologically relevant cellular models that accurately capture the biological complexity of the retina *in vitro* bring these expectations closer to reality. There is still a long way to go before first treatments reach patients but many phase 1/2 clinical trials have already started.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2020.103523>.

Funding statement

This work was supported by grants from the ANR [RebuildingRETINA: ANR-19-CE18-0004] and the Fondation pour la Recherche Médicale (Transplantation and cell therapy - PME201906008797) to KB. It was supported by NeurATRIS: A Translational Research Infrastructure for Biotherapies in Neurosciences (Investissements d'Avenir - ANR-11-INBS-0011) and INGESTEM: the National Infrastructure Engineering for Pluripotent and differentiated Stem cells (Investissements d'Avenir - ANR-11-INBS-000) to CM. I-Stem is part of the Biotherapies Institute for Rare Diseases supported by the Association Française contre les Myopathies-Téléthon.

Declaration of competing interest

CM and KB are inventors of a patent (FR3078712) related to

medical devices for the preparation of retinal tissues for regenerative medicine. LM, CM and KB are inventors of a pending patent related to the automated differentiation of hPSC into RPE cells.

References

- Aasen, D.M., Vergara, M.N., 2019. New drug discovery paradigms for retinal diseases: a focus on retinal organoids. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* <https://doi.org/10.1089/jop.2018.0140>.
- Achberger, K., Probst, C., Haderspeck, J., Bolz, S., Rogal, J., Chuchuy, J., Nikolova, M., Cora, V., Antkowiak, L., Haq, W., et al., 2019a. 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. <https://doi.org/10.7554/eLife.46188>.
- Achberger, K., Haderspeck, J.C., Kleger, A., Liebau, S., 2019b. Stem cell-based retina models. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 140, 33–50. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.05.005>.
- Age-Related Eye Disease Study Research G., 2001. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch. Ophthalmol.* 119, 1417–1436. <https://doi.org/10.1001/archoph.119.10.1417>.
- Ahmad, I., Teotia, P., Erickson, H., Xia, X., 2019. Recapitulating developmental mechanisms for retinal regeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* 100824. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2019.100824>.
- Akhtar, T., Xie, H., Khan, M.I., Zhao, H., Bao, J., Zhang, M., Xue, T., 2019. Accelerated photoreceptor differentiation of hiPSC-derived retinal organoids by contact co-culture with retinal pigment epithelium. *Stem Cell Res.* 39, 101491. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101491>.
- Al-Khersan, H., Hussain, R.M., Ciulla, T.A., Dugel, P.U., 2019. Innovative therapies for neovascular age-related macular degeneration. *Expert. Opin. Pharmacother.* 20, 1879–1891. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1636031>.
- Auffarth, G.U., Tetz, M.R., Krastel, H., Blankenagel, A., Volcker, H.E., 1997. Complicated cataracts in various forms of retinitis pigmentosa. Type and incidence. *Ophthalmologie* 94, 642–646. <https://doi.org/10.1007/s003470050175>.
- Barber, A.C., Hippert, C., Duran, Y., West, E.L., Bainbridge, J.W., Warre-Cornish, K., Luhmann, U.F., Lakowski, J., Sowden, J.C., Ali, R.R., et al., 2013. Repair of the degenerate retina by photoreceptor transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 354–359. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212677110>.
- Barnea-Cramer, A.O., Wang, W., Lu, S.J., Singh, M.S., Luo, C., Huo, H., McClements, M.E., Barnard, A.R., MacLaren, R.E., Lanza, R., 2016. Function of human pluripotent stem cell-derived photoreceptor progenitors in blind mice. *Sci. Rep.* 6, 29784. <https://doi.org/10.1038/srep29784>.
- Bartsch, U., Oriyakhel, W., Kenna, P.F., Linke, S., Richard, G., Petrowitz, B., Humphries, P., Farrar, G.J., Ader, M., 2008. 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. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2008.01.018>.
- Bayyoud, T., Bartz-Schmidt, K.U., Yoeurck, E., 2013. Long-term clinical results after cataract surgery with and without capsular tension ring in patients with retinitis pigmentosa: a retrospective study. *BMJ Open* 3. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-002616>.
- Ben M'Barek, K., Monville, C., 2019. Cell therapy for retinal dystrophies: from cell suspension formulation to complex retinal tissue bioengineering. *Stem Cells Int.* 2019, 4568979. <https://doi.org/10.1155/2019/4568979>.
- Ben M'Barek, K., Habeler, W., Plancheron, A., Jarraya, M., Regent, F., Terray, A., Yang, Y., Chatrouse, L., Domingues, S., Masson, Y., et al., 2017. Human ESC-derived retinal epithelial cell sheets potentiate rescue of photoreceptor cell loss in rats with retinal degeneration. *Sci. Transl. Med.* 9. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aai7471>.
- Ben M'Barek, K., Habeler, W., Monville, C., 2018a. Stem cell-based RPE therapy for retinal diseases: engineering 3D tissues amenable for regenerative medicine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1074, 625–632. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75402-4_76.
- Ben M'Barek, K., Habeler, W., Plancheron, A., Jarraya, M., Goureau, O., Monville, C., 2018b. Engineering transplantation-suitable retinal pigment epithelium tissue derived from human embryonic stem cells. *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/58216>.
- Ben M'Barek, K., Bertin, S., Brazhnikova, E., Jaillard, C., Habeler, W., Plancheron, A., Fovet, C.M., Demilly, J., Jarraya, M., Bejanariu, A., et al., 2020. Clinical-grade production and safe delivery of human ESC derived RPE sheets in primates and rodents. *Biomaterials* 230, 119603. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119603>.
- Bird, A.C., 1975. X-linked retinitis pigmentosa. *Br. J. Ophthalmol.* 59, 177–199. <https://doi.org/10.1136/bjo.59.4.177>.
- Bittrner, A.K., Diener-West, M., Dagnelie, G., 2009. A survey of photopsias in self-reported retinitis pigmentosa: location of photopsias is related to disease severity. *Retina* 29, 1513–1521. <https://doi.org/10.1097/AE.0b013e3181af0d57>.
- Bittrner, A.K., Haythornthwaite, J.A., Diener-West, M., Dagnelie, G., 2012. Photopsias are related in part to perceived stress and positive mood in retinitis pigmentosa. *Eye (Lond)* 26, 101–108. <https://doi.org/10.1038/eye.2011.247>.
- Borras, C., Canonica, J., Jorieu, S., Abache, T., El Sanharawi, M., Klein, C., Delaunay, K., Jonet, L., Salvodelli, M., Naud, M.C., et al., 2019. CFH exerts anti-oxidant effects on retinal pigment epithelial cells independently from protecting against membrane attack complex. *Sci. Rep.* 9, 13873. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50420-9>.
- Bressler, N.M., Bressler, S.B., Childs, A.L., Haller, J.A., Hawkins, B.S., Lewis, H., MacCumber, M.W., Marsh, M.J., Redford, M., Sternberg Jr., P., et al., 2004. Surgery for hemorrhagic choroidal neovascular lesions of age-related macular degeneration: ophthalmic findings: SST report no. 13. *Ophthalmology* 111, 1993–2006. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2004.07.023>.
- Breuer, D.K., Yashar, B.M., Filippova, E., Hiriyanna, S., Lyons, R.H., Mears, A.J., Asaye, B., Acar, C., Vervoort, R., Wright, A.F., et al., 2002. A comprehensive mutation analysis of RP2 and RPRG in a North American cohort of families with X-linked retinitis pigmentosa. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 1545–1554. <https://doi.org/10.1086/340848>.
- Brown CN, Green BD, Thompson RB, den Hollander AI, Lengyel I and Consortium E-R (2018) Metabolomics and age-related macular degeneration. *Metabolites* 9. <https://doi.org/10.3390/metabo910004>.
- Brydon, A.M., Bronstein, R., Buskin, A., Lako, M., Pierce, E.A., Fernandez-Godino, R., 2019. AAV-mediated gene augmentation therapy restores critical functions in mutant PRPF31(+/-) iPSC-derived RPE cells. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 15, 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.10.014>.
- Buchholz, D.E., Hikita, S.T., Rowland, T.J., Friedrich, A.M., Hinman, C.R., Johnson, L.V., Clegg, D.O., 2009. Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27, 2427–2434. <https://doi.org/10.1002/stem.189>.
- Buchholz, D.E., Pennington, B.O., Croze, R.H., Hinman, C.R., Coffey, P.J., Clegg, D.O., 2013. Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium. *Stem Cells Transl. Med.* 2, 384–393. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0163>.
- Buskin, A., Zhu, L., Chichagova, V., Basu, B., Mozaffari-Jovin, S., Dolan, D., Droop, A., Collin, J., Bronstein, R., Mehrotra, S., et al., 2018. Disrupted alternative splicing for genes implicated in splicing and ciliogenesis causes PRPF31 retinitis pigmentosa. *Nat. Commun.* 9, 4234. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06448-y>.
- Busskamp, V., Duebel, J., Balya, D., Fradot, M., Viney, T.J., Siegrist, S., Groner, A.C., Cabuy, E., Forster, V., Seeliger, M., et al., 2010. Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. *Science* 329, 413–417. <https://doi.org/10.1126/science.1190897>.
- Cai, H., Gong, J., Del Priore, L.V., Tezel, T.H., Fields, M.A., 2018. Culturing of retinal pigment epithelial cells on an ex vivo model of aged human Bruch's membrane. *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/57084>.
- Capowski, E.E., Samimi, K., Mayerl, S.J., Phillips, M.J., Pinilla, I., Howden, S.E., Saha, J., Jansen, A.D., Edwards, K.L., Jager, L.D., et al., 2019. Reproducibility and staging of 3D human retinal organoids across multiple pluripotent stem cell lines. *Development* 146. <https://doi.org/10.1242/dev.171686>.
- Carr, A.J., Vugler, A.A., Hikita, S.T., Lawrence, J.M., Gias, C., Chen, L.L., Buchholz, D.E., Ahmad, A., Semo, M., Smart, M.J., et al., 2009. Protective effects of human iPSC-derived retinal pigment epithelium cell transplantation in the retinal dystrophic rat. *PLoS One* 4 (e), 8152. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008152>.
- Cehajic-Kapetanovic, J., Eleftheriou, C., Allen, A.E., Milosavljevic, N., Pienaar, A., Bedford, R., Davis, K.E., Bishop, P.N., Lucas, R.J., 2015. Restoration of vision with ectopic expression of human rod opsin. *Curr. Biol.* 25, 2111–2122. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.029>.
- Chaffiol, A., Caplette, R., Jaillard, C., Brazhnikova, E., Desrosiers, M., Dubus, E., Duhamel, L., Mace, E., Marre, O., Benoit, P., et al., 2017. A new promoter allows optogenetic vision restoration with enhanced sensitivity in macaque retina. *Mol. Ther.* 25, 2546–2560. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.07.011>.
- Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., Studer, L., 2009. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* 27, 275–280. <https://doi.org/10.1038/nbt.1529>.
- Chang, Y.C., Chang, W.C., Hung, K.H., Yang, D.M., Cheng, Y.H., Liao, Y.W., Woung, L.C., Tsai, C.Y., Hsu, C.C., Lin, T.C., et al., 2014. The generation of induced pluripotent stem cells for macular degeneration as a drug screening platform: identification of curcumin as a protective agent for retinal pigment epithelial cells against oxidative stress. *Front. Aging Neurosci.* 6, 191. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00191>.
- Choudhary, P., Booth, H., Gutteridge, A., Surmacz, B., Louca, I., Steer, J., Kerby, J., Whiting, P.J., 2017. Directing differentiation of pluripotent stem cells toward retinal pigment epithelium lineage. *Stem Cells Transl. Med.* 6, 490–501. <https://doi.org/10.5966/sctm.2016-0088>.
- Colijn, J.M., Buitendijk, G.H.S., Prokofyeva, E., Alves, D., Cachulo, M.L., Khawaja, A.P., Coughnard-Gregoire, A., Merle, B.M.J., Korb, C., Erke, M.G., et al., 2017. Prevalence of age-related macular degeneration in Europe: the past and the future. *Ophthalmology* 124, 1753–1763. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.05.035>.
- Collin, J., Zerti, D., Queen, R., Santos-Ferreira, T., Bauer, R., Coxhead, J., Hussain, R., Steel, D., Mellough, C., Ader, M., et al., 2019. CRX expression in pluripotent stem cell-derived photoreceptors marks a transplantable subpopulation of early cones. *Stem Cells* 37, 609–622. <https://doi.org/10.1002/stem.2974>.
- Crombie, D.E., Daniszewski, M., Liang, H.H., Kulkarni, T., Li, F., Lidgerwood, G.E., Conquest, A., Hernandez, D., Hung, S.S., Gill, K.P., et al., 2017. Development of a modular automated system for maintenance and differentiation of adherent human pluripotent stem cells. *SLAS Discov* 22, 1016–1025. <https://doi.org/10.1177/2472555217696797>.
- da Cruz, L., Fynes, K., Georgiadis, O., Kerby, J., Luo, Y.H., Ahmado, A., Vernon, A., Daniels, J.T., Nommist, B., Hasan, S.M., et al., 2018. Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration. *Nat. Biotechnol.* 36, 328–337. <https://doi.org/10.1038/nbt.4114>.
- D'Cruz, P.M., Yasumura, D., Weir, J., Matthes, M.T., Abderrahim, H., LaVail, M.M., Vollrath, D., 2000. Mutation of the receptor tyrosine kinase gene Merk in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum. Mol. Genet.* 9, 645–651. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.4.645>.
- Decembrini, S., Martin, C., Sennlaub, F., Chemtob, S., Biel, M., Samardzija, M., Moulin, A., Behar-Cohen, F., Arsenijevic, Y., 2017. Cone genesis tracing by the Chrn4-EGFP mouse line: evidences of cellular material fusion after cone precursor transplantation. *Mol. Ther.* 25, 634–653. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.12.015>.
- Deng, W.L., Gao, M.L., Lei, X.L., Lv, J.N., Zhao, H., He, K.W., Xia, X.X., Li, L.Y., Chen, Y.C., Li, Y.P., et al., 2018. Gene correction reverses ciliopathy and photoreceptor loss in iPSC-derived retinal organoids from retinitis pigmentosa patients. *Stem Cell Reports*

- 10, 1267–1281. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.02.003>.
- Deuse, T., Hu, X., Gravina, A., Wang, D., Tediashvili, G., De, C., Thayer, W.O., Wahl, A., Garcia, J.V., Reichenspurner, H., et al., 2019. Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients. *Nat. Biotechnol.* 37, 252–258. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0016-3>.
- Diniz, B., Thomas, P., Thomas, B., Ribeiro, R., Hu, Y., Brant, R., Ahuja, A., Zhu, D., Liu, L., Koss, M., et al., 2013. 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. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-11239>.
- Dorgau, B., Felemban, M., Hilgen, G., Kiening, M., Zerti, D., Hunt, N.C., Doherty, M., Whitfield, P., Hallam, D., White, K., et al., 2019. Decellularised extracellular matrix-derived peptides from neural retina and retinal pigment epithelium enhance the expression of synaptic markers and light responsiveness of human pluripotent stem cell derived retinal organoids. *Biomaterials* 199, 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.01.028>.
- Doroudchi, M.M., Greenberg, K.P., Liu, J., Silka, K.A., Boyden, E.S., Lockridge, J.A., Arman, A.C., Janani, R., Boye, S.E., Boye, S.L., et al., 2011. Virally delivered channelrhodopsin-2 safely and effectively restores visual function in multiple mouse models of blindness. *Mol. Ther.* 19, 1220–1229. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.69>.
- Eberle, D., Schubert, S., Postel, K., Corbeil, D., Ader, M., 2011. Increased integration of transplanted CD73-positive photoreceptor precursors into adult mouse retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 6462–6471. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7399>.
- Ellitt, M.S., Barbar, L., Tesar, P.J., 2018. Drug screening for human genetic diseases using iPSC models. *Hum. Mol. Genet.* 27, R89–R98. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy186>.
- Engle, S.J., Vincent, F., 2014. Small molecule screening in human induced pluripotent stem cell-derived terminal cell types. *J. Biol. Chem.* 289, 4562–4570. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.529156>.
- Fang, Y., Eglén, R.M., 2017. Three-dimensional cell cultures in drug discovery and development. *SLAS Discov* 22, 456–472. <https://doi.org/10.1177/1087057117696795>.
- Feng, W., Yasumura, D., Matthes, M.T., LaVail, M.M., Vollrath, D., 2002. Merck triggers uptake of photoreceptor outer segments during phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 277, 17016–17022. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107876200>.
- Ferguson, L.R., Balaiya, S., Mynampati, B.K., Sambhav, K., Chalam, K.V., 2015. Deprivation of bFGF promotes spontaneous differentiation of human embryonic stem cells into retinal pigment epithelial cells. *J. Stem Cells* 10, 159–170.
- Fernandes, R.A.B., Stefanini, F.R., Falabella, P., Koss, M.J., Wells, T., Diniz, B., Ribeiro, R., Schor, P., Maia, M., Penha, F.M., et al., 2017. Development of a new tissue injector for subretinal transplantation of human embryonic stem cell derived retinal pigmented epithelium. *Int J Retina Vitreous* 3, 41. <https://doi.org/10.1186/s40942-017-0095-6>.
- Fields, M.A., Bowrey, H.E., Gong, J., Moreira, E.F., Cai, H., Del Priore, L.V., 2017. Extracellular matrix nitration alters growth factor release and activates bioactive complement in human retinal pigment epithelial cells. *PLoS One* 12, e0177763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177763>.
- Fields, M.A., Del Priore, L.V., Adelman, R.A., Rizzolo, L.J., 2019. Interactions of the choroid, Bruch's membrane, retinal pigment epithelium, and neurosensory retina collaborate to form the outer blood-retinal barrier. *Prog. Retin. Eye Res.* 100803. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2019.100803>.
- Flaxman, S.R., Bourne, R.R.A., Resnikoff, S., Ackland, P., Braithwaite, T., Cicinelli, M.V., Das, A., Jonas, J.B., Keeffe, J., Kempner, J.H., et al., 2017. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Health* 5, e1221–e1234. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30393-5](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30393-5).
- Foltz, L.P., Howden, S.E., Thomson, J.A., Clegg, D.O., 2018. Functional assessment of patient-derived retinal pigment epithelial cells edited by CRISPR/Cas 9. *Int J Mol Sci* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19124127>.
- Fritsche, L.G., Igl, W., Bailey, J.N., Grassmann, F., Sengupta, S., Bragg-Gresham, J.L., Burdon, K.P., Hebbing, S.J., Wen, C., Gorski, M., et al., 2016. A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nat. Genet.* 48, 134–143. <https://doi.org/10.1038/ng.3448>.
- Fuhrmann, S., 2008. Wnt signaling in eye organogenesis. *Organogenesis* 4, 60–67. <https://doi.org/10.4161/org.4.2.5850>.
- Fuhrmann, S., 2010. Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle. *Curr. Top. Dev. Biol.* 93, 61–84. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385044-7.00003-5>.
- Gagliardi, G., Ben M'Barek, K., Chaffiol, A., Slembrouck-Brec, A., Conart, J.B., Nanteau, C., Rabesandratana, O., Sahel, J.A., Duebel, J., Orioux, G., et al., 2018. Characterization and transplantation of CD73-positive photoreceptors isolated from human iPSC-derived retinal organoids. *Stem Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.07.005>.
- Gagliardi, G., Ben M'Barek, K., Goureau, O., 2019. Photoreceptor cell replacement in macular degeneration and retinitis pigmentosa: a pluripotent stem cell-based approach. *Prog. Retin. Eye Res.* <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2019.03.001>.
- Gal, A., Li, Y., Thompson, D.A., Weir, J., Orth, U., Jacobson, S.G., Apfelstedt-Sylla, E., Vollrath, D., 2000. Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 26, 270–271. <https://doi.org/10.1038/81555>.
- Gao, M.L., Lei, X.L., Han, F., He, K.W., Jin, S.Q., Zhang, Y.Y., Jin, Z.B., 2020. Patient-specific retinal organoids recapitulate disease features of late-onset retinitis pigmentosa. *Front Cell Dev Biol* 8, 128. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00128>.
- Garita-Hernandez, M., Guibbal, L., Toualbi, L., Routet, F., Chaffiol, A., Winckler, C., Haringuet, M., Robert, C., Fouquet, S., Bellow, S., et al., 2018. Optogenetic light sensors in human retinal organoids. *Front. Neurosci.* 12, 789. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00789>.
- Garita-Hernandez, M., Lampic, M., Chaffiol, A., Guibbal, L., Routet, F., Santos-Ferreira, T., Gasparini, S., Borsch, O., Gagliardi, G., Reichman, S., et al., 2019. Restoration of visual function by transplantation of optogenetically engineered photoreceptors. *Nat. Commun.* 10, 4524. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12330-2>.
- Golestaneh, N., Chu, Y., Cheng, S.K., Cao, H., Poliakov, E., Berinstein, D.M., 2016. Repressed SIRT1/PGC- α pathway and mitochondrial disintegration in iPSC-derived RPE disease model of age-related macular degeneration. *J. Transl. Med.* 14, 344. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1101-8>.
- Gong, J., Cai, H., Team NGSCA, Noggle, S., Paull, D., Rizzolo, L.J., Del Priore, L.V., Fields, M.A., 2020. Stem cell-derived retinal pigment epithelium from patients with age-related macular degeneration exhibit reduced metabolism and matrix interactions. *Stem Cells Transl. Med.* 9, 364–376. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0321>.
- Gonzalez-Cordero, A., West, E.L., Pearson, R.A., Duran, Y., Carvalho, L.S., Chu, C.J., Naeem, A., Blackford, S.J.I., Georgiadis, A., Lakowski, J., et al., 2013. Photoreceptor precursors derived from three-dimensional embryonic stem cell cultures integrate and mature within adult degenerate retina. *Nat. Biotechnol.* 31, 741–747. <https://doi.org/10.1038/nbt.2643>.
- Gonzalez-Cordero, A., Kruzec, K., Naeem, A., Fernando, M., Kloc, M., Ribeiro, J., Goh, D., Duran, Y., Blackford, S.J.I., Abelleira-Hervas, L., et al., 2017. Recapitulation of human retinal development from human pluripotent stem cells generates transplantable populations of cone photoreceptors. *Stem Cell Reports* 9, 820–837. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.07.022>.
- Gourraud, P.A., Gilson, L., Girard, M., Peschanski, M., 2012. The role of human leukocyte antigen matching in the development of multiethnic “haplobank” of induced pluripotent stem cell lines. *Stem Cells* 30, 180–186. <https://doi.org/10.1002/stem.772>.
- Guo, Y., Wang, P., Ma, J.H., Cui, Z., Yu, Q., Liu, S., Xue, Y., Zhu, D., Cao, J., Li, Z., et al., 2019. Modeling retinitis pigmentosa: retinal organoids generated from the iPSCs of a patient with the USH2A mutation show early developmental abnormalities. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 361. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00361>.
- Gupta, A., Chhabra, M., Mehta, P., Ghosh, B., 2017. Tears of the retinal pigment epithelium – a review. *Delhi Journal of Ophthalmology* 27, 243–249. <https://doi.org/10.7869/djo.258>.
- Hallam, D., Collin, J., Bojic, S., Chichagova, V., Buskin, A., Xu, Y., Lafage, L., Otten, E.G., Anyfantis, G., Mellough, C., et al., 2017. An induced pluripotent stem cell patient specific model of complement factor H (Y402H) polymorphism displays characteristic features of age-related macular degeneration and indicates a beneficial role for UV light exposure. *Stem Cells* 35, 2305–2320. <https://doi.org/10.1002/stem.2708>.
- Han, X., Wang, M., Duan, S., Franco, P.J., Kenty, J.H., Hedrick, P., Xia, Y., Allen, A., Ferreira, L.M.R., Strominger, J.L., et al., 2019. Generation of hypoimmunogenic human pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 10441–10446. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902566116>.
- Handa, J.T., Bowes Rickman, C., Dick, A.D., Gorin, M.B., Miller, J.W., Toth, C.A., Ueffing, M., Zarbin, M., Farrer, L.A., 2019. A systems biology approach towards understanding and treating non-neovascular age-related macular degeneration. *Nat. Commun.* 10, 3347. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11262-1>.
- Hardcastle, A.J., Thiselton, D.L., Van Maldergem, L., Saha, B.K., Jay, M., Plant, C., Taylor, R., Bird, A.C., Bhattacharya, S., 1999. Mutations in the RPE gene cause disease in 10% of families with familial X-linked retinitis pigmentosa assessed in this study. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 1210–1215. <https://doi.org/10.1086/302325>.
- Hartong, D.T., Jorritsma, F.F., Neve, J.J., Melis-Dankers, B.J., Kooijman, A.C., 2004. Improved mobility and independence of night-blind people using night-vision goggles. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 1725–1731. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-1061>.
- Hartong, D.T., Berson, E.L., Dryja, T.P., 2006. Retinitis pigmentosa. *Lancet* 368, 1795–1809. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69740-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69740-7).
- Hirami, Y., Osakada, F., Takahashi, K., Okita, K., Yamanaka, S., Ikeda, H., Yoshimura, N., Takahashi, M., 2009. Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neurosci. Lett.* 458, 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.04.035>.
- Hori, K., Kuwabara, J., Tanaka, Y., Nishida, M., Koide, N., Takahashi, M., 2019. A simple and static preservation system for shipping retinal pigment epithelium cell sheets. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 13, 459–468. <https://doi.org/10.1002/term.2805>.
- Hsiung, J., Zhu, D., Hinton, D.R., 2015. Polarized human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelial cell monolayers have higher resistance to oxidative stress-induced cell death than nonpolarized cultures. *Stem Cells Transl. Med.* 4, 10–20. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0205>.
- Hussain, A.A., Lee, Y., Marshall, J., 2019. Understanding the complexity of the matrix metalloproteinase system and its relevance to age-related diseases: age-related macular degeneration and Alzheimer's disease. *Prog Retin Eye Res.* 100775. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2019.100775>.
- Idelson, M., Alper, R., Obolensky, A., Ben-Shushan, E., Hemo, I., Yachimovich-Cohen, N., Khaner, H., Smith, Y., Wisner, O., Gropp, M., et al., 2009. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells. *Cell Stem Cell* 5, 396–408. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.07.002>.
- Ifitkhar, M., Lemus, M., Usmani, B., Campochiaro, P.A., Sahel, J.A., Scholl, H.P.N., Shah, S.M.A., 2019. Classification of disease severity in retinitis pigmentosa. *Br. J. Ophthalmol.* 103, 1595–1599. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2018-313669>.
- Ikeda, Y., Nakatake, S., Funatsu, J., Fujiwara, K., Tachibana, T., Murakami, Y., Hisatomi, T., Yoshida, S., Enaida, H., Ishibashi, T., et al., 2019. Night-vision aid using see-through display for patients with retinitis pigmentosa. *Jpn. J. Ophthalmol.* 63, 181–185. <https://doi.org/10.1007/s10384-018-00644-5>.
- Iraha, S., Tu, H.Y., Yamasaki, S., Kagawa, T., Goto, M., Takahashi, R., Watanabe, T., Sugita, S., Yonemura, S., Sunagawa, G.A., et al., 2018. Establishment of immunodeficient retinal degeneration model mice and functional maturation of human ESC-derived retinal sheets after transplantation. *Stem Cell Reports* 10, 1059–1074.




- <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.01.032>.
- Jin, Z.B., Okamoto, S., Osakada, F., Homma, K., Assawachananont, J., Hirami, Y., Iwata, T., Takahashi, M., 2011. Modeling retinal degeneration using patient-specific induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 6, e17084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017084>.
- Jin, Z.B., Okamoto, S., Xiang, P., Takahashi, M., 2012. Integration-free induced pluripotent stem cells derived from retinitis pigmentosa patient for disease modeling. *Stem Cells Transl. Med.* 1, 503–509. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0005>.
- Jin, Z.B., Gao, M.L., Deng, W.L., Wu, K.C., Sugita, S., Mandai, M., Takahashi, M., 2019. Stemming retinal regeneration with pluripotent stem cells. *Prog. Retin. Eye Res.* 69, 38–56. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.11.003>.
- Jung, Y.H., Phillips, M.J., Lee, J., Xie, R., Ludwig, A.L., Chen, G., Zheng, Q., Kim, T.J., Zhang, H., Barney, P., et al., 2018. 3D microstructured scaffolds to support photoreceptor polarization and maturation. *Adv. Mater.* 30, e1803550. <https://doi.org/10.1002/adma.201803550>.
- Kallman, A., Capowski, E.E., Wang, J., Kaushik, A.M., Jansen, A.D., Edwards, K.L., Chen, L., Berlinck, C.A., Joseph Phillips, M., Pierce, E.A., et al., 2020. Investigating cone photoreceptor development using patient-derived NRL null retinal organoids. *Commun Biol* 3, 82. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0808-5>.
- Kashani, A.H., Lebkowski, J.S., Rahhal, F.M., Avery, R.L., Salehi-Had, H., Dang, W., Lin, C.M., Mitra, D., Zhu, D., Thomas, B.B., et al., 2018. A bioengineered retinal pigment epithelial monolayer for advanced, dry age-related macular degeneration. *Sci Transl Med* 10. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aao4097>.
- Kauppinen, A., Paterno, J.J., Blasiak, J., Salminen, A., Kaarniranta, K., 2016. Inflammation and its role in age-related macular degeneration. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 1765–1786. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2147-8>.
- Khabou, H., Garita-Hernandez, M., Chaffiol, A., Reichman, S., Jaillard, C., Brazhnikova, E., Bertin, S., Forster, V., Desrosiers, M., Winkler, C., et al., 2018. Noninvasive gene delivery to foveal cones for vision restoration. *JCI Insight* 3. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.96029>.
- Klapper, S.D., Swiersy, A., Bamberg, E., Busskamp, V., 2016. Biophysical properties of optogenetic tools and their application for vision restoration approaches. *Front. Syst. Neurosci.* 10, 74. <https://doi.org/10.3389/fnys.2016.00074>.
- Klimanskaya, I., Hipp, J., Rezaei, K.A., West, M., Atala, A., Lanza, R., 2004. Derivation and comparative assessment of retinal pigment epithelium from human embryonic stem cells using transcriptomics. *Cloning Stem Cells* 6, 217–245. <https://doi.org/10.1089/clo.2004.6.217>.
- Koh, H.K., 2010. A 2020 vision for healthy people. *N. Engl. J. Med.* 362, 1653–1656. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1001601>.
- Kokkinaki, M., Sahibzada, N., Golestaneh, N., 2011. 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. <https://doi.org/10.1002/stem.635>.
- Lakowski, J., Welby, E., Budinger, D., Di Marco, F., Di Foggia, V., Bainbridge, J.W.B., Wallace, K., Gamm, D.M., Ali, R.R., Sowden, J.C., 2018. 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. <https://doi.org/10.1002/stem.2775>.
- Lamba, D.A., Karl, M.O., Ware, C.B., Reh, T.A., 2006. Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12769–12774. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601990103>.
- Langhans, S.A., 2018. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Front. Pharmacol.* 9, 6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00006>.
- Leach, L.L., Clegg, D.O., 2015. Concise review: making stem cells retinal: methods for deriving retinal pigment epithelium and implications for patients with ocular disease. *Stem Cells* 33, 2363–2373. <https://doi.org/10.1002/stem.2010>.
- Leach, L.L., Buchholz, D.E., Nadar, V.P., Lowenstein, S.E., Clegg, D.O., 2015. Canonical/beta-catenin Wnt pathway activation improves retinal pigment epithelium derivation from human embryonic stem cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 1002–1013. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-15835>.
- Li, Y., Wu, W.H., Hsu, C.W., Nguyen, H.V., Tsai, Y.T., Chan, L., Nagasaki, T., Maumenee, I.H., Yannuzzi, L.A., Hoang, Q.V., et al., 2014. 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. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.100>.
- Lionch, S., Carido, M., Ader, M., 2018. Organoid technology for retinal repair. *Dev. Biol.* 433, 132–143. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.09.028>.
- Lu, B., Malcuit, C., Wang, S., Girman, S., Francis, P., Lemieux, L., Lanza, R., Lund, R., 2009. Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells* 27, 2126–2135. <https://doi.org/10.1002/stem.149>.
- Lukovic, D., Artero Castro, A., Delgado, A.B., Bernal Mde, L., Luna Pelaez, N., Diez Lloret, A., Perez Espejo, R., Kamenarova, K., Fernandez Sanchez, L., Cuenca, N., et al., 2015. Human iPSC derived disease model of MERTK-associated retinitis pigmentosa. *Sci. Rep.* 5, 12910. <https://doi.org/10.1038/srep12910>.
- Lund, R.D., Wang, S., Klimanskaya, I., Holmes, T., Ramos-Kelsey, R., Lu, B., Girman, S., Bischoff, N., Sauve, Y., Lanza, R., 2006. Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic RCS rats. *Cloning Stem Cells* 8, 189–199. <https://doi.org/10.1089/clo.2006.8.189>.
- Mac Laren, R.E., Pearson, R.A., Mac Neil, A., Douglas, R.H., Salt, T.E., Akimoto, M., Swaroop, A., Sowden, J.C., Ali, R.R., 2006. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature* 444, 203–207. <https://doi.org/10.1038/nature05161>.
- Mace, E., Caplette, R., Marre, O., Sengupta, A., Chaffiol, A., Barbe, P., Desrosiers, M., Bamberg, E., Sahel, J.A., Picaud, S., et al., 2015. Targeting channelrhodopsin-2 to ON-bipolar cells with vitreally administered AAV restores ON and OFF visual responses in blind mice. *Mol. Ther.* 23, 7–16. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.154>.
- Maguire, A.M., Russell, S., Wellman, J.A., Chung, D.C., Yu, Z.F., Tillman, A., Wittes, J., Pappas, J., Elci, O., Marshall, K.A., et al., 2019. Efficacy, safety, and durability of voretigene neparovvec-rzyl in RPE65 mutation-associated inherited retinal dystrophy: results of phase 1 and 3 trials. *Ophthalmology* 126, 1273–1285. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2019.06.017>.
- Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hirami, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fujihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., et al., 2017a. Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 376, 1038–1046. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1608368>.
- Mandai, M., Fujii, M., Hashiguchi, T., Sunagawa, G.A., Ito, S.I., Sun, J., Kaneko, J., Sho, J., Yamada, C., Takahashi, M., 2017b. iPSC-derived retina transplants improve vision in rd1 end-stage retinal-degeneration mice. *Stem Cell Reports* 8, 69–83. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.12.008>.
- Matsumoto, E., Koide, N., Hanzawa, H., Kiyama, M., Ohta, M., Kuwabara, J., Takeda, S., Takahashi, M., 2019. Fabricating retinal pigment epithelial cell sheets derived from human induced pluripotent stem cells in an automated closed culture system for regenerative medicine. *PLoS One* 14, e0212369. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212369>.
- McGill, T.J., Stoddard, J., Renner, L.M., Messaoudi, I., Bharti, K., Mitalipov, S., Lauer, A., Wilson, D.J., Neuringer, M., 2018. Allogeneic iPSC-derived cell graft failure following transplantation into the subretinal space in nonhuman primates. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 59, 1374–1383. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-22467>.
- McLelland, B.T., Lin, B., Mathur, A., Aramant, R.B., Thomas, B.B., Nistor, G., Keirstead, H.S., Seiler, M.J., 2018. Transplanted hESC-derived retina organoid sheets differentiate, integrate, and improve visual function in retinal degenerate rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 59, 2586–2603. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-23646>.
- Megaw, R., Abu-Arafah, H., Jungnickel, M., Mellough, C., Gurniak, C., Witke, W., Zhang, W., Khanna, H., Mill, P., Dhillon, B., et al., 2017. Gelsolin dysfunction causes photoreceptor loss in induced pluripotent cell and animal retinitis pigmentosa models. *Nat. Commun.* 8, 271. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00111-8>.
- Meyer, J.S., Shearer, R.L., Capowski, E.E., Wright, L.S., Wallace, K.A., McMillan, E.L., Zhang, S.C., Gamm, D.M., 2009. Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 16698–16703. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905245106>.
- Meyer, J.S., Howden, S.E., Wallace, K.A., Verhoeven, A.D., Wright, L.S., Capowski, E.E., Pinilla, I., Martin, J.M., Tian, S., Stewart, R., et al., 2011. Optic vesicle-like structures derived from human pluripotent stem cells facilitate a customized approach to retinal disease treatment. *Stem Cells* 29, 1206–1218. <https://doi.org/10.1002/stem.674>.
- Mitchell, P., Wang, J.J., Smith, W., Leeder, S.R., 2002. Smoking and the 5-year incidence of age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. *Arch. Ophthalmol.* 120, 1357–1363. <https://doi.org/10.1001/archophth.120.10.1357>.
- Mitchell, P., Liew, G., Gopinath, B., Wong, T.Y., 2018. Age-related macular degeneration. *Lancet* 392, 1147–1159. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31550-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31550-2).
- Morrison, M.A., Magalhaes, T.R., Ramke, J., Smith, S.E., Ennis, S., Simpson, C.L., Portas, L., Murgia, F., Ahn, J., Dardenne, C., et al., 2015. Ancestry of the Timorese: age-related macular degeneration associated genotype and allele sharing among human populations from throughout the world. *Front. Genet.* 6, 238. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00238>.
- Murphy, A.R., Truong, Y.B., O'Brien, C.M., Glattauer, V., 2020. Bio-inspired human in vitro outer retinal models: Bruch's membrane and its cellular interactions. *Acta Biomater.* 104, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.01.013>.
- Nakano, T., Ando, S., Takata, N., Kawada, M., Murguruma, K., Sekiguchi, K., Saito, K., Yonemura, S., Eiraku, M., Sasai, Y., 2012. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell* 10, 771–785. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.009>.
- Ortin-Martinez, A., Tsai, E.L., Nickerson, P.E., Bergeret, M., Lu, Y., Smiley, S., Comanita, L., Wallace, V.A., 2017. A reinterpretation of cell transplantation: GFP transfer from donor to host photoreceptors. *Stem Cells* 35, 932–939. <https://doi.org/10.1002/stem.2552>.
- Osakada, F., Ikeda, H., Mandai, M., Wataya, T., Watanabe, K., Yoshimura, N., Akaike, A., Sasai, Y., Takahashi, M., 2008. Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 26, 215–224. <https://doi.org/10.1038/nbt1384>.
- Osakada, F., Jin, Z.B., Hirami, Y., Ikeda, H., Danjyo, T., Watanabe, K., Sasai, Y., Takahashi, M., 2009. In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction. *J. Cell Sci.* 122, 3169–3179. <https://doi.org/10.1242/jcs.050393>.
- Pearson, R.A., Barber, A.C., Rizzi, M., Hippert, C., Xue, T., West, E.L., Duran, Y., Smith, A.J., Chuang, J.Z., Azam, S.A., et al., 2012. Restoration of vision after transplantation of photoreceptors. *Nature* 485, 99–103. <https://doi.org/10.1038/nature10997>.
- Pearson, R.A., Gonzalez-Cordero, A., West, E.L., Ribeiro, J.R., Aghaizu, N., Goh, D., Sampson, R.D., Georgiadis, A., Waldron, P.V., Duran, Y., et al., 2016. Donor and host photoreceptors engage in material transfer following transplantation of post-mitotic photoreceptor precursors. *Nat. Commun.* 7, 13029. <https://doi.org/10.1038/ncomms13029>.
- Pennington, B.O., Clegg, D.O., Melkoulman, Z.K., Hikita, S.T., 2015. Defined culture of human embryonic stem cells and xeno-free derivation of retinal pigmented epithelial cells on a novel, synthetic substrate. *Stem Cells Transl. Med.* 4, 165–177. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0179>.
- Pfeiffer, R.L., Marc, R.E., Jones, B.W., 2019. Persistent remodeling and neurodegeneration in late-stage retinal degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* 100771. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2019.07.004>.
- Plaza Reyes, A., Petrus-Reurer, S., Antonsson, L., Stenfelt, S., Bartuma, H., Panula, S.,

- Mader, T., Douagi, I., Andre, H., Hovatta, O., et al., 2016. Xenofree and defined human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelial cells functionally integrate in a large-eyed preclinical model. *Stem Cell Reports* 6, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.11.008>.
- Ramsden, C.M., Nommiste, B., A. R.L., Carr, A.F., Pownner, M.B., JKS, M., Chen, L.L., Muthiah, M.N., Webster, A.R., Moore, A.T., et al., 2017. Rescue of the MERTK phagocytic defect in a human iPSC disease model using translational read-through inducing drugs. *Sci. Rep.* 7, 51. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00142-7>.
- Rayapudi, S., Schwartz, S.G., Wang, X., Chavis, P., 2013. Vitamin A and fish oils for retinitis pigmentosa. *Cochrane Database Syst Rev*, CD008428. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008428.pub2>.
- Regent, F., Morizur, L., Lesueur, L., Habeler, W., Plancheron, A., Ben Mbarek, K., Monville, C., 2019. Automation of human pluripotent stem cell differentiation toward retinal pigment epithelial cells for large-scale productions. *Sci. Rep.* 9, 10646. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47123-6>.
- Reichman, S., Slembrouck, A., Gagliardi, G., Chaffiol, A., Terray, A., Nanteau, C., Potey, A., Belle, M., Rabesandratana, O., Duebel, J., et al., 2017. Generation of storable retinal organoids and retinal pigmented epithelium from adherent human iPSC cells in xenofree and feeder-free conditions. *Stem Cells* 35, 1176–1188. <https://doi.org/10.1002/stem.2586>.
- Riera, M., Fontrodona, L., Albert, S., Ramirez, D.M., Seriola, A., Salas, A., Munoz, Y., Ramos, D., Villegas-Perez, M.P., Zapata, M.A., et al., 2016. Comparative study of human embryonic stem cells (hESC) and human induced pluripotent stem cells (hiPSC) as a treatment for retinal dystrophies. *Mol Ther Methods Clin Dev* 3, 16010. <https://doi.org/10.1038/mtm.2016.10>.
- Saini, J.S., Corneo, B., Miller, J.D., Kiehl, T.R., Wang, Q., Boles, N.C., Blenkinsop, T.A., Stern, J.H., Temple, S., 2017. Nicotinamide ameliorates disease phenotypes in a human iPSC model of age-related macular degeneration. *Cell Stem Cell* 20 (635–647), e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.12.015>.
- Santos-Ferreira, T., Llonch, S., Borsch, O., Postel, K., Haas, J., Ader, M., 2016. Retinal transplantation of photoreceptors results in donor-host cytoplasmic exchange. *Nat. Commun.* 7, 13028. <https://doi.org/10.1038/ncomms13028>.
- Schaub, N.J., Hotaling, N.A., Manescu, P., Padi, S., Wan, Q., Sharma, R., George, A., Chalfoun, J., Simon, M., Ouladi, M., et al., 2020. Deep learning predicts function of live retinal pigment epithelium from quantitative microscopy. *J. Clin. Invest.* 130, 1010–1023. <https://doi.org/10.1172/JCI131187>.
- Schwartz, S.D., Hubschman, J.P., Heiwell, G., Franco-Cardenas, V., Pan, C.K., Ostrick, R.M., Mickunas, E., Gay, R., Klimanskaya, I., Lanza, R., 2012. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet* 379, 713–720. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60028-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60028-2).
- Schwartz, S.D., Regillo, C.D., Lam, B.L., Elliott, D., Rosenfeld, P.J., Gregori, N.Z., Hubschman, J.P., Davis, J.L., Heiwell, G., Sporn, M., et al., 2015. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet* 385, 509–516. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61376-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61376-3).
- Schwartz, S.D., Tan, G., Hosseini, H., Nagiel, A., 2016. Subretinal transplantation of embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium for the treatment of macular degeneration: an assessment at 4 years. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-18681>. ORSFC1-9.
- Schwarz, N., Carr, A.J., Lane, A., Moeller, F., Chen, L.L., Aguila, M., Nommiste, B., Muthiah, M.N., Kanuga, N., Wolfrum, U., et al., 2015. Translational read-through of the RP2 Arg 120stop mutation in patient iPSC-derived retinal pigment epithelium cells. *Hum. Mol. Genet.* 24, 972–986. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu509>.
- Schwarz, N., Lane, A., Jovanovic, K., Parfitt, D.A., Aguila, M., Thompson, C.L., da Cruz, L., Coffey, P.J., Chapple, J.P., Hardcastle, A.J., et al., 2017. Arl 3 and RP2 regulate the trafficking of ciliary tip kinesins. *Hum. Mol. Genet.* 26, 2480–2492. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx143>.
- Sengupta, A., Chaffiol, A., Mace, E., Caplette, R., Desrosiers, M., Lampic, M., Forster, V., Marre, O., Lin, J.Y., Sahel, J.A., et al., 2016. Red-shifted channelrhodopsin stimulation restores light responses in blind mice, macaque retina, and human retina. *EMBO Mol Med* 8, 1248–1264. <https://doi.org/10.15252/emmm.201505699>.
- Sharma, T.P., Wiley, L.A., Whitmore, S.S., Anfinson, K.R., Cranston, C.M., Opedal, D.J., Daggett, H.T., Mullins, R.F., Tucker, B.A., Stone, E.M., 2017. Patient-specific induced pluripotent stem cells to evaluate the pathophysiology of TRNT1-associated retinitis pigmentosa. *Stem Cell Res.* 21, 58–70. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.03.005>.
- Sharma, R., Khristov, V., Rising, A., Jha, B.S., Dejene, R., Hotaling, N., Li, Y., Stoddard, J., Stanekwicz, C., Wan, Q., et al., 2019. Clinical-grade stem cell-derived retinal pigment epithelium patch rescues retinal degeneration in rodents and pigs. *Sci Transl Med* 11. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat5580>.
- Shirai, H., Mandai, M., Matsushita, K., Kuwahara, A., Yonemura, S., Nakano, T., Assawachananont, J., Kimura, T., Saito, K., Terasaki, H., et al., 2016. Transplantation of human embryonic stem cell-derived retinal tissue in two primate models of retinal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E81–E90. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512590113>.
- Singh, M.S., Charbel Issa, P., Butler, R., Martin, C., Lipinski, D.M., Sekaran, S., Barnard, A.R., MacLaren, R.E., 2013. Reversal of end-stage retinal degeneration and restoration of visual function by photoreceptor transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 1101–1106. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119416110>.
- Singh, M.S., Balmer, J., Barnard, A.R., Aslam, S.A., Moralli, D., Green, C.M., Barnea-Cramer, A., Duncan, I., MacLaren, R.E., 2016. Transplanted photoreceptor precursors transfer proteins to host photoreceptors by a mechanism of cytoplasmic fusion. *Nat. Commun.* 7, 13537. <https://doi.org/10.1038/ncomms13537>.
- Singh, R.K., Ocellini, L.M., Binette, F., Petersen-Jones, S.M., Nasonkin, I.O., 2019. Transplantation of human embryonic stem cell-derived retinal tissue in the subretinal space of the cat eye. *Stem Cells Dev.* 28, 1151–1166. <https://doi.org/10.1089/scd.2019.0090>.
- Singh, M.S., Park, S.S., Albini, T.A., Canto-Soler, M.V., Klassen, H., MacLaren, R.E., Takahashi, M., Nagiel, A., Schwartz, S.D., Bharti, K., 2020. Retinal stem cell transplantation: balancing safety and potential. *Prog. Retin. Eye Res.* 75, 100779. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2019.100779>.
- Smith, J.R., Vallier, L., Lupo, G., Alexander, M., Harris, W.A., Pedersen, R.A., 2008. Inhibition of activin/nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm. *Dev. Biol.* 313, 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.10.003>.
- Sonoda, S., Sreekumar, P.G., Kase, S., Spee, C., Ryan, S.J., Kannan, R., Hinton, D.R., 2009. Attainment of polarity promotes growth factor secretion by retinal pigment epithelial cells: relevance to age-related macular degeneration. *Aging (Albany NY)* 2, 28–42. <https://doi.org/10.18632/aging.100111>.
- Stanzel, B.V., Liu, Z., Somboonthanakij, S., Wongsawad, W., Brinken, R., Eter, N., Corneo, B., Holz, F.G., Temple, S., Stern, J.H., et al., 2014. Human RPE stem cells grown into polarized RPE monolayers on a polyester matrix are maintained after grafting into rabbit subretinal space. *Stem Cell Reports* 2, 64–77. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.11.005>.
- Sugita, S., Iwasaki, Y., Makabe, K., Kamao, H., Mandai, M., Shiina, T., Ogasawara, K., Hirami, Y., Kurimoto, Y., Takahashi, M., 2016a. Successful transplantation of retinal pigment epithelial cells from MHC homozygote iPSCs in MHC-matched models. *Stem Cell Reports* 7, 635–648. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.08.010>.
- Sugita, S., Iwasaki, Y., Makabe, K., Kimura, T., Futagami, T., Suegami, S., Takahashi, M., 2016b. Lack of T cell response to iPSC-derived retinal pigment epithelial cells from HLA homozygous donors. *Stem Cell Reports* 7, 619–634. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.08.011>.
- Swinney, D.C., Anthony, J., 2011. How were new medicines discovered? *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 507–519. <https://doi.org/10.1038/nrd3480>.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>.
- Taylor, C.J., Bolton, E.M., Bradley, J.A., 2011. Immunological considerations for embryonic and induced pluripotent stem cell banking. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 366, 2312–2322. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0030>.
- Taylor, C.J., Peacock, S., Chaudhry, A.N., Bradley, J.A., Bolton, E.M., 2012. Generating an iPSC bank for HLA-matched tissue transplantation based on known donor and recipient HLA types. *Cell Stem Cell* 11, 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.07.014>.
- Thompson, J.R., Worthington, K.S., Green, B.J., Mullin, N.K., Jiao, C., Kaalberg, E.E., Wiley, L.A., Han, I.C., Russell, S.R., Sohn, E.H., et al., 2019. Two-photon polymerized poly (caprolactone) retinal cell delivery scaffolds and their systemic and retinal biocompatibility. *Acta Biomater.* 94, 204–218. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.04.057>.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–1147.
- Tomita, H., Sugano, E., Isago, H., Hiroi, T., Wang, Z., Ohta, E., Tamai, M., 2010. Channelrhodopsin-2 gene transduced into retinal ganglion cells restores functional vision in genetically blind rats. *Exp. Eye Res.* 90, 429–436. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2009.12.006>.
- Tu, H.Y., Watanabe, T., Shirai, H., Yamasaki, S., Kinoshita, M., Matsushita, K., Hashiguchi, T., Onoe, H., Matsuyama, T., Kuwahara, A., et al., 2019. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.11.028>.
- Tucker, B.A., Scheetz, T.E., Mullins, R.F., DeLuca, A.P., Hoffmann, J.M., Johnston, R.M., Jacobson, S.G., Sheffield, V.C., Stone, E.M., 2011. 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–E576. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108918108>.
- Tucker, B.A., Mullins, R.F., Streb, L.M., Anfinson, K., Eyestone, M.E., Kaalberg, E., Riker, M.J., Drack, A.V., Braun, T.A., Stone, E.M., 2013. Patient-specific iPSC-derived photoreceptor precursor cells as a means to investigate retinitis pigmentosa. *Elife* 2, e00824. <https://doi.org/10.7554/eLife.00824>.
- Uppal, G., Milliken, A., Lee, J., Acheson, J., Hykin, P., Tufail, A., da Cruz, L., 2007. New algorithm for assessing patient suitability for macular translocation surgery. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 35, 448–457. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2007.01528.x>.
- Vaajasari, H., Ilmarinen, T., Juntti-Uusitalo, K., Rajala, K., Onnela, N., Narkilahti, S., Suuronen, R., Hyttinen, J., Uusitalo, H., Skottman, H., 2011. Toward the defined and xenofree differentiation of functional human pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelial cells. *Mol. Vis.* 17, 558–575.
- van Niel, G., D'Angelo, G., Raposo, G., 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>.
- Verbakel, S.K., van Huet, R.A.C., Boon, C.J.F., den Hollander, A.I., Collin, R.W.J., Klaver, C.C.W., Hoyng, C.B., Roepman, R., Klevering, B.J., 2018. Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Prog. Retin. Eye Res.* 66, 157–186. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.03.005>.
- Vergara, M.N., Flores-Bellver, M., Aparicio-Domingo, S., McNally, M., Wahlin, K.J., Saxena, M.T., Mumm, J.S., Canto-Soler, M.V., 2017. Three-dimensional automated reporter quantification (3D-ARQ) technology enables quantitative screening in retinal organoids. *Development* 144, 3698–3705. <https://doi.org/10.1242/dev.146290>.
- Warre-Cornish, K., Barber, A.C., Sowden, J.C., Ali, R.R., Pearson, R.A., 2014. Migration, integration and maturation of photoreceptor precursors following transplantation in the mouse retina. *Stem Cells Dev.* 23, 941–954. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0471>.

- Welby, E., Lakowski, J., Di Foggia, V., Budinger, D., Gonzalez-Cordero, A., Lun, A.T.L., Epstein, M., Patel, A., Cuevas, E., Kruczek, K., et al., 2017. Isolation and comparative transcriptome analysis of human fetal and iPSC-derived cone photoreceptor cells. *Stem Cell Reports* 9, 1898–1915. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.10.018>.
- West, E.L., Pearson, R.A., Barker, S.E., Luhmann, U.F., Maclaren, R.E., Barber, A.C., Duran, Y., Smith, A.J., Sowden, J.C., Ali, R.R., 2010. Long-term survival of photoreceptors transplanted into the adult murine neural retina requires immune modulation. *Stem Cells* 28, 1997–2007. <https://doi.org/10.1002/stem.520>.
- Wiley, L.A., Burnight, E.R., DeLuca, A.P., Anfinson, K.R., Cranston, C.M., Kaalberg, E.E., Penticoff, J.A., Affatigato, L.M., Mullins, R.F., Stone, E.M., et al., 2016. cGMP production of patient-specific iPSCs and photoreceptor precursor cells to treat retinal degenerative blindness. *Sci. Rep.* 6, 30742. <https://doi.org/10.1038/srep30742>.
- Wong, W.L., Su, X., Li, X., Cheung, C.M., Klein, R., Cheng, C.Y., Wong, T.Y., 2014. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Health* 2, e106–e116. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(13\)70145-1](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(13)70145-1).
- Wong, C.H., Siah, K.W., Lo, A.W., 2019. Estimation of clinical trial success rates and related parameters. *Biostatistics* 20, 273–286. <https://doi.org/10.1093/biostatistics/kxx069>.
- Worthington, K.S., Wiley, L.A., Kaalberg, E.E., Collins, M.M., Mullins, R.F., Stone, E.M., Tucker, B.A., 2017. Two-photon polymerization for production of human iPSC-derived retinal cell grafts. *Acta Biomater.* 55, 385–395. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.03.039>.
- Yang, J., Li, Y., Chan, L., Tsai, Y.T., Wu, W.H., Nguyen, H.V., Hsu, C.W., Li, X., Brown, L.M., Egli, D., et al., 2014. Validation of genome-wide association study (GWAS)-identified disease risk alleles with patient-specific stem cell lines. *Hum. Mol. Genet.* 23, 3445–3455. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu053>.
- Yoshida, T., Ozawa, Y., Suzuki, K., Yuki, K., Ohyama, M., Akamatsu, W., Matsuzaki, Y., Shimamura, S., Mitani, K., Tsubota, K., et al., 2014. The use of induced pluripotent stem cells to reveal pathogenic gene mutations and explore treatments for retinitis pigmentosa. *Mol. Brain* 7, 45. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-7-45>.
- Zhang, Y., Ivanova, E., Bi, A., Pan, Z.H., 2009. Ectopic expression of multiple microbial rhodopsins restores ON and OFF light responses in retinas with photoreceptor degeneration. *J. Neurosci.* 29, 9186–9196. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0184-09.2009>.
- Zhao, C., Wang, Q., Temple, S., 2017. Stem cell therapies for retinal diseases: recapitulating development to replace degenerated cells. *Development* 144, 1368–1381. <https://doi.org/10.1242/dev.133108>.
- Zhao, Y., Feng, K., Liu, R., Pan, J., Zhang, L., Lu, X., 2019. Vitamins and mineral supplements for retinitis pigmentosa. *J. Ophthalmol.* 2019, 8524607. <https://doi.org/10.1155/2019/8524607>.
- Zheng, W., Thorne, N., McKew, J.C., 2013. Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. *Drug Discov. Today* 18, 1067–1073. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.07.001>.
- Zhong, X., Gutierrez, C., Xue, T., Hampton, C., Vergara, M.N., Cao, L.H., Peters, A., Park, T.S., Zambidis, E.T., Meyer, J.S., et al., 2014. Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs. *Nat. Commun.* 5, 4047. <https://doi.org/10.1038/ncomms5047>.
- Zhu, J., Cifuentes, H., Reynolds, J., Lamba, D.A., 2017. Immunosuppression via loss of IL2gamma enhances long-term functional integration of hESC-derived photoreceptors in the mouse retina. *Cell Stem Cell* 20 (374–384), e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.11.019>.

Review

The Future of Regenerative Medicine: Cell Therapy Using Pluripotent Stem Cells and Acellular Therapies Based on Extracellular Vesicles

Margot Jarrige ^{1,2,3,†}, Elie Frank ^{1,2,3,†}, Elise Herardot ^{1,2,†}, Sabrina Martineau ^{1,2}, Annabelle Darle ^{1,2,3}, Manon Benabides ^{1,2,3}, Sophie Domingues ^{1,2,3}, Olivier Chose ^{1,2,3}, Walter Habeler ^{1,2,3}, Judith Lorant ^{1,2}, Christine Baldeschi ^{1,2}, Cécile Martinat ^{1,2} , Christelle Monville ^{1,2}, Lise Morizur ^{1,2,3,*}  and Karim Ben M'Barek ^{1,2,3,*} 

¹ INSERM U861, I-Stem, AFM, Institute for Stem Cell Therapy and Exploration of Monogenic Diseases, 91100 Corbeil-Essonnes, France; mjarrige@istem.fr (M.J.); efrank@istem.fr (E.F.); eherardot@istem.fr (E.H.); smartineau@istem.fr (S.M.); adarle@istem.fr (A.D.); mbenabides@istem.fr (M.B.); sdomingues@istem.fr (S.D.); ochose@istem.fr (O.C.); whabeler@istem.fr (W.H.); jlorant@istem.fr (J.L.); cbaldeschi@istem.fr (C.B.); cmartinat@istem.fr (C.M.); cmonville@istem.fr (C.M.)

² Université Paris-Saclay, Université d'Evry, U861, 91100 Corbeil-Essonnes, France

³ Centre d'Etude des Cellules Souches, 91100 Corbeil-Essonnes, France

* Correspondence: lmorizur@istem.fr (L.M.); kbenmbarek@istem.fr (K.B.M.)

† Equal contribution.

‡ These authors share equal senior authorship.



Citation: Jarrige, M.; Frank, E.; Herardot, E.; Martineau, S.; Darle, A.; Benabides, M.; Domingues, S.; Chose, O.; Habeler, W.; Lorant, J.; et al. The Future of Regenerative Medicine: Cell Therapy Using Pluripotent Stem Cells and Acellular Therapies Based on Extracellular Vesicles. *Cells* **2021**, *10*, 240. <https://doi.org/10.3390/cells10020240>

Academic Editor: Hélène Boeuf

Received: 30 November 2020

Accepted: 23 January 2021

Published: 27 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The rapid progress in the field of stem cell research has laid strong foundations for their use in regenerative medicine applications of injured or diseased tissues. Growing evidences indicate that some observed therapeutic outcomes of stem cell-based therapy are due to paracrine effects rather than long-term engraftment and survival of transplanted cells. Given their ability to cross biological barriers and mediate intercellular information transfer of bioactive molecules, extracellular vesicles are being explored as potential cell-free therapeutic agents. In this review, we first discuss the state of the art of regenerative medicine and its current limitations and challenges, with particular attention on pluripotent stem cell-derived products to repair organs like the eye, heart, skeletal muscle and skin. We then focus on emerging beneficial roles of extracellular vesicles to alleviate these pathological conditions and address hurdles and operational issues of this acellular strategy. Finally, we discuss future directions and examine how careful integration of different approaches presented in this review could help to potentiate therapeutic results in preclinical models and their good manufacturing practice (GMP) implementation for future clinical trials.

Keywords: pluripotent stem cells; cell therapy; extracellular vesicles; exosome; acellular therapy

1. Introduction

In the background of many diseases, the degeneration and/or dysfunction of a particular cell type affects tissues and organs, which will deteriorate over time and lose their functions. In this context, regenerative medicine offers new perspectives for pathologies that otherwise remain untreated [1,2]. Hundreds of clinical trials have been initiated in the last few years for a large panel of indications. Strategies are more and more refined to comply with large-scale productions and identify the most efficient formulation to maximize therapeutic effects [3]. Tissue engineering has recently emerged and constitutes the second generation of cell-based regenerative therapy by incorporating three-dimensional (3D) biodegradable compounds mimicking the extracellular matrix and/or multiple cell types [4,5].

Besides the therapeutic effects of cells elicited by their direct presence, some of the observed benefits are mediated by their indirect actions and, as such, may not require

them [6,7]. Extracellular vesicles (EVs) have emerged as important mediators of paracrine signaling and could exert such functions [8–10]. Intensive research on EVs over the last half-century has led to an in-depth understanding of their origin and biological functions and has placed them at the forefront of various disease treatments.

Herein, we first review the state of the art of cell therapy and its current limitations and challenges, with a particular focus on pluripotent stem cell-derived therapeutic products. In a second part, we elaborate on functions of EVs and discuss their interest in the field of “acellular therapies” for pathological conditions that affect the eye, skin, heart and skeletal muscle. Finally, we discuss the future prospects of these therapies and their combination to potentiate therapeutic outcomes.

2. Regenerative Medicine: State of the Art

2.1. Introduction

The source material for cell and tissue-based products is a major point to consider for regenerative medicine. A prerequisite for the broad application of cell products is the production of large quantities of cells, with consistency between different batches or manufacturing processes to ensure the same quality and therapeutic efficacy to each patient.

This section will describe the numerous cell sources that may be used in cell therapy and their use in selected pathological conditions. In addition, we will discuss the transition from cell therapies formulated as a cell suspension to more complex tissue-engineered products.

2.2. Cell Sources

Various cell sources have been considered for cell therapy and regenerative medicine, including adult material from living donors or cadavers, fetal materials and pluripotent stem cell lines.

Cell material from adult origin can be obtained directly from patients and purified/amplified *in vitro* (like mesenchymal stem cells (MSCs) or epithelial cells from the skin). Such autologous approach prevents the risk of rejection. However, the manufacturing process and supply logistics of autologous cell-based therapy products are highly complicated and hinder their scale out. These limitations are particularly important when addressing widespread diseases that affect millions of patients like Age-related Macular Degeneration (AMD) or when the number of cells needed for therapy is important, as in the case of large burns. Alternatively, cells can be obtained from cadavers or, when possible, living donors. For all adult sources, donor variability—histocompatibility, age, genotype, etc.—drives cell product variability. In addition, adult cell sources have a reduced potential for expansion. This is especially true for terminally differentiated adult cell types (i.e., skeletal muscle cells) that hardly proliferate, or for organs for which there is limited access to endogenous stem cells.

Another source of materials for cell therapy is aborted fetuses. Harvested cells retain a proliferation potential that is superior to that of adult cells. Although fetus stem/progenitor cells are restricted in their potentiality, giving rise to limited cell types, some of these cells are no longer present in adult tissues and could thus be used to generate specific cell types. Nevertheless, their access is highly variable around the world, depending on the abortion law and policy in place in each country. Indeed, in some countries, it is strictly prohibited; in others, abortion is prohibited after different gestational ages, which could be restrictive. The use of human fetal tissue also raises a number of ethical considerations. Besides these restrictions, the access to fetuses at a defined gestational age is complex, as highlighted for Huntington’s disease (HD) cell therapy as an example [11]. Clinical trials have aimed to restore degenerated striatal cells in the brain of HD patients through the transplantation of fetal ganglionic eminences (GE) containing future striatal cells. In the MIG-HD clinical study, 86 fetal GE tissues were grafted into HD patients but a total of 163 surgeries were cancelled due to inadequate/insufficient donor fetal material as fetal cells should be grafted within 2 days following abortion [12].

Since their first derivation, human pluripotent stem cells (hPSCs) have been considered a promising cell source for regenerative medicine. hPSCs are self-renewable and give rise to any cell type of the human body. They can be obtained from supernumerary in vitro fertilized embryos (human embryonic stem cells or hESCs) or after the conversion of adult primary cells to pluripotency by the overexpression of a cocktail of factors (human induced pluripotent stem cells or hiPSCs) [13–15]. hPSCs are compatible with large-scale industrial productions in good manufacturing practices (GMP) facilities and quality controlled as any other more conventional pharmaceutical products. Whereas the majority of hPSC-based clinical trials have used hESCs up to now, the field is moving toward hiPSCs as they do not require the destruction of embryos and consequently can be used worldwide without restriction [1].

In the following section, we highlight some recent therapeutic applications of hPSC-based cell therapy products.

2.3. hPSC-Based Cell Therapy: Selected Examples

2.3.1. Retinal Degeneration

Different causes of visual impairment, such as AMD, Retinitis Pigmentosa (RP) and diabetic retinopathy [16], are characterized by the degeneration of the light-sensitive part of the eye: the retina [17]. Depending on the nature and/or stage of the disease, different cell types are susceptible to degeneration. In particular, the retinal pigment epithelium (RPE), an essential supportive tissue of the retina affected in AMD and some forms of RP, triggers the degeneration of photoreceptors (PRs). Consequently, a specific focus has emerged to replace dead or dysfunctional RPE cells in order to prevent PR degeneration and subsequent vision loss.

In the last decade, several protocols based on spontaneous differentiation have been developed to convert hPSCs into RPE cells [7,18–20]. The differentiation is initiated by FGF2 withdrawal (used to maintain the pluripotency state of hPSCs). After several weeks, pigmented clusters start to appear among cultured cells. These clusters, corresponding to RPE cells, can be manually isolated and then expanded. At the end of the process, hPSC-RPE cells are banked in cryovials and can be thawed on demand. More recently, defined protocols were also described to improve the yield and size of the final cell bank through the addition of cytokines and/or small molecules [21–24]. These strategies allowed to bypass manual enrichment and critical steps of the manufacturing process could be programmed in automated cell culture systems [25–27].

The therapeutic potential of these hPSC-RPE cells has been evaluated after injection as a cell suspension into the subretinal space between endogenous PRs and RPE/Bruch's membrane of a rat model of RP. All these studies demonstrated the benefit of hPSC-RPE cells with a preservation of PRs and a restoration of the visual function [18,23,28–30]. Recent optimizations of the final formulation with the reconstruction of an organized RPE epithelium on top of different scaffolds improved graft survival and therapeutic outcomes [18,31,32]. This formulation as an organized tissue required the development of specific devices to prepare and deliver the therapeutic product to the eye [33–36].

In the context of PR degeneration, hPSCs are able to differentiate into PRs [17] through the formation of retinal organoids [37–40]. hPSC-PRs are then enriched following dissociation and cell sorting [17,41]. First transplantations of PR cell suspensions in rodent models of retinal degeneration suggested a therapeutic effect mediated by cell integration and maturation [42]. However, further studies contradicted these first results and revealed a phenomenon of cytoplasmic material transfer with remaining PRs [43–45]. Retinal organoids dissected into small sections were also transplanted into the subretinal space of rodents and primates. With this grafting approach, PRs create connections and elicit some signs of visual recovery [46–48]. However, these sheets tend to form rosettes and PRs are transplanted with other cell types present in organoids, which limits the number of connections with the other neurons present in the retina. An improvement of the PR sheet formulation is ongoing to produce an organized PR sheet with or without a RPE

epithelium [3]. In particular, polymeric 3D micro-structured scaffolds could be used to organize and structure PRs [49–52]. To overcome limitations of PR functionality caused by maturation defects, another strategy is to genetically modify hPSC-PRs with an optogene that brings light sensitivity to immature PRs [53].

2.3.2. Cutaneous Wounds

Skin wounds, principally caused by traumas or thermal burns, can be self-repaired by the body [5,54]. The different stages of self-wound healing include: (1) hemostasis to stop blood loss and provide a scaffold for cell migration, (2) inflammation to eliminate pathogens and tissue debris, (3) proliferation in particular of keratinocytes to achieve wound coverage and (4) remodeling of collagens, which are secreted by dermal fibroblasts [5,55,56]. However, the healing process can be impaired by the size of the wound, environmental factors (stress, smoking, medications or recreational drugs) or genetic disorders affecting the skin or wound healing capacity [5,57].

Occlusive dressings may be applied to the wound in order to improve healing by providing a mechanical protection and a moist and clean environment that favors re-epithelialization [5,56,58]. When this is not sufficient, skin substitutes composed of allogenic or autologous cells can be obtained from the *in vitro* expansion of epidermal progenitors [59]. These skin substitutes may be composed of epidermal, dermal, or dermo-epidermal (composite) layers [56,57,59]. For example, sheet of autologous keratinocytes from donors are expanded *in vitro* to generate large epidermal sheets. However, this approach is time consuming [5,56] and, in the case of severe burns, strategies to generate ready-to-use banks of keratinocytes will improve patient care. Such objectives are achieved by the preparation of skin substitutes derived from hPSCs, which facilitate the production of large banks suitable for large-scale use and clinically compatible industrial productions.

hPSCs have been successfully differentiated into basal keratinocytes capable to form a pluristratified epidermis *in vitro* and *in vivo* in rodents [60–62]. However, depending on the disease context, inflammation should be controlled and angiogenesis should be promoted in order to maintain the graft. Therefore, complex tissue engineering is needed to improve graft integration and survival. Endothelial cells, fibroblast and collagen may be part of the reconstructed skin substitute to mimic the dermal layer and favor revascularization [61,63,64]. An inherent difficulty in working with several cell types is their correct spatial organization to recreate the complex skin structure to ensure functional integration of the graft. Promising results were obtained using micro-patterned 3D vascular networks with iPSC-derived endothelial cells in skin substitutes, with a better engraftment and long-term survival as well as an improved functionality when grafted in immunodeficient mice [65]. The choice of the bioink to create the 3D vasculature has also an impact on the physical properties of the reconstructed skin. Indeed, skin-derived extracellular matrix bioinks reduce the shrinkage and contraction observed with the use of collagen [66]. In addition, it favors epithelial organization and barrier function.

Nevertheless, other characteristics of the skin are still missing (i.e., melanocytes, sebaceous glands and hairiness). Different protocols based on hPSCs have recently been developed to obtain melanocytes [67–69] and hair follicles [70,71] but the development of clinically compatible complex skin substitutes with all appendages require further developments.

2.3.3. Heart Infarction

Despite advances in interventional and medication therapies, heart failure is the first cause of human death worldwide [72]. The human cardiac muscle, or myocardium, has almost no regenerative potential compared to that of lower vertebrates, the lost tissue being replaced by a fibrotic scar [73]. Existing treatments are not curative and do not trigger heart regeneration [74]. Cell therapy may address this bottleneck through the transplantation of cells sharing the same contractile properties as heart muscle cells [74,75].

Various protocols have been developed to produce cardiomyocytes from hPSCs (hPSC-CMs) both from 3D or 2D cultures [76–80], some of them with a high yield and purity using bioreactors [81]. For example, hPSCs are committed towards a cardiac mesodermal lineage through exposure to BMP-2 [82]. Cardiovascular progenitor cells are then maintained to a progenitor state by inhibiting the fibroblast growth factor receptor with SU-5402 [83]. Alternatively, a temporal regulation of WNT signaling pathway (i.e., initial activation followed by inhibition) is sufficient to trigger hPSC-CM differentiation [84]. hPSC-CMs display some main characteristics of cardiomyocytes such as contractility, ion channels, calcium handling and excitation propagation [85,86].

The preclinical evaluation of hPSC-CM functionality has been conducted in rodents [87] and larger animals (pigs or primates) [88–90]. Cells are delivered either as a cell suspension through an intramuscular route or after tissue engineering. Following injection of allogenic PSC-CMs or hESC-CMs as cell suspensions in myocardial infarcted primates, cardiac contractile functions improved [88–90]. In addition, injections of PSC-CMs were shown to be superior to skeletal myoblasts or MSCs for the restoration of cardiac functions and oxygen consumption in a porcine model of ischemic injury [91]. A recent phase I clinical trial delivered epicardially hESC-CM embedded in a fibrin patch into patients with severe left ventricular dysfunction (see Section 2.4. for a more detailed description; [86]).

A major concern with the use of hPSC-CMs is the apparition of a ventricular arrhythmia probably due to immaturity and automaticity of the graft [90,92]. Indeed, differentiation protocols also give rise to nodal subtypes with automaticity-associated genes like *HCN4* susceptible to trigger pacemaker currents [93,94]. Exclusion of these cells may reduce ventricular arrhythmia [75]. Overall, hPSC-CMs delivered as a cell suspension appear functionally coupled with the host myocardium, but this observation is still debated regarding tissue-engineered hearts [75,95]. In addition, the grafted cells have limited survival in vivo. Interestingly, hPSC-CMs co-transplanted with hPSC-derived epicardial cells or MSC-loaded patches improved both graft survival (i.e., size of the graft) and maturation in rodents [96,97]. Nevertheless, studies in larger animals should confirm these results to validate long-term integration and survival of transplanted hPSC-CMs.

2.3.4. Skeletal Muscle Regeneration

Muscle regeneration involves the activation of PAX7 positive quiescent satellite cells that respond to tissue injury by proliferation and differentiation to give rise to MyoD positive progenitors called myoblasts (MBs) [98]. MBs then differentiate and fuse with myofibers to regenerate the damaged muscle [99]. Despite an important regenerative potential, skeletal muscle atrophy is common following trauma or congenital muscle diseases, such as Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), but remains an unmet medical need [100].

Upon transplantation, freshly isolated rodent satellite cells are able to regenerate chemically injured skeletal muscles that were depleted by irradiation of endogenous satellite cells [101]. The dystrophin-deficient mdx mouse model of DMD was also rescued through this strategy [102–104]. These results hint at the promising potential of cell therapy to tackle muscle atrophy. However, satellite cells amplified through cell culture lose their regenerative potential in vivo [103]. Thus, a renewable source of cells is required to treat patients.

Protocols have been described allowing the conversion of hPSCs into myoblasts through cytokines or small molecules exposition, recapitulating in vivo developmental cues [98,99]. Briefly, hPSCs are induced to presomitic mesoderm progenitors after activation of WNT and inhibition BMP signaling [99,105]. Then, myoblast progenitors are obtained after FGF, HGF and IGF stimulations [105]. Satellite-like cells (PAX7+ cells) represented 22% of the final cell population at 4 weeks [105,106]. These cells could then be subcultured without the loss of PAX7+ population [106]. PSC-derived satellite-like cells were able to repopulate endogenous satellite cell niche and regenerate skeletal muscles [105]. In addition, the presence of ERBB3 and NGFR surface markers allowed selective enrichment

of a myogenic population with increased regenerative potential *in vivo* in mdx mice [107]. Therefore, cell sorting of ERBB3+ cells to enrich a myogenic cell population is suitable for cell therapy. Recently, a myogenic population was obtained after only 15 days of differentiation following CD10+/CD24- cell sorting [108]. These cells are suggested to be more homogenous compared to ERBB3+/NGFR+ and more myogenic *in vivo* in mdx mice [108]. Similar protocols were developed to produce large-scale banks of cryopreserved hPSC-derived myogenic progenitors (expanded for a maximum of 5×10^{11} -fold) [109].

To date, clinically compatible protocols are still missing [98]. For volumetric muscle loss, new muscle fibers should be regenerated to reconstruct the tissue cytoarchitecture. This will require specific scaffolds [110]. In addition, supportive cells (i.e., muscle resident cells), such as endothelial cells, are necessary to ensure proper tissue vascularization [98,110]. Finally, for *de novo* reconstruction of muscle fibers, strategies to promote innervation should be developed [111].

2.4. hPSC-Based Clinical Trials

Approved in 2009 by the FDA, the first clinical trial led by Geron Corporation paved the way for the use of hESC-derived cells into the clinic [112]. The company had to fill an investigational new drug application of 22,000 pages to demonstrate the safety, functionality and quality of their hESC-derived oligodendrocyte progenitors for the treatment of spinal cord injuries. Unfortunately, during this first phase I clinical trial, only half of the patient cohort had been treated before it was halted prematurely for economic reasons [113]. Asterias Biotherapeutics (acquired later by Lineage Cell Therapeutics) pursued the development of this cell therapy in a new phase I/IIa dose escalation clinical trial and announced in 2019 that signs of motor improvements without safety concerns at 12-month were observed in the 25 treated patients [114].

Since then, a number of indications were evaluated, including eye diseases, diabetes and ischemic hearts. A recent manually curated database identified 54 planned or initiated clinical trials based on hPSCs worldwide [1]. Starting from 2018, a switch was observed regarding the source material with the number of hiPSC-based clinical trials beginning to be more important compared to that of hESC-based trials.

Most of these clinical trials focus on hPSC-derived RPE (24 clinical trials) to target macular degeneration, some forms of RP and Stargardt's disease [1,3]. This could be explained by the easy access and available live imaging technologies, as well as low number of required cells and immune privilege of the eye. hESC-RPE cells initially injected as a cell suspension were demonstrated to be safe in a total of 38 patients [115]. The two major risks associated with hPSC therapy (i.e., teratoma formation due to residual hPSCs and cell dispersion to other organs) were not reported. hESC-RPE cells were also organized as an epithelial tissue before implantation on a synthetic [34,116] or biological scaffold [18,36]. Strikingly, one of two patients treated for a severe exudative AMD gained enough vision to be able to read again a year after the transplantation of a hESC-RPE sheet seeded on a polyester scaffold [34]. These results are encouraging but should be taken with caution due to the limited number of patients.

The first autologous hiPSC clinical trial was also conducted with hiPSC-RPE epithelial sheets to target the wet form of AMD [117]. The trial was halted after the first patient due to a Japanese regulation change leading to a switch to an allogeneic hiPSC-RPE graft strategy [3]. The only treated patient maintained her visual acuity for one year [117].

Ischemic heart disease is another critical indication with four clinical trials planned or already started [1]. A completed phase I clinical trial delivered epicardially hESC-derived cardiovascular progenitors embedded in a fibrin patch into six patients with severe left ventricular dysfunction [86]. The primary outcomes were safety through the evaluation of cardiac or off-target tumors, occurrence of arrhythmia and alloimmunization. Patients had a history of myocardial infarction at least 6 months before screening. hESC-derived cardiovascular progenitors were immunomagnetically sorted for the expression of SSEA-1, a marker of pluripotency loss and expressed the cardiac transcription factor ISL1. A

nearly pure population of cardiovascular progenitor (median of 97.5%) was obtained. After a follow-up of 4-and-a-half years at maximum, no signs of tumors or arrhythmias were detected in patients [114]. An alloimmunization was detected through antibodies directed against donor cells in three patients without clinically relevant signs [86]. In fact, patients were under an immunosuppressive regimen only for one month as grafted cells are suggested to be short-lived and to act through a paracrine effect. More importantly, this trial was one of the first to suggest the safety of such cell therapy products. Since 2018, other clinical trials in China and Japan have been planned with autologous or allogenic hiPSC-derived cardiomyocytes [1].

To address type 1 diabetes, Viacyte launched four clinical trials based on hESC-derived beta-like cells delivered through subcutaneous implantation [1]. These cells, able to secrete insulin, are evaluated following subcutaneous injection in an immune-encapsulation device. No safety issues were reported in a phase I/II clinical trial of 19 implanted patients (June, 2018) [114]. In addition, the differentiation of implanted cells into insulin- and glucagon-producing cells has been reported. Concerns with the long-term cell engraftment led to an evolution of the implanted device. A new version currently under evaluation is composed of two membranes: the outer one is cell permeable to support neovascularization, contrary to the inner one, which prevents immune cell infiltration [118].

Up to now, all these clinical trials have demonstrated the safety of cell therapy products based on hPSC-derivatives. While the therapeutic application of these innovative cell products is still in its infancy, encouraging observations are also associated with some signs of efficacy. However, larger clinical trials are required to confirm the therapeutic efficacy of this strategy.

2.5. Limitations/Challenges

Preclinical and first clinical studies have shed light on different issues and challenges. First, immune reaction to donor cells is a critical drawback. Autologous transplantation does not need an immunosuppressive regimen and favors an optimal cell survival. However, the cost of autologous cell therapy is prohibitive [119]. The delay inherent to derivate hPSCs from a patient, to differentiate the cells to a particular cell type and finally quality control the cells to ensure safety is long. This strategy is not viable when the need for a treatment concerns millions of patients, as in AMD or in conditions that affect the heart. In contrast, allogenic cell banks allow an off-the-shelf product that could be distributed and used on demand. Cell banks could be designed large enough to treat an important number of patients at an industrial scale, reducing the cost of each graft unit. As the human leukocyte antigen (HLA) of donor is not matched to the patient, the risk of immune rejection is high and the so-called immune privilege of specific organs (i.e., central nervous system or eye) not always clearly demonstrated upon allogenic transplantation. To prevent graft rejection, an immunosuppressive regimen is required but associated side effects can be important and deleterious [120]. Current immunosuppressive protocols tested for hPSC-RPE transplantation, the most advanced hPSC-based therapy, ranged from local to systemic administration [2,34,116,121]. To bypass this, two strategies are proposed: matching the HLA between donor and recipient through multiple cell banks or to genetically engineer a hypoimmunogenic hPSC bank. Human PSC banks with known HLA could be facilitated by the identification of few selected homozygous HLA-typed donors that have the potential to match the HLA of a large part of the population in a particular country [122,123]. For example, 10 selected donors could cover nearly 40% of the UK population and 150 donors cover the majority (93%) of the population [124]. A clinical trial in Japan used one HLA-matched hiPSC-RPE cell line to treat five wet-AMD patients [125]. Transplanted cells survived at one year. The authors reported a mild immune rejection that resolved following local steroid administration. Interestingly, 18.8% of the 105 AMD patients followed in this hospital had a matched HLA with this hiPSC-RPE cell line.

Other approaches under investigation depend on genetic engineering to modulate immunogenicity of donor cells in order to generate a “universal” cell bank suitable to treat any

patient, instead of multiple cell banks. For example, AAV (serotype 3B)-mediated knock-in of HLA-E at the beta-2-microglobulin (B2M) locus in B2M^{-/-} PSCs leads to overexpression of HLA-E without surface expression of HLA-A, -B or -C. This prevents stimulation of allogenic T cells or natural killer (NK) cell mediated lysis [126]. Another approach is to knockout HLA-A and -B using CRISPR-Cas9 technology while retaining HLA-C to prevent NK mediated lysis. This approach improves donor compatibility and only 12 lines of HLA-C-retained hiPSC lines could cover 90% of the world population [127]. Alternatively, the knockout of HLA I and II was combined to the expression of immunomodulatory factors PD-L1, HLA-G, and CD47 inserted in AAVS1 locus to prevent immune responses [128]. Finally, the lentiviral-mediated overexpression of only CD47 combined with the CRISPR-Cas9 knockout of HLA I and II was found to be sufficient to generate hypoimmunogenic hiPSCs. Cardiomyocytes, endothelial or smooth muscle cells derived from these hiPSCs did not elicit immune rejection [129]. However, such genetic manipulations need a careful safety assessment of the cell bank to prevent unwanted genetic alterations and/or residual transducing vectors. In addition, the insertion of a suicide gene inducing the selective death of grafted cells upon drug supplementation may provide a safety switch against uncontrolled proliferation of hypoimmunogenic hPSCs [130]. Implementation of one of these strategies will greatly improve the benefice/risk ratio and may extend cell therapy to a larger number of patients while reducing the cost.

The formulation of cell therapy is the object of intense research for achieving optimal functionality and integration within host surrounding tissues. When cells are injected as a suspension, it could affect their survival, retention into target organ or their functionality [18,31,114]. In addition, depending on the target organ, donor hPSC-derived cells are not mature enough upon delivery and, therefore, need to complete maturation in vivo following transplantation. However, additional cues may be required, especially in a diseased tissue environment. For example, a supportive micro-structured scaffold could be associated with cells to provide a suitable environment for cell maturation or retention [3,114]. In some instances, multiple cell types may be combined to improve cell integration and functionality. This is the case when multiple cell types degenerate or when a microenvironment should be recreated [7,61,63,64,96,97,110]. Stimulation of the vascularization of the grafted hPSC-derived tissue (i.e., muscle, heart, skin) is also required for its long-term survival and integration [61,63,64,98,110,114]. First hPSC-derived clinical trials addressed the safety of “simple” systems. Additional studies are still needed to determine whether the use of more complex tissue reconstructions will go hand-in-hand with better efficiency.

Finally, cell survival is not always required to achieve functional recovery of a specific organ, suggesting that a temporary paracrine effect is sufficient to stimulate endogenous regeneration in organs that retained this potency. This is shown in the case of ischemic hearts or through the action of MSCs in acute myocardial infarction, burned skins, liver or traumatic brain injuries and many other diseases [114,131–134]. Such observations raise the question of whether cell-derived products may be sufficient for a therapeutic improvement in some specific disease conditions. Among materials released by cells, EVs hold characteristics that focus the attention of the scientific community [131,133,135].

3. Application of EVs in Regenerative Medicine

3.1. Extracellular Vesicles: Definition

Extracellular vesicles (EVs) form a heterogeneous group of double layered lipid membrane-enclosed vesicles, with distinct biophysical properties and functions both in physiology and under pathological conditions [136]. They have emerged as important mediators of intercellular communication due to their ability to shuttle a variety of nucleic acids (including mRNAs, miRNAs), proteins, and lipids between cells (Figure 1) [137–139]. EVs can transmit information to target cells through different mechanisms. First, the mere interaction of EVs with surface molecules on the cell membrane can trigger intracellular signaling cascades, without delivery of their content. EVs can also fuse with acceptor cells to

release their cargo, either by direct fusion with the cell membrane, phagocytosis or through a variety of endocytic pathways, including clathrin- and caveolin-mediated endocytosis, macropinocytosis, micropinocytosis, and lipid raft-mediated internalization [140,141].

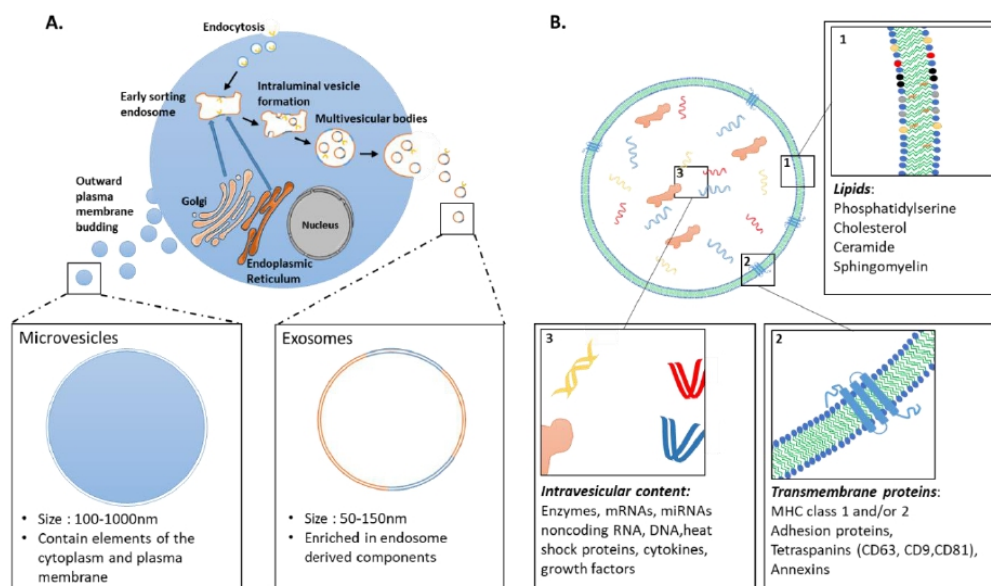


Figure 1. Biogenesis and general composition of EVs. (A) Scheme describing the biogenesis of EVs: Microvesicles are produced via the outward budding of the plasma membrane whereas exosomes arise from the fusion of multivesicular bodies with the plasma membrane. Early sorting endosomes receive materials from endoplasmic reticulum, golgi and the endocytic pathway. Multivesicular bodies are generated through the formation of intraluminal vesicles in the late sorting endosome. (B) Illustration of nucleic acids, proteins and lipids that can be present in EVs (this list is not exhaustive). Exact nature of EV cargo depends on the cell type, culture conditions (i.e., stress) and pathological state.

EVs are categorized into three major classes based on their biogenesis: (i) Exosomes are formed by the endocytic pathway through invagination of the endosomal membrane, which ultimately forms multivesicular bodies (MVBs; Figure 1). Upon the fusion of MVBs with the plasma membrane, exosomes are released into the extracellular environment. (ii) Microvesicles are shed directly by outward vesicle budding of the plasma membrane. Exosomes are typically 50–150 nm, whereas microvesicles are 100–1000 nm in size. (iii) Apoptotic bodies (size over 500 nm) are formed by blebbing of the plasma membrane of cells undergoing apoptosis. Recently updated guidelines of the International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) recommend use of the term extracellular vesicle as “the generic term for particles naturally released from the cell that are delimited by a lipid bilayer and cannot replicate” [142]. Unless authors are able to assign an EV to a particular biogenesis pathway, with appropriate characterization of subcellular origin, the term EV should be used exclusively. Indeed, much overlap has been present in the literature with the term “exosome” used interchangeably with “extracellular vesicle” in many studies. For the sake of clarity and coherence, we chose here to refer to them as EVs.

3.2. Clinical Trials Using EVs

In recent years, a growing body of studies suggests that EVs might hold remarkable potential as therapeutics, either as active agents or delivery systems. EVs are primarily being developed as tools for anti-tumor/immunomodulatory therapies, drug delivery, and regenerative therapies [143]. In addition, EVs are extensively studied in the probing of pathophysiological states of the host as potential biomarkers in biological fluids for the

diagnosis and monitoring of various diseases [144]. An increasing number of ongoing, planned or completed clinical trials have been undertaken in recent years. In order to evaluate the use of EVs in translational clinical trials, we searched for the keywords “exosomes”, “extracellular vesicles” or “microvesicles” on the [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) website. Results are presented for each EV subpopulation in relation with the disease context and source of EVs (Figure 2).

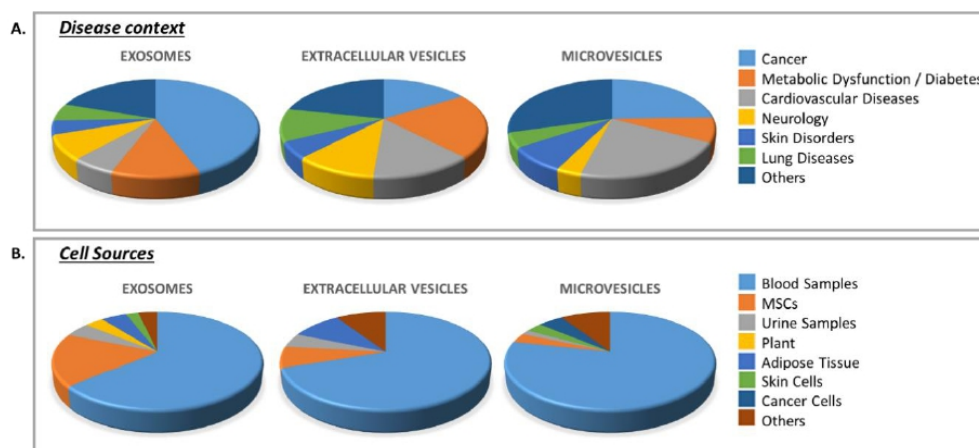


Figure 2. Planned or initiated clinical trials based on EVs. Diagrams representing the proportion of clinical trials targeting a group of diseases (A) or using a specific EV source (as biomarker or therapeutic); (B). These diagrams were obtained following a database search on the [Clinicaltrial.gov](https://clinicaltrials.gov) website with indicated search terms (exosomes, extracellular vesicles, microvesicles). The majority of clinical trials use EVs as biomarkers from the blood or urine.

So far, most of the studies have investigated the use of EVs as reliable biomarkers in biological fluids, such as blood and urine, for diagnostic and prognostic. The immunomodulatory properties of EVs from dendritic and tumor cells are also being explored as cell-free anti-tumor agents. Promising results have been obtained in phase I and II clinical studies (reviewed in [145]). A phase II clinical trial (NCT01159288) evaluated the therapeutic potential of dendritic cell (DC)-derived EVs loaded with major histocompatibility complex (MHC) class I- and class II-restricted cancer antigens as maintenance immunotherapy after induction chemotherapy in patients bearing inoperable non-small cell lung cancer (NSCLC) [146]. This phase II trial showed that DC-derived EVs exerted NK cell effector functions in patients with advanced NSCLC, boosting the NK arm of antitumor immunity.

Recent attention has focused on the potential interest of EVs as therapeutic tools for acellular regenerative medicine. Thirty interventional clinical trials are based on the use of EVs for therapeutic purpose (Table S1). Only 16 of them are specifically evaluating the therapeutic efficacy and safety of stem-cell derived EVs in patients. Of note, none of these trials use EVs from either hPSCs or hPSC derivatives and the vast majority of them are based on MSCs. For example, a phase I clinical trial aims at studying the therapeutic potentials of condition medium from MSCs in wound healing on patients with chronic skin ulcer (NCT04134676). Similarly, a phase I/II trial uses MSC-derived EVs from normal donors to improve cutaneous wound healing of skin lesions in Epidermolysis Bullosa (EB) patients (NCT04173650). The safety and efficacy of MSC-derived EVs is also being investigated in a phase I clinical trial to promote functional recovery of large and refractory macular holes (NCT03437759). To date, none of these trials has published results yet.

3.3. EVs as Potential Therapeutic Tools: Selected Examples

Increasing evidence suggests that EVs could recapitulate the beneficial effect of their parental cells in a number of applications. To draw a parallel with our previous section,

we will focus here on the recent developments obtained with EVs as a therapeutic tool for diseases affecting the eye, skin, heart and skeletal muscle. We also explore how to integrate cell-based and acellular therapies to take advantages of these two approaches and potentiate therapeutic results (Figure 3B).

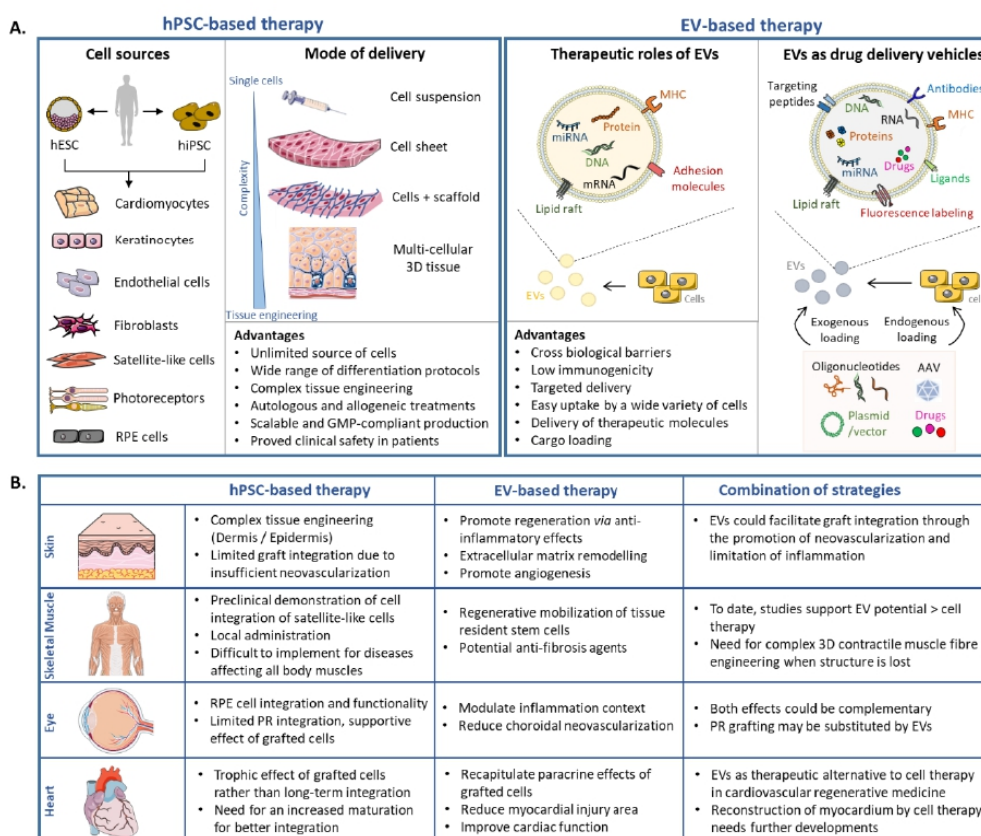


Figure 3. Disease-specific regenerative medicine strategy: toward tailored approaches. (A) Source material, mode of delivery and advantages of EV and hPSC-based therapies. (B) Therapeutic effects of EVs and cell therapies in preclinical animal models for selected organs (eye, skin, heart, skeletal muscle) and expected cumulative effects.

Of note, studies described herein include, but are not limited to, PSCs and derivatives. Indeed, EVs from cells with well-described paracrine actions, for example, MSCs, have been shown to exert beneficial effects in various applications. Depending on the disease and affected tissue, the therapeutic potential of EVs should therefore be examined from a variety of cell sources.

3.3.1. Tissue Restoration in the Eye

Therapeutic effects of EVs have been evaluated for RP, AMD, and following injuries to the eye. Most of these studies focused on the potential of EVs to limit inflammation that would otherwise trigger the death of retinal cells [147].

As previously mentioned, different studies have started to reveal that the presence of cells might not be required to generate a beneficial effect. As an example, subretinal implantation of human neural progenitor cells preserved the vision of a model of RP through a paracrine effect [148]. The same effect is elicited by human fetal retinal progenitor cells in rats modeling RP and human patients [149,150]. As these transplantations were

performed before PR degeneration, a replacement of dead cells was clearly not expected. Building on this, EVs derived from neural progenitor cells were injected subretinally in rats modeling RP before vision loss [151]. Following a single injection, the visual function and PR survival was temporarily improved (up to 28 days post-surgery). EVs were mostly internalized by Iba1+ microglial cells that had migrated from the inner retina to the subretinal space. EVs induced the downregulation of pro-inflammatory cytokines and inhibited microglia, whose suppressed activation is involved in PR survival in RP [152].

A choroidal neovascularization (CNV) is characteristic in wet AMD and can be induced in vivo with laser injuries in rodent (laser-induced CNV model). Human umbilical cord blood MSC (hUCMSC)-derived EVs injected once intravitreally were sufficient to reduce vessel leakage and the development of CNV via downregulation of *VEGF-A* [153]. Preservation of retinal functions and suppression of inflammation is equivalent when MSCs or their EVs are injected intravitreally [154]. In the same vein, retinal astroglial cell-derived EVs inhibited laser-induced CNV in mice when injected daily through the subtenon route for 7 days [155]. Interestingly, injections of EVs derived from RPE cells did not recapitulate these results [155]. Retinal neovascularization was also observed following oxygen-induced retinopathy in mice. The injection of EVs derived from hMSCs cultured under hypoxic conditions also reduced neovascularization [156].

Therefore, EVs are able to modulate retinal degeneration via the inflammatory response. This function is similar to transplanted cells, suggesting that the action of transplanted cells is likely through a paracrine effect (i.e., MSCs, retinal astroglial cells, human neural progenitors). An important point raised by these studies is that EVs or their parental cells need to be delivered at an early stage before complete degeneration. As EVs may not need complex surgeries or immunosuppression, it could be envisioned as a first line of treatment to support retinal survival and delay the requirement for a cell-based intervention. Future preclinical studies need however to determine a delivery route that allows repeated injections for long-term efficiency.

In the context of an advanced RPE cell degeneration as in late AMD, EVs may not be sufficient to recapitulate all RPE functions in order to preserve surrounding retina. Thus, endogenous RPE may be replaced through cell therapy (Figure 3A). A patch of RPE cells could be proposed as an ideal therapeutic substrate, using supporting scaffolds made of polymers or of biological composition. As EVs modulate inflammation during retinal degeneration, it should be determined whether a combined approach of RPE transplantation and EV therapy may improve visual outcomes. This is particularly true as RPE-derived EVs are not able to reduce the CNV when compared to EVs derived from paracrine-acting cells [155]. Such combined approaches may be of interest for multi-factorial diseases like AMD and may also preserve grafted cells from degeneration (Figure 3B).

Another potential EV therapy is related to PR transplantation studies for RP. Early studies showed the feasibility of transplanting post-mitotic PR precursors that achieved some degree of integration into the host mouse retina, ultimately resulting in partial visual function recovery [42,157–159]. The vast majority of transplanted PR precursors were later found to remain in the subretinal space where they engaged in a process of material transfer of functional proteins with host PRs [43–45,160,161]. The precise mechanism of this material exchange between PRs remains elusive but preclinical studies clearly demonstrated that this exchange occurs only with donor PR precursors and not with other cell types [7,160]. It could involve direct donor/host plasma membrane fusion or other methods of intercellular trafficking including EVs [162]. Therefore, it should be determined whether EVs secreted from PR precursors could recapitulate partial visual recovery obtained with PR precursors. If similar results were obtained, it would be an attractive strategy to preserve endogenous PRs without the need of cell grafting and all associated constraints (i.e., surgery, immunosuppression). When PRs have already degenerated, replacement strategies with PRs susceptible to integrate into the host retina will still be required. As discussed earlier, micro-structured scaffolds and/or addition of RPE cells could improve integration and structuration.

Taking advantage of EV ability to carry nucleic acids, they could be used as vehicles in gene therapy strategies for RP [9]. As an example, EV-associated AAV2 vector was delivered to the retina and outperformed conventional AAV2 [163]. Interestingly, these EV-AAV2 served as a robust gene delivery tool in the inner nuclear/outer plexiform and the outer nuclear layer, targeting retinal ganglion cells, bipolar cells, Müller cells as well as PRs [163]. The natural ability of EVs to deliver bioactive nucleic acids to multiple layers in the inner retina suggests that cell-free EV therapies may also benefit other traumatic or neurodegenerative ocular diseases [164].

3.3.2. Cutaneous Wound Healing

Major skin injuries, resulting from extensive burns, infection or trauma, require medical interventions to heal properly [54]. Therapeutic strategies aim at facilitating the 4 phases of cutaneous wound healing—homeostasis, inflammation, proliferation, remodeling—to accelerate wound repair and regeneration [165]. Molecular and cellular events in these phases are tightly coordinated and many cell types interact with each other in a highly coordinated sequence to restore the damaged tissue [166].

EVs hold the potential to promote all phases of wound healing and facilitate skin regeneration (reviewed in [166,167]). Transition from inflammatory to proliferative phase is a key step for successful wound healing. During the early stages of inflammation, the vast majority of macrophages differentiate towards a pro-inflammatory (M1) phenotype. As the wound matures, the ratio switches to an M2 phenotype that promotes tissue remodeling and wound healing [168]. EVs obtained from lipopolysaccharide-preconditioned MSCs could convert M1 macrophage polarization to an M2 phenotype, which alleviated inflammation, and enhanced diabetic cutaneous wound healing in rats by shuttling let-7b miRNA [169]. Similarly, MSC-derived EVs promoted cutaneous wound healing in mice by regulating macrophage polarization through miR-223 [170]. In line with these results, hUCMSCs significantly decreased the number of inflammatory cells and pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1, IL-6 levels while increasing the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in wounds of severe burn rats [171]. The same team later found that miR-181c expression in hUCMSC-derived EVs reduced burn-induced excessive inflammation by downregulating the TLR4 signaling pathway [172].

During the proliferative phase, re-epithelization, wound contraction and angiogenesis are essential processes for the restoration of normal tissue architecture. Early recruitment of resident keratinocytes and fibroblasts is particularly important as abnormalities in the intercellular epidermal-dermal crosstalk impairs the skin repair efficiency [173]. In this context, EVs from both fetal and adult stem cell sources can improve migration and proliferation of both fibroblasts and keratinocytes [174–183]. EVs from hUCMSCs and MSCs activate signaling pathways important in wound healing, including RAC-alpha serine/threonine-protein kinase (AKT) pathway [174,177,184] and Notch signaling [182]. Increased phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK)-1/2 [175,180,184] and inhibition of phosphatase and tensin homolog (PTEN) [184] have also been reported. Additionally, an increased extracellular matrix (ECM) deposition by fibroblasts has been observed, facilitating wound contraction. Indeed, fibroblasts increased collagen I and III production following systemic administration of MSC-derived EVs at wound sites in a mice full-thickness wound model [176]. Similar results were obtained with EVs derived from hiPSC-MSCs [185] and hUCMSCs [186]. Human adipose MSCs-derived EVs also prevented the differentiation of fibroblasts into myofibroblasts, increased the ratio of transforming growth factor- β 3 (TGF- β 3) to TGF- β 1 and upregulated the matrix metalloproteinases-3 (MMP3) expression of skin dermal fibroblasts through the activation of ERK/MAPK pathway [187]. As such, EVs could be used to promote extracellular matrix remodeling and reduce scar formation.

Transplantation of cellular skin substitutes have shown considerable potential to treat both acute and chronic wounds [58]. Complex multicellular 3D models are being developed with the goal of making engineered tissues similar to their natural counterpart (Figure 3A;

reviewed in [59]). However, there is still an urgent need for improving the vascularization of these substitutes to prevent necrosis and provide better long-term function and integration in clinical practice. This is doubly important as patients with chronic skin wounds usually present defects in the angiogenesis process, which consequently leads to delayed wound healing. One possibility would be the use of pre-vascularized skin substitutes that combine dermal fibroblasts, endothelial cells, and epidermal keratinocytes [63,65,66,188]. An alternative strategy would be to supplement dermo-epidermal skin grafts with EVs conveying pro-angiogenic signals to activate tissue-resident endothelial progenitor cells (Figure 3B). Indeed, exogenous EVs were shown to promote local angiogenesis in murine models of wound healing [185,189,190]. For example, EVs derived from hUCMSC, hiPSC-MSC and human urine-derived stem cells (USC) enhanced in vitro endothelial cell proliferation, migration, and tube formation [178,185,191]. HUCMSC-derived EVs promoted angiogenesis in vivo to repair deep second-degree burn injury by delivering Wnt4 and activating Wnt/B-catenin signaling in endothelial cells [191]. EVs derived from human umbilical cord blood enriched in miR-21-3p promoted the proliferation and migration of fibroblasts as well as enhanced the angiogenic activities of endothelial cells in a full-thickness skin wound mice model, thus accelerating re-epithelialization and cutaneous wound healing [184]. Similarly, EVs derived from hiPSC-MSC applied to wound sites in a full-thickness skin defect rat model promoted not only the generation of newly formed vessels, but also accelerated their maturation [185]. In another study, human USC-derived EVs markedly enhanced the generation of newly formed blood vessels in diabetic mice, in part via the transfer of pro-angiogenic protein deleted in malignant brain tumors 1 (DMBT1) [178]. Alternatively, EVs derived from hESC facilitated pressure ulcer healing by reducing endothelial senescence and promoting local angiogenesis at wound site in aged mice [190].

At present, one of the main obstacles in the treatment of skin wounds is achieving healing over time, particularly in patients with underlying skin disorders. Biomaterial-based wound dressings could be loaded with EVs to achieve sustained release to the wound sites [192,193]. For instance, Tao et al. used the polymer chitosan to prolong delivery of EVs derived from miR-126-3p-overexpressing synovium MSCs to diabetic wounds [193]. They tested this system in a diabetic rat model and found that it increased formation of granulation tissue, which provides a scaffold for the assembly of neighboring cells at wound margins, along with angiogenesis [193].

Overall, all these proofs-of-concept experiments raised considerable interest of EVs for skin repair. Of interest, their delivery to skin wounds is relatively simple due to easy access and could be sustained over time by the use of biomaterial or repeated topical applications. However, additional preclinical studies are needed to evaluate the synergic effects of combined acellular and cellular strategies.

3.3.3. Heart

EVs have been investigated as promising therapeutic options for various cardiac diseases such as ischemic heart diseases and myocardial infarctions. One of the main objectives is to promote vascular repair mechanisms to reduce myocardial injury that would lead to cell death and therefore improve cardiac functions.

hESC-derived MSC conditioned medium (hESC-MSC-CoM), collected with clinically compatible processes, were shown to contain factors susceptible to modulate cardiovascular-related pathways [194]. Administration of hESC-MSC-CoM recapitulated the benefit of hESC-MSC injections in a context of post-myocardial infarction [195]. Indeed, in a porcine model of myocardial infarction, hESC-MSC-CoM intravenous treatment for 7 days enhanced capillary density, reduced the myocardial infarct size and preserved systolic and diastolic functions [195]. In addition, hESC-MSC-CoM reduced myocardial apoptosis and oxidative stress in another porcine model of ischemia and reperfusion injury [196]. This hESC-MSC-CoM contained large particles of 50–100 nm that were purified and characterized as EVs [197]. hESC-MSC-derived EVs similarly diminished the infarct size in an ex vivo mouse model of myocardial ischemia and reperfusion injury.

It was also proposed that ESC-derived EVs could stimulate endogenous myocardial regeneration [198]. Their delivery via an intramyocardial route following mouse myocardial infarction stimulated endogenous repair (i.e., revascularization, cardiomyocyte proliferation/survival and reduced fibrosis). Interestingly, fibroblasts-derived EVs did not improve cardiac functions when compared to ESC-derived EVs in this model, highlighting differences between EV sources.

The functionality of cells from the cardiac lineage is superior to MSCs in the different heart disease models [199,200]. Therefore, EVs derived from these cells might achieve the most efficient heart recovery. Indeed, hPSC-CM-derived EVs recapitulated the therapeutic effects of their parental cells in the mouse model of chronic heart failure [201]. In this study, EVs or their parental cells were delivered once intramyocardially. Gene expression profiling identified 927 genes similarly upregulated in hearts treated with hPSC-CM-derived EVs and their parental cells as compared to control. The majority of enriched biological processes associated with these genes were predicted to improve heart regeneration and decrease fibrosis [201]. A recent study further highlighted the importance of determining which cellular source is the best candidate to produce therapeutic EVs. While both hPSC- and hPSC-CM-derived EVs protected CMs from hypoxia *in vitro*, only hPSC-CM-derived EVs completely improved the hypoxia-induced phenotype [202].

In order to maintain a sustained delivery, hPSC-CM-derived EVs were loaded into a collagen-based hydrogel patch [202]. Such system allows the release of EVs during 21 days *in vitro*. Patches loaded with EVs were implanted directly into the myocardium following an ischemic insult in a rat model of acute myocardial infarction. Rats recovered with this treatment, with improved heart contractile function and a reduction of the infarct size [202].

Overall, recent results indicate that EVs recapitulate the beneficial effects of their parental cells in the treatment of heart diseases (Figure 3B). Importantly, overall complexity associated with cell manufacturing, graft survival and patient immunosuppression are bypassed by this strategy. Future studies are nevertheless required to validate sustained EV release in large animal models as well as reproducibility across hPSC-CM-derived EV production protocols.

3.3.4. Skeletal Muscle

Severe muscle injuries and genetic defects like muscular dystrophies cause myofiber death. Spontaneous reparation to regenerate skeletal myofibers do occur but are insufficient [203]. A central goal of therapeutic approaches is to re-establish the muscle structural integrity and functionality by re-populating the satellite cell niche, promoting vascularization while inhibiting fibrosis formation, and stimulating the formation of contractile muscle fibers [100]. Several cellular candidates with myogenic or non-myogenic origins have been proposed for skeletal muscle regeneration, and their transplantation has been a widely investigated therapeutic strategy [100]. However, the massive donor cell death and cellular dispersion observed after delivery of cells via injection limit their therapeutic potential. Cell therapy products are still a long way from being able to reconstruct the muscle architecture, let alone to reconstruct it with nerve and sufficient vascularization. Overall, cell therapy could be considered for small muscles but is difficult to implement for diseases affecting all body muscles.

A mounting body of evidence suggests that EVs are actively produced by skeletal muscles cells and contribute to muscle repair and regeneration [203]. For example, EVs secreted during the differentiation of human skeletal myoblasts (HsKM) into myotubes contain specific biochemical cues that promote and regulate the myogenic differentiation of human adipose-derived stem cells (HASCs) [204]. Treatment of lacerated muscle sites with these differentiating HsKM-derived EVs led to an improved muscle regeneration with a large number of regenerative myofibers associated to minimal fibrosis compared to the control group [204]. In addition to the facilitation of myofiber repair, EVs also attenuate excessive ECM deposition for optimal muscle remodeling. In muscular dystrophies and severe muscle injuries, fibrogenic cells are overactivated and hyperproliferate, leading to

the substitution of skeletal muscle with nonfunctional fibrotic tissue [205]. This excessive accumulation of extracellular matrix components not only alters muscle function but also reduces the amount of tissue available for therapy and repair. Establishing new anti-fibrotic therapeutic strategies is one of the major clinical options to improve muscle function in patients. In response to hypertrophic stimuli, satellite cells give rise to myogenic progenitor cells (MPCs) able to secrete EVs containing miR-206, which represses cell collagen expression through ribosomal binding protein 1 (Rbp1) by neighboring fibroblasts, thus preventing excessive ECM deposition [206]. Similarly, fibroblasts derived from muscle biopsies of DMD patients secreted exosomes with increased levels of miR199a-5p, causing increased fibrosis in skeletal muscle and surrounding matrix [207]. These data indicate that EVs could be of interest as potential anti-fibrotic agents.

EVs are also evaluated as potential therapeutic agents to counteract muscle wasting and skeletal muscle dysfunction. Chronic kidney disease (CKD), which ultimately leads to end-stage renal failure, often leads to muscle wasting. Intramuscular injection of EV-encapsulated miR29, previously shown to have anti-fibrotic activity, could attenuate UUU-induced body weight loss and muscle atrophy [208]. Similar results were obtained after injection of EV-miR26a in CKD mice [209]. DMD is a heritable myodegenerative disease characterized by the absence of functional dystrophin leading to progressive muscle weakness and degeneration. Recent data suggest that a treatment with EVs from cardiosphere-derived cells (CDCs) originally targeted at DMD cardiomyopathy could potentially benefit both cardiac and skeletal muscle [210]. CDC-derived EVs injected into the soleus of mdx mouse model of DMD enhanced muscle regeneration, decreased inflammation and fibrosis, allowing complete restoration of contractile forces. More surprisingly, detectable levels of full-length dystrophin were evident in the diaphragm and soleus up to three weeks after systemic CDC-derived EV delivery [210]. Dystrophin protein and transcript were undetectable in CDC-derived EVs. Moreover, analysis of exon-intron junctions for dystrophins transcripts after CDC-derived EV treatment showed no exon skipping or alternative splicing. However, RNA-seq of CDC-EVs revealed a 144-fold increase in miR-148a. Intramyocardial injection of miR-148a restored expression of dystrophin in mdx hearts 3 weeks after administration, implicating this miRNA as a potential mediator of enhanced full-length dystrophin protein synthesis [210]. Targeting EV-derived miRNAs appears as a promising strategy to improve muscle function [211].

Finally, EVs could be used as efficient delivery tools of functional cargoes in vivo to restore expression of missing proteins in patients. For example, Gao et al. demonstrated that systemic administration of exosomes loaded with CP05-conjugated dystrophin splice increased dystrophin protein expression in dystrophin-deficient mdx mice with functional improvements [212].

It has become clear that EVs enable intercellular signaling that facilitate myofiber regeneration, limit excessive ECM deposits and improve muscle functions. More strikingly, their systemic delivery improves muscle function in diseases like DMD or CDK. Future studies are now required to characterize their biogenesis, compositions and biological activities on recipient cells in both physiological and pathophysiological conditions to determine whether they might be envisioned for therapy [213].

3.4. Challenges

As discussed, some of the benefits observed with cell therapy are likely due to paracrine effects that can be recapitulated by EVs derived from these cells, rather than long-term engraftment and survival of transplanted cells [214]. Overall, EVs and grafted cells can elicit different outcomes according to the target organ (Figure 3B). In some instances, therapeutic effects could be similar and therefore, EV therapy may have the highest benefice/risk ratio. In other instances, both therapies are complementary and a combination of both may achieve the best therapeutic effects.

Despite their promising roles, several challenges associated with EVs as acellular therapy products still need to be overcome.

3.4.1. Manufacturing EVs: Considerations

As products of cells, the identity and functions of EVs are directly correlated to their cell source. Consequently, it is essential to identify the most appropriate cell source for EV production [9]. As illustrated in Section 3.3, studies have identified a growing list of cell sources, some being more relevant than others, that could be suitable in acellular approaches for regenerative medicine. Our capacity to decipher in depth the various mechanisms by which EVs mediate biological and regenerative functions will be determinant to identify the best candidates in the future. It is also crucial to optimize the upstream processing conditions to increase the notably low EV yields [215]. Finding the optimal conditions for EV production by a specific cell type remains a challenge. Indeed, it is always a compromise between optimal conditions for growth and phenotype and those for EV production and isolation [216]. This is particularly true for the protocols that rely on the induction of a cell stress to obtain specific EVs (for example, hypoxia [156]).

Another challenge is the development of robust procedures to isolate and purify EVs with high yield and purity while preserving their structure and activity [215]. As with GMP-compliant cell manufacturing, large quantities of EVs should be produced with defined medium conditions, devoid as much as possible of xenogeneic substances and serum-derived vesicles, which otherwise have a high risk of contaminating the isolated EV sample [9]. Of note, while EVs secreted by cells cultured in serum-free conditions did not exhibit significant biophysical or size differences compared with cells cultured with serum, the expression levels of certain vesicular proteins (e.g., small GTPases, G-protein complexes, mRNA processing proteins and splicing factors) were found differentially expressed in EVs [217]. The use of commercial exosome-depleted fetal bovine serum (FBS) is another alternative to serum-free conditions. However, they are obtained by various exosome-reduction means, with each inducing their own effect upon the serum constituents and characteristics [218]. Alternatively, cells could be cultured during the EV release period with medium that has been pre-depleted of EVs [142]. However, FBS-derived EV elimination protocols have profound impacts on the cells themselves as they were shown to decrease cell growth and survival-promoting effects of FBS [219,220].

EVs are isolated from a variety of different sources, including body fluids with highly variable compositions (e.g., plasma, milk, urine, saliva) and cell culture media [221]. Importantly, the non-EV contaminants found in EV preparations differ substantially depending on their source. Specific EV isolation procedures should, therefore, be carefully determined accordingly to the starting material [221]. So far, there is no consensus on a “gold standard” technology to isolate EVs, for either therapeutic application or basic research [222,223]. Differential centrifugation/ultracentrifugation, polymer-based precipitation and density-gradient centrifugation are the most commonly used techniques but have very limited scalability and are associated with low EV recovery, disruption of EV integrity and risk of undesirable co-isolation of contaminants [9,136,223–225].

To purify EVs in a GMP-grade scalable manner, studies have employed ultrafiltration or tangential flow filtration (TFF) to concentrate EVs based on their size [226–229]. For example, GMP-EV-cardiac progenitor cell manufacturing was implemented for up to 8 L of conditioned medium, allowing high final product yield ($\geq 58\%$) with concomitant consistent reduction of contaminants (total protein removal 97–98%) [228]. Subsequent size exclusion chromatography (SEC) allows the separation of EVs from other media components without altering their integrity [227,229–231]. However, size-based isolation techniques do not purify a specific EV subpopulation but rather yield complex mixtures because of the overlap in size of EVs (described in Section 3.1; [232]). Additional purification steps may also still be necessary to remove contaminants with overlapping sizes, such as bovine serum-EVs. Recently, alternative isolation techniques based on EV-surface markers have been described and seem to be promising but still in infancy [233,234]. Overall, existing techniques to isolate EVs do not have a one-size-fits-all model. The optimal isolation method(s) and acceptable level of impurity need to be carefully considered to

prevent loss of function due to damage to EV-intrinsic effectors or loss of associated factors that act with EVs to exert function [142,143,221].

As with cells and other cell-derived products, maintenance of EV biological activity during storage is critical for their therapeutic use [235]. Stability should rely on the monitoring of both changes in physicochemical parameters (size, particle concentration, and morphology) and EV bioactivity. A number of studies have evaluated the impact of different storage temperatures (4, −20, and −80 °C) and repetitive free-thaw cycles on the composition and functionality of EVs isolated from various body fluids (reviewed in [235,236]). Current evidences suggest that storage at −80 °C is best-suited. Nonetheless, our current understanding of storage-mediated effects is still limited and standard criterion of EV preservation should be established in the future.

3.4.2. EV-Based Therapeutics: Regulatory Aspects

Current legislation does not provide specific regulatory guidelines for EV-based therapies. In the European Union (EU) and United States of America, they enter in the framework of the biological medicinal products regulation under the definition of “biological medicine” (i.e., a medicine that contains one or more active substances made by or derived from a biological cell) [222]. The pharmaceutical classification of any biological product is determined by its active substance(s). In that regard, EV-based therapeutics are particularly challenging as it is not clear in many cases whether the biological effect depends on the vesicle internal content (EV-associated cargo), the vesicle membranes, or a combination of both [143]. As such, they share characteristics from both cell and gene therapies, which makes them difficult to classify in an existing pharmaceutical category.

Three subcategories of EV products are possible, each with specific regulatory guidance: 1/native EVs from unmodified cells, 2/EVs from genetically manipulated cells which do not contain transgene products, and 3/EVs from genetically modified cells containing transgene products [222]. In addition to the existing guidance on the manufacture of biological medicinal products, safety and quality standards for tissue- or cell-based products (DIRECTIVE 2004/23/EC and DIRECTIVE 2006/17/EC in the EU) may serve as roadmaps for EV-based therapeutics derived from human tissues and cells [222].

Stem cell therapy and tissue engineering are intimately intertwined in the development of regenerative medicine products. In recent years, research has focused on the use of biocompatible scaffolds functionalized with EVs, with or without cells, to improve regenerative capacity of the grafted products. Regulatory strategies for advanced therapy medicinal products (ATMPs)—encompassing gene therapy, somatic cell therapy, and tissue-engineered products—could be applied to such complex EV-based products (DIRECTIVE 2001/83/EC). EVs produced by genetically modified cells with biologically active transgene products could also fall within this subcategory [143]. Of note, EVs are considered as an excipient instead of an active substance when used as drug delivery systems loaded with molecules.

4. Conclusions

As outlined in this review, a number of key steps to develop regenerative therapies has been achieved. Preclinical evidences for many indications were the basis for first-in-man clinical trials. Main concerns related to the use of hPSCs were ruled out in clinical trials (i.e., risks of teratoma formation and cell dispersion). So far, simplified cell therapy systems have been used with some promising therapeutic results. However, preclinical evidences highlight the need for more complex cell therapy products containing various cells and/or biomaterials, structured as the native tissue. In parallel, the roles played by EVs as intercellular effectors of paracrine signaling has led to a strong interest in their use as cell-free therapeutic products to stimulate endogenous factors that would limit cell death or improve tissue regeneration. Strikingly, as these two strategies could act at different levels depending on the pathological context, their complementarity opens new perspectives to maximize therapeutic outcomes. EVs could be substituted to cell therapy in a number of

indications including heart diseases, simplifying treatment complexity. However, much preclinical work is still required to characterize optimal “acellular” and cellular therapies and their potential synergistic effects. In addition, definition of appropriate conditions of GMP production need to be elaborated and customized for each application. All these future improvements may help to achieve the ultimate goal of regenerative medicine: the replacement of a degenerated tissue.

5. Patents

WH, CM and KB are inventors of a patent (FR3078712) related to medical devices for the preparation of retinal tissues for regenerative medicine. LM, CM and KB are inventors of a pending patent related to the automated differentiation of hPSC into RPE cells (EP3754014). LM and CB are inventors of a pending patent related to the automated differentiation of hPSC into keratinocytes (EP20305217.0). SD and CB are inventors of two pending patents related to the differentiation of hPSCs into keratinocytes (EP20305218.0) and fibroblasts (EP 20305214.7) and to the formation of a skin substitute composed of hPSCs derived cells (EP 20305213.9). AD and CB are inventors of a pending patent related to the differentiation of hPSCs into endothelial cells (EP 20305215.4).

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/2/240/s1>, Table S1: List of planned or initiated clinical trials using EVs as therapeutics.

Author Contributions: All authors contributed to the manuscript writing and approved the final version. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by a grant from the ANR (RebuildingRETINA: ANR-19-CE18-0004) to KB. EH and SM are recipient of PhD fellowships from the French Ministry of Higher Education and Research. I-Stem is part of the Biotherapies Institute for Rare Diseases supported by the Association Française contre les Myopathies-Téléthon.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Some elements of figures were created using Servier Medical Art templates (<https://smart.servier.com>), which are licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.

Conflicts of Interest: CB collaborates with the company URGO to develop cell therapy products. The other authors declare no conflict of interest.

References

1. Kobold, S.; Guhr, A.; Mah, N.; Bultjer, N.; Seltmann, S.; Seiler Wulczyn, A.E.M.; Stacey, G.; Jie, H.; Liu, W.; Loser, P.; et al. A Manually Curated Database on Clinical Studies Involving Cell Products Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rep.* **2020**, *15*, 546–555. [[CrossRef](#)]
2. Schwartz, S.D.; Hubschman, J.P.; Heilwell, G.; Franco-Cardenas, V.; Pan, C.K.; Ostrick, R.M.; Mickunas, E.; Gay, R.; Klimanskaya, I.; Lanza, R. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: A preliminary report. *Lancet* **2012**, *379*, 713–720. [[CrossRef](#)]
3. Ben M'Barek, K.; Monville, C. Cell Therapy for Retinal Dystrophies: From Cell Suspension Formulation to Complex Retinal Tissue Bioengineering. *Stem Cells Int.* **2019**, *2019*, 4568979. [[CrossRef](#)]
4. Ghareeb, A.E.; Lako, M.; Steel, D.H. Coculture techniques for modeling retinal development and disease, and enabling regenerative medicine. *Stem Cells Transl. Med.* **2020**, *9*, 1531–1548. [[CrossRef](#)]
5. Sun, B.K.; Siphraashvili, Z.; Khavari, P.A. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science* **2014**, *346*, 941–945. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Sun, J.; Mandai, M.; Kamao, H.; Hashiguchi, T.; Shikamura, M.; Kawamata, S.; Sugita, S.; Takahashi, M. Protective Effects of Human iPSC-Derived Retinal Pigmented Epithelial Cells in Comparison with Human Mesenchymal Stromal Cells and Human Neural Stem Cells on the Degenerating Retina in rd1 mice. *Stem Cells* **2015**, *33*, 1543–1553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Morizur, L.; Herardot, E.; Monville, C.; Ben M'Barek, K. Human pluripotent stem cells: A toolbox to understand and treat retinal degeneration. *Mol. Cell Neurosci.* **2020**, *107*, 103523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Hargett, L.A.; Bauer, N.N. On the origin of microparticles: From “platelet dust” to mediators of intercellular communication. *Pulm. Circ.* **2013**, *3*, 329–340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

9. Wiklander, O.P.B.; Brennan, M.A.; Lotvall, J.; Breakefield, X.O.; El Andaloussi, S. Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles. *Sci. Transl. Med.* **2019**, *11*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. S, E.L.A.; Mager, I.; Breakefield, X.O.; Wood, M.J. Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 347–357. [[CrossRef](#)]
11. Bachoud-Levi, A.C.; Perrier, A.L. Regenerative medicine in Huntington's disease: Current status on fetal grafts and prospects for the use of pluripotent stem cell. *Rev. Neurol. (Paris)* **2014**, *170*, 749–762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Bachoud-Levi, A.C.; Massart, R.; Rosser, A. Cell therapy in Huntington's disease: Taking stock of past studies to move the field forward. *Stem Cells* **2020**. [[CrossRef](#)]
13. Nakagawa, M.; Koyanagi, M.; Tanabe, K.; Takahashi, K.; Ichisaka, T.; Aoi, T.; Okita, K.; Mochiduki, Y.; Takizawa, N.; Yamanaka, S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 101–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **2007**, *131*, 861–872. [[CrossRef](#)]
15. Thomson, J.A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S.S.; Waknitz, M.A.; Swiergiel, J.J.; Marshall, V.S.; Jones, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **1998**, *282*, 1145–1147. [[CrossRef](#)]
16. Flaxman, S.R.; Bourne, R.R.A.; Resnikoff, S.; Ackland, P.; Braithwaite, T.; Cicinelli, M.V.; Das, A.; Jonas, J.B.; Keeffe, J.; Kempen, J.H.; et al. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Health* **2017**, *5*, e1221–e1234. [[CrossRef](#)]
17. 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.* **2019**, *71*, 1–25. [[CrossRef](#)]
18. Ben M'Barek, K.; Habeler, W.; Plancheron, A.; Jarraya, M.; Regent, F.; Terray, A.; Yang, Y.; Chatrousse, L.; Domingues, S.; Masson, Y.; et al. Human ESC-derived retinal epithelial cell sheets potentiate rescue of photoreceptor cell loss in rats with retinal degeneration. *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*. [[CrossRef](#)]
19. Klimanskaya, I.; Hipp, J.; Rezai, K.A.; West, M.; Atala, A.; Lanza, R. Derivation and comparative assessment of retinal pigment epithelium from human embryonic stem cells using transcriptomics. *Cloning Stem Cells* **2004**, *6*, 217–245. [[CrossRef](#)]
20. Buchholz, D.E.; Hikita, S.T.; Rowland, T.J.; Friedrich, A.M.; Hinman, C.R.; Johnson, L.V.; Clegg, D.O. Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* **2009**, *27*, 2427–2434. [[CrossRef](#)]
21. Buchholz, D.E.; Pennington, B.O.; Croze, R.H.; Hinman, C.R.; Coffey, P.J.; Clegg, D.O. Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium. *Stem Cells Transl. Med.* **2013**, *2*, 384–393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Leach, L.L.; Buchholz, D.E.; Nadar, V.P.; Lowenstein, S.E.; Clegg, D.O. Canonical/beta-catenin Wnt pathway activation improves retinal pigmented epithelium derivation from human embryonic stem cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2015**, *56*, 1002–1013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Idelson, M.; Alper, R.; Obolensky, A.; Ben-Shushan, E.; Hemo, I.; Yachimovich-Cohen, N.; Khaner, H.; Smith, Y.; Wiser, O.; Gropp, M.; et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells. *Cell Stem Cell* **2009**, *5*, 396–408. [[CrossRef](#)]
24. Maruotti, J.; Sripathi, S.R.; Bharti, K.; Fuller, J.; Wahlin, K.J.; Ranganathan, V.; Sluch, V.M.; Berlinicke, C.A.; Davis, J.; Kim, C.; et al. Small-molecule-directed, efficient generation of retinal pigment epithelium from human pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 10950–10955. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Crombie, D.E.; Daniszewski, M.; Liang, H.H.; Kulkarni, T.; Li, F.; Lidgerwood, G.E.; Conquest, A.; Hernandez, D.; Hung, S.S.; Gill, K.P.; et al. Development of a Modular Automated System for Maintenance and Differentiation of Adherent Human Pluripotent Stem Cells. *SLAS Discov.* **2017**, *22*, 1016–1025. [[CrossRef](#)]
26. Regent, F.; Morizur, L.; Lesueur, L.; Habeler, W.; Plancheron, A.; Ben M'Barek, K.; Monville, C. Automation of human pluripotent stem cell differentiation toward retinal pigment epithelial cells for large-scale productions. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 10646. [[CrossRef](#)]
27. Matsumoto, E.; Koide, N.; Hanzawa, H.; Kiyama, M.; Ohta, M.; Kuwabara, J.; Takeda, S.; Takahashi, M. Fabricating retinal pigment epithelial cell sheets derived from human induced pluripotent stem cells in an automated closed culture system for regenerative medicine. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0212369. [[CrossRef](#)]
28. Carr, A.J.; Vugler, A.A.; Hikita, S.T.; Lawrence, J.M.; Gias, C.; Chen, L.L.; Buchholz, D.E.; Ahmado, A.; Semo, M.; Smart, M.J.; et al. Protective effects of human iPS-derived retinal pigment epithelium cell transplantation in the retinal dystrophic rat. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e8152. [[CrossRef](#)]
29. Lu, B.; Malcuit, C.; Wang, S.; Girman, S.; Francis, P.; Lemieux, L.; Lanza, R.; Lund, R. Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells* **2009**, *27*, 2126–2135. [[CrossRef](#)]
30. Lund, R.D.; Wang, S.; Klimanskaya, I.; Holmes, T.; Ramos-Kelsey, R.; Lu, B.; Girman, S.; Bischoff, N.; Sauve, Y.; Lanza, R. Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic RCS rats. *Cloning Stem Cells* **2006**, *8*, 189–199. [[CrossRef](#)]
31. Diniz, B.; Thomas, P.; Thomas, B.; Ribeiro, R.; Hu, Y.; Brant, R.; Ahuja, A.; Zhu, D.; Liu, L.; Koss, M.; et al. Subretinal implantation of retinal pigment epithelial cells derived from human embryonic stem cells: Improved survival when implanted as a monolayer. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2013**, *54*, 5087–5096. [[CrossRef](#)]
32. Sharma, R.; Khristov, V.; Rising, A.; Jha, B.S.; Dejene, R.; Hotaling, N.; Li, Y.; Stoddard, J.; Stankewicz, C.; Wan, Q.; et al. Clinical-grade stem cell-derived retinal pigment epithelium patch rescues retinal degeneration in rodents and pigs. *Sci. Transl. Med.* **2019**, *11*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Stanzel, B.V.; Liu, Z.; Somboonthanakij, S.; Wongsawad, W.; Brinken, R.; Eter, N.; Corneo, B.; Holz, F.G.; Temple, S.; Stern, J.H.; et al. Human RPE stem cells grown into polarized RPE monolayers on a polyester matrix are maintained after grafting into rabbit subretinal space. *Stem Cell Rep.* **2014**, *2*, 64–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. da Cruz, L.; Fynes, K.; Georgiadis, O.; Kerby, J.; Luo, Y.H.; Ahmado, A.; Vernon, A.; Daniels, J.T.; Nommiste, B.; Hasan, S.M.; et al. Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration. *Nat. Biotechnol.* **2018**, *36*, 328–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Fernandes, R.A.B.; Stefanini, F.R.; Falabella, P.; Koss, M.J.; Wells, T.; Diniz, B.; Ribeiro, R.; Schor, P.; Maia, M.; Penha, F.M.; et al. Development of a new tissue injector for subretinal transplantation of human embryonic stem cell derived retinal pigmented epithelium. *Int. J. Retina Vitre.* **2017**, *3*, 41. [[CrossRef](#)]
36. Ben M'Barek, K.; Bertin, S.; Brazhnikova, E.; Jaillard, C.; Habeler, W.; Plancheron, A.; Fovet, C.M.; Demilly, J.; Jarraya, M.; Bejanariu, A.; et al. Clinical-grade production and safe delivery of human ESC derived RPE sheets in primates and rodents. *Biomaterials* **2020**, *230*, 119603. [[CrossRef](#)]
37. Nakano, T.; Ando, S.; Takata, N.; Kawada, M.; Muguruma, K.; Sekiguchi, K.; Saito, K.; Yonemura, S.; Eiraku, M.; Sasai, Y. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell* **2012**, *10*, 771–785. [[CrossRef](#)]
38. Zhong, X.; Gutierrez, C.; Xue, T.; Hampton, C.; Vergara, M.N.; Cao, L.H.; Peters, A.; Park, T.S.; Zambidis, E.T.; Meyer, J.S.; et al. Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4047. [[CrossRef](#)]
39. Capowski, E.E.; Samimi, K.; Mayerl, S.J.; Phillips, M.J.; Pinilla, I.; Howden, S.E.; Saha, J.; Jansen, A.D.; Edwards, K.L.; Jager, L.D.; et al. Reproducibility and staging of 3D human retinal organoids across multiple pluripotent stem cell lines. *Development* **2019**, *146*. [[CrossRef](#)]
40. Reichman, S.; Slembrouck, A.; Gagliardi, G.; Chaffiol, A.; Terray, A.; Nanteau, C.; Potey, A.; Belle, M.; Rabesandratana, O.; Duebel, J.; et al. Generation of Storable Retinal Organoids and Retinal Pigmented Epithelium from Adherent Human iPSC Cells in Xeno-Free and Feeder-Free Conditions. *Stem Cells* **2017**, *35*, 1176–1188. [[CrossRef](#)]
41. Welby, E.; Lakowski, J.; Di Foggia, V.; Budinger, D.; Gonzalez-Cordero, A.; Lun, A.T.L.; Epstein, M.; Patel, A.; Cuevas, E.; Kruczek, K.; et al. Isolation and Comparative Transcriptome Analysis of Human Fetal and iPSC-Derived Cone Photoreceptor Cells. *Stem Cell Rep.* **2017**, *9*, 1898–1915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. MacLaren, R.E.; Pearson, R.A.; MacNeil, A.; Douglas, R.H.; Salt, T.E.; Akimoto, M.; Swaroop, A.; Sowden, J.C.; Ali, R.R. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature* **2006**, *444*, 203–207. [[CrossRef](#)]
43. Singh, M.S.; Balmer, J.; Barnard, A.R.; Aslam, S.A.; Moralli, D.; Green, C.M.; Barnea-Cramer, A.; Duncan, I.; MacLaren, R.E. Transplanted photoreceptor precursors transfer proteins to host photoreceptors by a mechanism of cytoplasmic fusion. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Santos-Ferreira, T.; Llonch, S.; Borsch, O.; Postel, K.; Haas, J.; Ader, M. Retinal transplantation of photoreceptors results in donor-host cytoplasmic exchange. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Decembrini, S.; Martin, C.; Senrlaub, F.; Chemtob, S.; Biel, M.; Samardzija, M.; Moulin, A.; Behar-Cohen, F.; Arsenijevic, Y. Cone Genesis Tracing by the Chrm4-EGFP Mouse Line: Evidences of Cellular Material Fusion after Cone Precursor Transplantation. *Mol. Ther.* **2017**, *25*, 634–653. [[CrossRef](#)]
46. Tu, H.Y.; Watanabe, T.; Shirai, H.; Yamasaki, S.; Kinoshita, M.; Matsushita, K.; Hashiguchi, T.; Onoe, H.; Matsuyama, T.; Kuwahara, A.; et al. Medium- to long-term survival and functional examination of human iPSC-derived retinas in rat and primate models of retinal degeneration. *EBioMedicine* **2019**, *39*, 562–574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Iraha, S.; Tu, H.Y.; Yamasaki, S.; Kagawa, T.; Goto, M.; Takahashi, R.; Watanabe, T.; Sugita, S.; Yonemura, S.; Sunagawa, G.A.; et al. Establishment of Immunodeficient Retinal Degeneration Model Mice and Functional Maturation of Human ESC-Derived Retinal Sheets after Transplantation. *Stem Cell Rep.* **2018**, *10*, 1059–1074. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. McLelland, B.T.; Lin, B.; Mathur, A.; Aramant, R.B.; Thomas, B.B.; Nistor, G.; Keirstead, H.S.; Seiler, M.J. Transplanted hESC-Derived Retina Organoid Sheets Differentiate, Integrate, and Improve Visual Function in Retinal Degenerate Rats. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2018**, *59*, 2586–2603. [[CrossRef](#)]
49. Jung, Y.H.; Phillips, M.J.; Lee, J.; Xie, R.; Ludwig, A.L.; Chen, G.; Zheng, Q.; Kim, T.J.; Zhang, H.; Barney, P.; et al. 3D Microstructured Scaffolds to Support Photoreceptor Polarization and Maturation. *Adv. Mater.* **2018**, *30*, e1803550. [[CrossRef](#)]
50. Worthington, K.S.; Wiley, L.A.; Kaalberg, E.E.; Collins, M.M.; Mullins, R.F.; Stone, E.M.; Tucker, B.A. Two-photon polymerization for production of human iPSC-derived retinal cell grafts. *Acta Biomater.* **2017**, *55*, 385–395. [[CrossRef](#)]
51. Thompson, J.R.; Worthington, K.S.; Green, B.J.; Mullin, N.K.; Jiao, C.; Kaalberg, E.E.; Wiley, L.A.; Han, I.C.; Russell, S.R.; Sohn, E.H.; et al. Two-photon polymerized poly(caprolactone) retinal cell delivery scaffolds and their systemic and retinal biocompatibility. *Acta Biomater.* **2019**, *94*, 204–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Singh, D.; Wang, S.B.; Xia, T.; Tainsh, L.; Ghiassi-Nejad, M.; Xu, T.; Peng, S.; Adelman, R.A.; Rizzolo, L.J. A biodegradable scaffold enhances differentiation of embryonic stem cells into a thick sheet of retinal cells. *Biomaterials* **2018**, *154*, 158–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Garita-Hernandez, M.; Lampic, M.; Chaffiol, A.; Guibbal, L.; Routet, F.; Santos-Ferreira, T.; Gasparini, S.; Borsch, O.; Gagliardi, G.; Reichman, S.; et al. Restoration of visual function by transplantation of optogenetically engineered photoreceptors. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4524. [[CrossRef](#)]

54. Chu, G.Y.; Chen, Y.F.; Chen, H.Y.; Chan, M.H.; Gau, C.S.; Weng, S.M. Stem cell therapy on skin: Mechanisms, recent advances and drug reviewing issues. *J. Food Drug Anal.* **2018**, *26*, 14–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Gurtner, G.C.; Werner, S.; Barrandon, Y.; Longaker, M.T. Wound repair and regeneration. *Nature* **2008**, *453*, 314–321. [[CrossRef](#)]
56. Przekora, A. A Concise Review on Tissue Engineered Artificial Skin Grafts for Chronic Wound Treatment: Can We Reconstruct Functional Skin Tissue In Vitro? *Cells* **2020**, *9*, 1622. [[CrossRef](#)]
57. Dai, C.; Shih, S.; Khachemoune, A. Skin substitutes for acute and chronic wound healing: An updated review. *J. Dermatolog. Treat.* **2020**, *31*, 639–648. [[CrossRef](#)]
58. Nourian Dehkordi, A.; Mirahmadi Babaheydari, F.; Chehelgerdi, M.; Raeisi Dehkordi, S. Skin tissue engineering: Wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies. *Stem Cell Res. Ther.* **2019**, *10*, 111. [[CrossRef](#)]
59. Vig, K.; Chaudhari, A.; Tripathi, S.; Dixit, S.; Sahu, R.; Pillai, S.; Dennis, V.A.; Singh, S.R. Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 789. [[CrossRef](#)]
60. Guenou, H.; Nissan, X.; Larcher, F.; Feteira, J.; Lemaitre, G.; Saidani, M.; Del Rio, M.; Barrault, C.C.; Bernard, F.X.; Peschanski, M.; et al. Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: A preclinical study. *Lancet* **2009**, *374*, 1745–1753. [[CrossRef](#)]
61. Umegaki-Arao, N.; Pasmooij, A.M.; Itoh, M.; Cerise, J.E.; Guo, Z.; Levy, B.; Gostynski, A.; Rothman, L.R.; Jonkman, M.F.; Christiano, A.M. Induced pluripotent stem cells from human revertant keratinocytes for the treatment of epidermolysis bullosa. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 264ra164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Sebastiano, V.; Zhen, H.H.; Haddad, B.; Bashkirova, E.; Melo, S.P.; Wang, P.; Leung, T.L.; Siprashvili, Z.; Tichy, A.; Li, J.; et al. Human COL7A1-corrected induced pluripotent stem cells for the treatment of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 264ra163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Miyazaki, H.; Tsunoi, Y.; Akagi, T.; Sato, S.; Akashi, M.; Saitoh, D. A novel strategy to engineer pre-vascularized 3-dimensional skin substitutes to achieve efficient, functional engraftment. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 7797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Itoh, M.; Umegaki-Arao, N.; Guo, Z.; Liu, L.; Higgins, C.A.; Christiano, A.M. Generation of 3D skin equivalents fully reconstituted from human induced pluripotent stem cells (iPSCs). *PLoS ONE* **2013**, *8*, e77673. [[CrossRef](#)]
65. Abaci, H.E.; Guo, Z.; Coffman, A.; Gillette, B.; Lee, W.H.; Sia, S.K.; Christiano, A.M. Human Skin Constructs with Spatially Controlled Vasculature Using Primary and iPSC-Derived Endothelial Cells. *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, *5*, 1800–1807. [[CrossRef](#)]
66. Kim, B.S.; Kwon, Y.W.; Kong, J.S.; Park, G.T.; Gao, G.; Han, W.; Kim, M.B.; Lee, H.; Kim, J.H.; Cho, D.W. 3D cell printing of in vitro stabilized skin model and in vivo pre-vascularized skin patch using tissue-specific extracellular matrix bioink: A step towards advanced skin tissue engineering. *Biomaterials* **2018**, *168*, 38–53. [[CrossRef](#)]
67. Hosaka, C.; Kunisada, M.; Koyanagi-Aoi, M.; Masaki, T.; Takemori, C.; Taniguchi-Ikeda, M.; Aoi, T.; Nishigori, C. Induced pluripotent stem cell-derived melanocyte precursor cells undergoing differentiation into melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2019**, *32*, 623–633. [[CrossRef](#)]
68. Ohta, S.; Imaizumi, Y.; Okada, Y.; Akamatsu, W.; Kuwahara, R.; Ohshima, M.; Amagai, M.; Matsuzaki, Y.; Yamanaka, S.; Okano, H.; et al. Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e16182. [[CrossRef](#)]
69. Nissan, X.; Larribere, L.; Saidani, M.; Hurbain, I.; Delevoye, C.; Feteira, J.; Lemaitre, G.; Peschanski, M.; Baldeschi, C. Functional melanocytes derived from human pluripotent stem cells engraft into pluristratified epidermis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 14861–14866. [[CrossRef](#)]
70. Lee, J.; Rabbani, C.C.; Gao, H.; Steinhart, M.R.; Woodruff, B.M.; Pflum, Z.E.; Kim, A.; Heller, S.; Liu, Y.; Shipchandler, T.Z.; et al. Hair-bearing human skin generated entirely from pluripotent stem cells. *Nature* **2020**, *582*, 399–404. [[CrossRef](#)]
71. Yang, R.; Zheng, Y.; Burrows, M.; Liu, S.; Wei, Z.; Nace, A.; Guo, W.; Kumar, S.; Cotsarelis, G.; Xu, X. Generation of folliculogenic human epithelial stem cells from induced pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3071. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* **2018**, *392*, 1736–1788. [[CrossRef](#)]
73. Nakamura, K.; Murry, C.E. Function Follows Form—A Review of Cardiac Cell Therapy. *Circ. J.* **2019**, *83*, 2399–2412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Muller, P.; Lemcke, H.; David, R. Stem Cell Therapy in Heart Diseases—Cell Types, Mechanisms and Improvement Strategies. *Cell Physiol. Biochem.* **2018**, *48*, 2607–2655. [[CrossRef](#)]
75. Kadota, S.; Tanaka, Y.; Shiba, Y. Heart regeneration using pluripotent stem cells. *J. Cardiol.* **2020**, *76*, 459–463. [[CrossRef](#)]
76. Yang, L.; Soonpaa, M.H.; Adler, E.D.; Roepke, T.K.; Kattman, S.J.; Kennedy, M.; Henckaerts, E.; Bonham, K.; Abbott, G.W.; Linden, R.M.; et al. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* **2008**, *453*, 524–528. [[CrossRef](#)]
77. Laflamme, M.A.; Chen, K.Y.; Naumova, A.V.; Muskheli, V.; Fugate, J.A.; Dupras, S.K.; Reinecke, H.; Xu, C.; Hassanipour, M.; Police, S.; et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1015–1024. [[CrossRef](#)]
78. Karakikes, I.; Ameen, M.; Termglinchan, V.; Wu, J.C. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Insights into molecular, cellular, and functional phenotypes. *Circ. Res.* **2015**, *117*, 80–88. [[CrossRef](#)]
79. Machiraju, P.; Greenway, S.C. Current methods for the maturation of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *World J. Stem Cells* **2019**, *11*, 33–43. [[CrossRef](#)]

80. Burridge, P.W.; Matsa, E.; Shukla, P.; Lin, Z.C.; Churko, J.M.; Ebert, A.D.; Lan, F.; Diecke, S.; Huber, B.; Mordwinkin, N.M.; et al. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat. Methods* **2014**, *11*, 855–860. [[CrossRef](#)]
81. Kempf, H.; Kropp, C.; Olmer, R.; Martin, U.; Zweigerdt, R. Cardiac differentiation of human pluripotent stem cells in scalable suspension culture. *Nat. Protoc.* **2015**, *10*, 1345–1361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Verma, V.; Purnamawati, K.; Manasi; Shim, W. Steering signal transduction pathway towards cardiac lineage from human pluripotent stem cells: A review. *Cell Signal* **2013**, *25*, 1096–1107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Ellis, P.; Fagan, B.M.; Magness, S.T.; Hutton, S.; Taranova, O.; Hayashi, S.; McMahon, A.; Rao, M.; Pevny, L. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev. Neurosci.* **2004**, *26*, 148–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Lian, X.; Hsiao, C.; Wilson, G.; Zhu, K.; Hazeltine, L.B.; Azarin, S.M.; Raval, K.K.; Zhang, J.; Kamp, T.J.; Palecek, S.P. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, E1848–E1857. [[CrossRef](#)]
85. Kadota, S.; Minami, I.; Morone, N.; Heuser, J.E.; Agladze, K.; Nakatsuji, N. Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets. *Eur. Heart J.* **2013**, *34*, 1147–1156. [[CrossRef](#)]
86. Menasche, P.; Vanneau, V.; Hagege, A.; Bel, A.; Cholley, B.; Parouchev, A.; Cacciapuoti, I.; Al-Daccak, R.; Benhamouda, N.; Blons, H.; et al. Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitors for Severe Ischemic Left Ventricular Dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2018**, *71*, 429–438. [[CrossRef](#)]
87. Guan, X.; Xu, W.; Zhang, H.; Wang, Q.; Yu, J.; Zhang, R.; Chen, Y.; Xia, Y.; Wang, J.; Wang, D. Transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial function and reverses ventricular remodeling in infarcted rat hearts. *Stem Cell Res. Ther.* **2020**, *11*, 73. [[CrossRef](#)]
88. Shiba, Y.; Gomibuchi, T.; Seto, T.; Wada, Y.; Ichimura, H.; Tanaka, Y.; Ogasawara, T.; Okada, K.; Shiba, N.; Sakamoto, K.; et al. Allogeneic transplantation of iPSC cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature* **2016**, *538*, 388–391. [[CrossRef](#)]
89. Liu, Y.W.; Chen, B.; Yang, X.; Fugate, J.A.; Kalucki, F.A.; Futakuchi-Tsuchida, A.; Couture, L.; Vogel, K.W.; Astley, C.A.; Baldessari, A.; et al. Erratum: Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. *Nat. Biotechnol.* **2018**, *36*, 899. [[CrossRef](#)]
90. Chong, J.J.; Yang, X.; Don, C.W.; Minami, E.; Liu, Y.W.; Weyers, J.J.; Mahoney, W.M.; Van Biber, B.; Cook, S.M.; Palpant, N.J.; et al. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature* **2014**, *510*, 273–277. [[CrossRef](#)]
91. Ishida, M.; Miyagawa, S.; Saito, A.; Fukushima, S.; Harada, A.; Ito, E.; Ohashi, F.; Watabe, T.; Hatazawa, J.; Matsuura, K.; et al. Transplantation of Human-induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes Is Superior to Somatic Stem Cell Therapy for Restoring Cardiac Function and Oxygen Consumption in a Porcine Model of Myocardial Infarction. *Transplantation* **2019**, *103*, 291–298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Romagnuolo, R.; Masoudpour, H.; Porta-Sanchez, A.; Qiang, B.; Barry, J.; Laskary, A.; Qi, X.; Masse, S.; Magtibay, K.; Kawajiri, H.; et al. Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Regenerate the Infarcted Pig Heart but Induce Ventricular Tachyarrhythmias. *Stem Cell Rep.* **2019**, *12*, 967–981. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Kehat, I.; Khimovich, L.; Caspi, O.; Gepstein, A.; Shofti, R.; Arbel, G.; Huber, I.; Satin, J.; Itskovitz-Eldor, J.; Gepstein, L. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1282–1289. [[CrossRef](#)]
94. Zhang, J.Z.; Termglinchan, V.; Shao, N.Y.; Itzhaki, I.; Liu, C.; Ma, N.; Tian, L.; Wang, V.Y.; Chang, A.C.Y.; Guo, H.; et al. A Human iPSC Double-Reporter System Enables Purification of Cardiac Lineage Subpopulations with Distinct Function and Drug Response Profiles. *Cell Stem Cell* **2019**, *24*, 802–811. [[CrossRef](#)]
95. Gerbin, K.A.; Yang, X.; Murry, C.E.; Coulombe, K.L. Enhanced Electrical Integration of Engineered Human Myocardium via Intramyocardial versus Epicardial Delivery in Infarcted Rat Hearts. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0131446. [[CrossRef](#)]
96. Bargehr, J.; Ong, L.P.; Colzani, M.; Davaapil, H.; Hofsteen, P.; Bhandari, S.; Gambardella, L.; Le Novere, N.; Iyer, D.; Sampaziotis, F.; et al. Epicardial cells derived from human embryonic stem cells augment cardiomyocyte-driven heart regeneration. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 895–906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Park, S.J.; Kim, R.Y.; Park, B.W.; Lee, S.; Choi, S.W.; Park, J.H.; Choi, J.J.; Kim, S.W.; Jang, J.; Cho, D.W.; et al. Dual stem cell therapy synergistically improves cardiac function and vascular regeneration following myocardial infarction. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3123. [[CrossRef](#)]
98. Judson, R.N.; Rossi, F.M.V. Towards stem cell therapies for skeletal muscle repair. *NPJ Regen. Med.* **2020**, *5*, 10. [[CrossRef](#)]
99. Chal, J.; Pourquie, O. Making muscle: Skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development* **2017**, *144*, 2104–2122. [[CrossRef](#)]
100. Qazi, T.H.; Duda, G.N.; Ort, M.J.; Perka, C.; Geissler, S.; Winkler, T. Cell therapy to improve regeneration of skeletal muscle injuries. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2019**, *10*, 501–516. [[CrossRef](#)]
101. Sacco, A.; Doyonnas, R.; Kraft, P.; Vitorovic, S.; Blau, H.M. Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature* **2008**, *456*, 502–506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Cerletti, M.; Jurga, S.; Witzak, C.A.; Hirshman, M.F.; Shadrach, J.L.; Goodyear, L.J.; Wagers, A.J. Highly efficient, functional engraftment of skeletal muscle stem cells in dystrophic muscles. *Cell* **2008**, *134*, 37–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Montarras, D.; Morgan, J.; Collins, C.; Relaix, F.; Zaffran, S.; Cumano, A.; Partridge, T.; Buckingham, M. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science* **2005**, *309*, 2064–2067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

104. Arpke, R.W.; Darabi, R.; Mader, T.L.; Zhang, Y.; Toyama, A.; Lonetree, C.L.; Nash, N.; Lowe, D.A.; Perlingeiro, R.C.; Kyba, M. A new immuno-, dystrophin-deficient model, the NSG-mdx(4Cv) mouse, provides evidence for functional improvement following allogeneic satellite cell transplantation. *Stem Cells* **2013**, *31*, 1611–1620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Chal, J.; Oginuma, M.; Al Tanoury, Z.; Gobert, B.; Sumara, O.; Hick, A.; Bousson, F.; Zidouni, Y.; Mursch, C.; Moncuquet, P.; et al. Differentiation of pluripotent stem cells to muscle fiber to model Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 962–969. [[CrossRef](#)]
106. Chal, J.; Al Tanoury, Z.; Hestin, M.; Gobert, B.; Aivio, S.; Hick, A.; Cherrier, T.; Nesmith, A.P.; Parker, K.K.; Pourquie, O. Generation of human muscle fibers and satellite-like cells from human pluripotent stem cells in vitro. *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 1833–1850. [[CrossRef](#)]
107. Hicks, M.R.; Hiserodt, J.; Paras, K.; Fujiwara, W.; Eskin, A.; Jan, M.; Xi, H.; Young, C.S.; Evseenko, D.; Nelson, S.F.; et al. ERBB3 and NGFR mark a distinct skeletal muscle progenitor cell in human development and hPSCs. *Nat. Cell. Biol.* **2018**, *20*, 46–57. [[CrossRef](#)]
108. Wu, J.; Matthias, N.; Lo, J.; Ortiz-Vitali, J.L.; Shieh, A.W.; Wang, S.H.; Darabi, R. A Myogenic Double-Reporter Human Pluripotent Stem Cell Line Allows Prospective Isolation of Skeletal Muscle Progenitors. *Cell Rep.* **2018**, *25*, 1966–1981.e4. [[CrossRef](#)]
109. van der Wal, E.; Herrero-Hernandez, P.; Wan, R.; Broeders, M.; In 't Groen, S.L.M.; van Gestel, T.J.M.; van, I.W.F.J.; Cheung, T.H.; van der Ploeg, A.T.; Schaaf, G.J.; et al. Large-Scale Expansion of Human iPSC-Derived Skeletal Muscle Cells for Disease Modeling and Cell-Based Therapeutic Strategies. *Stem Cell Rep.* **2018**, *10*, 1975–1990. [[CrossRef](#)]
110. Quarta, M.; Cromie, M.; Chacon, R.; Blonigan, J.; Garcia, V.; Akimenko, I.; Hamer, M.; Paine, P.; Stok, M.; Shrager, J.B.; et al. Bioengineered constructs combined with exercise enhance stem cell-mediated treatment of volumetric muscle loss. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15613. [[CrossRef](#)]
111. Wolf, M.T.; Dearth, C.L.; Sonnenberg, S.B.; Lobo, E.G.; Badylak, S.F. Naturally derived and synthetic scaffolds for skeletal muscle reconstruction. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *84*, 208–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Alper, J. Geron gets green light for human trial of ES cell-derived product. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 213–214. [[CrossRef](#)]
113. Scott, C.T.; Magnus, D. Wrongful termination: Lessons from the Geron clinical trial. *Stem Cells Transl. Med.* **2014**, *3*, 1398–1401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Desgres, M.; Menasche, P. Clinical Translation of Pluripotent Stem Cell Therapies: Challenges and Considerations. *Cell Stem Cell* **2019**, *25*, 594–606. [[CrossRef](#)]
115. Qiu, T.G. Transplantation of human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelial cells (MA09-hRPE) in macular degeneration. *NPJ Regen. Med.* **2019**, *4*, 19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Kashani, A.H.; Lebkowski, J.S.; Rahhal, F.M.; Avery, R.L.; Salehi-Had, H.; Dang, W.; Lin, C.M.; Mitra, D.; Zhu, D.; Thomas, B.B.; et al. A bioengineered retinal pigment epithelial monolayer for advanced, dry age-related macular degeneration. *Sci. Transl. Med.* **2018**, *10*. [[CrossRef](#)]
117. Mandai, M.; Watanabe, A.; Kurimoto, Y.; Hiram, Y.; Morinaga, C.; Daimon, T.; Fujihara, M.; Akimaru, H.; Sakai, N.; Shibata, Y.; et al. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 1038–1046. [[CrossRef](#)]
118. Sneddon, J.B.; Tang, Q.; Stock, P.; Bluestone, J.A.; Roy, S.; Desai, T.; Hebrok, M. Stem Cell Therapies for Treating Diabetes: Progress and Remaining Challenges. *Cell Stem Cell* **2018**, *22*, 810–823. [[CrossRef](#)]
119. Bravery, C.A. Do human leukocyte antigen-typed cellular therapeutics based on induced pluripotent stem cells make commercial sense? *Stem Cells Dev.* **2015**, *24*, 1–10. [[CrossRef](#)]
120. Malat, G.; Culkun, C. The ABCs of Immunosuppression: A Primer for Primary Care Physicians. *Med. Clin. N. Am.* **2016**, *100*, 505–518. [[CrossRef](#)]
121. Schwartz, S.D.; Regillo, C.D.; Lam, B.L.; Elliott, D.; Rosenfeld, P.J.; Gregori, N.Z.; Hubschman, J.P.; Davis, J.L.; Heilwell, G.; Sporn, M.; et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: Follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet* **2015**, *385*, 509–516. [[CrossRef](#)]
122. Taylor, C.J.; Bolton, E.M.; Pocock, S.; Sharples, L.D.; Pedersen, R.A.; Bradley, J.A. Banking on human embryonic stem cells: Estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching. *Lancet* **2005**, *366*, 2019–2025. [[CrossRef](#)]
123. Wilmot, I.; Leslie, S.; Martin, N.G.; Peschanski, M.; Rao, M.; Trounson, A.; Turner, D.; Turner, M.L.; Yamanaka, S.; Taylor, C.J. Development of a global network of induced pluripotent stem cell haplobanks. *Regen. Med.* **2015**, *10*, 235–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Taylor, C.J.; Peacock, S.; Chaudhry, A.N.; Bradley, J.A.; Bolton, E.M. Generating an iPSC bank for HLA-matched tissue transplantation based on known donor and recipient HLA types. *Cell Stem Cell* **2012**, *11*, 147–152. [[CrossRef](#)]
125. Sugita, S.; Mandai, M.; Hiram, Y.; Takagi, S.; Maeda, T.; Fujihara, M.; Matsuzaki, M.; Yamamoto, M.; Iseki, K.; Hayashi, N.; et al. HLA-Matched Allogeneic iPSC Cells-Derived RPE Transplantation for Macular Degeneration. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 2217. [[CrossRef](#)]
126. Gornalusse, G.G.; Hirata, R.K.; Funk, S.E.; Rioloobos, L.; Lopes, V.S.; Manske, G.; Prunkard, D.; Colunga, A.G.; Hanafi, L.A.; Clegg, D.O.; et al. HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 765–772. [[CrossRef](#)]
127. Xu, H.; Wang, B.; Ono, M.; Kagita, A.; Fujii, K.; Sasakawa, N.; Ueda, T.; Gee, P.; Nishikawa, M.; Nomura, M.; et al. Targeted Disruption of HLA Genes via CRISPR-Cas9 Generates iPSCs with Enhanced Immune Compatibility. *Cell Stem Cell* **2019**, *24*, 566–578.e7. [[CrossRef](#)]

128. Han, X.; Wang, M.; Duan, S.; Franco, P.J.; Kenty, J.H.; Hedrick, P.; Xia, Y.; Allen, A.; Ferreira, L.M.R.; Strominger, J.L.; et al. Generation of hypoimmunogenic human pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 10441–10446. [[CrossRef](#)]
129. Deuse, T.; Hu, X.; Gravina, A.; Wang, D.; Tediashvili, G.; De, C.; Thayer, W.O.; Wahl, A.; Garcia, J.V.; Reichenspurner, H.; et al. Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 252–258. [[CrossRef](#)]
130. Shi, Z.D.; Tcho, J.; Wu, L.; Carman, A.J. Precision installation of a highly efficient suicide gene safety switch in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl. Med.* **2020**, *9*, 1378–1388. [[CrossRef](#)]
131. Jing, H.; He, X.; Zheng, J. Exosomes and regenerative medicine: State of the art and perspectives. *Transl. Res.* **2018**, *196*, 1–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Brini, A.T.; Amodeo, G.; Ferreira, L.M.; Milani, A.; Niada, S.; Moschetti, G.; Franchi, S.; Borsani, E.; Rodella, L.F.; Panerai, A.E.; et al. Therapeutic effect of human adipose-derived stem cells and their secretome in experimental diabetic pain. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Maumus, M.; Rozier, P.; Boulestreau, J.; Jorgensen, C.; Noel, D. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: Opportunities and Challenges for Clinical Translation. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 997. [[CrossRef](#)]
134. Cai, Y.; Liu, W.; Lian, L.; Xu, Y.; Bai, X.; Xu, S.; Zhang, J. Stroke treatment: Is exosome therapy superior to stem cell therapy? *Biochimie* **2020**, *179*, 190–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Kennedy, T.L.; Russell, A.J.; Riley, P. Experimental limitations of extracellular vesicle-based therapies for the treatment of myocardial infarction. *Trends Cardiovasc. Med.* **2020**. [[CrossRef](#)]
136. Fuster-Matanzo, A.; Gessler, F.; Leonardi, T.; Iraci, N.; Pluchino, S. Acellular approaches for regenerative medicine: On the verge of clinical trials with extracellular membrane vesicles? *Stem Cell Res. Ther.* **2015**, *6*, 227. [[CrossRef](#)]
137. Thery, C.; Zitvogel, L.; Amigorena, S. Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 569–579. [[CrossRef](#)]
138. Valadi, H.; Ekstrom, K.; Bossios, A.; Sjostrand, M.; Lee, J.J.; Lotvall, J.O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 654–659. [[CrossRef](#)]
139. Skog, J.; Wurdinger, T.; van Rijn, S.; Meijer, D.H.; Gainche, L.; Sena-Estevés, M.; Curry, W.T., Jr.; Carter, B.S.; Krichevsky, A.M.; Breakefield, X.O. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 1470–1476. [[CrossRef](#)]
140. Mulcahy, L.A.; Pink, R.C.; Carter, D.R. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J. Extracell. Vesicles* **2014**, *3*. [[CrossRef](#)]
141. Mathieu, M.; Martin-Jaular, L.; Lavieu, G.; Thery, C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 9–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Thery, C.; Witwer, K.W.; Aikawa, E.; Alcaraz, M.J.; Anderson, J.D.; Andriantsitohaina, R.; Antoniou, A.; Arab, T.; Archer, F.; Atkin-Smith, G.K.; et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles* **2018**, *7*, 1535750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Reiner, A.T.; Witwer, K.W.; van Balkom, B.W.M.; de Beer, J.; Brodie, C.; Corteling, R.L.; Gabriëlsson, S.; Gimona, M.; Ibrahim, A.G.; de Kleijn, D.; et al. Concise Review: Developing Best-Practice Models for the Therapeutic Use of Extracellular Vesicles. *Stem Cells Transl. Med.* **2017**, *6*, 1730–1739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Gandham, S.; Su, X.; Wood, J.; Nocera, A.L.; Alli, S.C.; Milane, L.; Zimmerman, A.; Amiji, M.; Ivanov, A.R. Technologies and Standardization in Research on Extracellular Vesicles. *Trends Biotechnol.* **2020**, *38*, 1066–1098. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Markov, O.; Oshchepkova, A.; Mironova, N. Immunotherapy Based on Dendritic Cell-Targeted/-Derived Extracellular Vesicles-A Novel Strategy for Enhancement of the Anti-tumor Immune Response. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 1152. [[CrossRef](#)]
146. Besse, B.; Charrier, M.; Lapierre, V.; Dansin, E.; Lantz, O.; Planchard, D.; Le Chevalier, T.; Livartoski, A.; Barlesi, F.; Laplanche, A.; et al. Dendritic cell-derived exosomes as maintenance immunotherapy after first line chemotherapy in NSCLC. *Oncoimmunology* **2016**, *5*, e1071008. [[CrossRef](#)]
147. Mead, B.; Tomarev, S. Extracellular vesicle therapy for retinal diseases. *Prog. Retin. Eye Res.* **2020**, 100849. [[CrossRef](#)]
148. Wang, S.; Girman, S.; Lu, B.; Bischoff, N.; Holmes, T.; Shearer, R.; Wright, L.S.; Svendsen, C.N.; Gamm, D.M.; Lund, R.D. Long-term vision rescue by human neural progenitors in a rat model of photoreceptor degeneration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2008**, *49*, 3201–3206. [[CrossRef](#)]
149. Liu, Y.; Chen, S.J.; Li, S.Y.; Qu, L.H.; Meng, X.H.; Wang, Y.; Xu, H.W.; Liang, Z.Q.; Yin, Z.Q. Long-term safety of human retinal progenitor cell transplantation in retinitis pigmentosa patients. *Stem Cell Res. Ther.* **2017**, *8*, 209. [[CrossRef](#)]
150. Luo, J.; Baranov, P.; Patel, S.; Ouyang, H.; Quach, J.; Wu, F.; Qiu, A.; Luo, H.; Hicks, C.; Zeng, J.; et al. Human retinal progenitor cell transplantation preserves vision. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 6362–6371. [[CrossRef](#)]
151. Bian, B.; Zhao, C.; He, X.; Gong, Y.; Ren, C.; Ge, L.; Zeng, Y.; Li, Q.; Chen, M.; Weng, C.; et al. Exosomes derived from neural progenitor cells preserve photoreceptors during retinal degeneration by inactivating microglia. *J. Extracell. Vesicles* **2020**, *9*, 1748931. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Peng, B.; Xiao, J.; Wang, K.; So, K.F.; Tipoe, G.L.; Lin, B. Suppression of microglial activation is neuroprotective in a mouse model of human retinitis pigmentosa. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **2014**, *34*, 8139–8150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

153. He, G.H.; Zhang, W.; Ma, Y.X.; Yang, J.; Chen, L.; Song, J.; Chen, S. Mesenchymal stem cells-derived exosomes ameliorate blue light stimulation in retinal pigment epithelium cells and retinal laser injury by VEGF-dependent mechanism. *Int. J. Ophthalmol.* **2018**, *11*, 559–566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Yu, B.; Shao, H.; Su, C.; Jiang, Y.; Chen, X.; Bai, L.; Zhang, Y.; Li, Q.; Zhang, X.; Li, X. Exosomes derived from MSCs ameliorate retinal laser injury partially by inhibition of MCP-1. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34562. [[CrossRef](#)]
155. Hajrasouliha, A.R.; Jiang, G.; Lu, Q.; Lu, H.; Kaplan, H.J.; Zhang, H.G.; Shao, H. Exosomes from retinal astrocytes contain antiangiogenic components that inhibit laser-induced choroidal neovascularization. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 28058–28067. [[CrossRef](#)]
156. Moisseiev, E.; Anderson, J.D.; Oltjen, S.; Goswami, M.; Zawadzki, R.J.; Nolta, J.A.; Park, S.S. Protective Effect of Intravitreal Administration of Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells on Retinal Ischemia. *Curr. Eye Res.* **2017**, *42*, 1358–1367. [[CrossRef](#)]
157. Bartsch, U.; Oriyakhel, W.; Kenna, P.F.; Linke, S.; Richard, G.; Petrowitz, B.; Humphries, P.; Farrar, G.J.; Ader, M. Retinal cells integrate into the outer nuclear layer and differentiate into mature photoreceptors after subretinal transplantation into adult mice. *Exp. Eye Res.* **2008**, *86*, 691–700. [[CrossRef](#)]
158. Pearson, R.A.; Barber, A.C.; Rizzi, M.; Hippert, C.; Xue, T.; West, E.L.; Duran, Y.; Smith, A.J.; Chuang, J.Z.; Azam, S.A.; et al. Restoration of vision after transplantation of photoreceptors. *Nature* **2012**, *485*, 99–103. [[CrossRef](#)]
159. Barber, A.C.; Hippert, C.; Duran, Y.; West, E.L.; Bainbridge, J.W.; Warre-Cornish, K.; Luhmann, U.F.; Lakowski, J.; Sowden, J.C.; Ali, R.R.; et al. Repair of the degenerate retina by photoreceptor transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 354–359. [[CrossRef](#)]
160. Pearson, R.A.; Gonzalez-Cordero, A.; West, E.L.; Ribeiro, J.R.; Aghaizu, N.; Goh, D.; Sampson, R.D.; Georgiadis, A.; Waldron, P.V.; Duran, Y.; et al. Donor and host photoreceptors engage in material transfer following transplantation of post-mitotic photoreceptor precursors. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13029. [[CrossRef](#)]
161. Ortin-Martinez, A.; Tsai, E.L.; Nickerson, P.E.; Bergeret, M.; Lu, Y.; Smiley, S.; Comanita, L.; Wallace, V.A. A Reinterpretation of Cell Transplantation: GFP Transfer From Donor to Host Photoreceptors. *Stem Cells* **2017**, *35*, 932–939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Singh, M.S.; Park, S.S.; Albin, T.A.; Canto-Soler, M.V.; Klassen, H.; MacLaren, R.E.; Takahashi, M.; Nagiel, A.; Schwartz, S.D.; Bharti, K. Retinal stem cell transplantation: Balancing safety and potential. *Prog. Retin. Eye Res.* **2020**, *75*, 100779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Wassmer, S.J.; Carvalho, L.S.; Gyorgy, B.; Vandenberghe, L.H.; Maguire, C.A. Exosome-associated AAV2 vector mediates robust gene delivery into the murine retina upon intravitreal injection. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 45329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. van der Merwe, Y.; Steketee, M.B. Extracellular Vesicles: Biomarkers, Therapeutics, and Vehicles in the Visual System. *Curr. Ophthalmol. Rep.* **2017**, *5*, 276–282. [[CrossRef](#)]
165. Gonzalez, A.C.; Costa, T.F.; Andrade, Z.A.; Medrado, A.R. Wound healing—A literature review. *An. Bras. Dermatol.* **2016**, *91*, 614–620. [[CrossRef](#)]
166. Ha, D.H.; Kim, H.K.; Lee, J.; Kwon, H.H.; Park, G.H.; Yang, S.H.; Jung, J.Y.; Choi, H.; Lee, J.H.; Sung, S.; et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Exosomes for Immunomodulatory Therapeutics and Skin Regeneration. *Cells* **2020**, *9*, 1157. [[CrossRef](#)]
167. Ferreira, A.D.F.; Gomes, D.A. Stem Cell Extracellular Vesicles in Skin Repair. *Bioengineering* **2018**, *6*, 4. [[CrossRef](#)]
168. Hesketh, M.; Sahin, K.B.; West, Z.E.; Murray, R.Z. Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1545. [[CrossRef](#)]
169. Ti, D.; Hao, H.; Tong, C.; Liu, J.; Dong, L.; Zheng, J.; Zhao, Y.; Liu, H.; Fu, X.; Han, W. LPS-preconditioned mesenchymal stromal cells modify macrophage polarization for resolution of chronic inflammation via exosome-shuttled let-7b. *J. Transl. Med.* **2015**, *13*, 308. [[CrossRef](#)]
170. He, X.; Dong, Z.; Cao, Y.; Wang, H.; Liu, S.; Liao, L.; Jin, Y.; Yuan, L.; Li, B. MSC-Derived Exosome Promotes M2 Polarization and Enhances Cutaneous Wound Healing. *Stem Cells Int.* **2019**, *2019*, 7132708. [[CrossRef](#)]
171. Liu, L.; Yu, Y.; Hou, Y.; Chai, J.; Duan, H.; Chu, W.; Zhang, H.; Hu, Q.; Du, J. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation promotes cutaneous wound healing of severe burned rats. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e88348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Li, X.; Liu, L.; Yang, J.; Yu, Y.; Chai, J.; Wang, L.; Ma, L.; Yin, H. Exosome Derived From Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Mediates MiR-181c Attenuating Burn-induced Excessive Inflammation. *EBioMedicine* **2016**, *8*, 72–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Werner, S.; Krieg, T.; Smola, H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J. Investig. Dermatol.* **2007**, *127*, 998–1008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Zhang, B.; Wang, M.; Gong, A.; Zhang, X.; Wu, X.; Zhu, Y.; Shi, H.; Wu, L.; Zhu, W.; Qian, H.; et al. HucMSC-Exosome Mediated-Wnt4 Signaling Is Required for Cutaneous Wound Healing. *Stem Cells* **2015**, *33*, 2158–2168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Shabbir, A.; Cox, A.; Rodriguez-Menocal, L.; Salgado, M.; Van Badiavas, E. Mesenchymal Stem Cell Exosomes Induce Proliferation and Migration of Normal and Chronic Wound Fibroblasts, and Enhance Angiogenesis In Vitro. *Stem Cells Dev.* **2015**, *24*, 1635–1647. [[CrossRef](#)]
176. Hu, L.; Wang, J.; Zhou, X.; Xiong, Z.; Zhao, J.; Yu, R.; Huang, F.; Zhang, H.; Chen, L. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 32993. [[CrossRef](#)]

177. Ferreira, A.D.F.; Cunha, P.D.S.; Carregal, V.M.; da Silva, P.C.; de Miranda, M.C.; Kunrath-Lima, M.; de Melo, M.I.A.; Faraco, C.C.F.; Barbosa, J.L.; Frezard, F.; et al. Extracellular Vesicles from Adipose-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells Accelerate Migration and Activate AKT Pathway in Human Keratinocytes and Fibroblasts Independently of miR-205 Activity. *Stem Cells Int.* **2017**, *2017*, 9841035. [[CrossRef](#)]
178. Chen, C.Y.; Rao, S.S.; Ren, L.; Hu, X.K.; Tan, Y.J.; Hu, Y.; Luo, J.; Liu, Y.W.; Yin, H.; Huang, J.; et al. Exosomal DMBT1 from human urine-derived stem cells facilitates diabetic wound repair by promoting angiogenesis. *Theranostics* **2018**, *8*, 1607–1623. [[CrossRef](#)]
179. Cooper, D.R.; Wang, C.; Patel, R.; Trujillo, A.; Patel, N.A.; Prather, J.; Gould, L.J.; Wu, M.H. Human Adipose-Derived Stem Cell Conditioned Media and Exosomes Containing MALAT1 Promote Human Dermal Fibroblast Migration and Ischemic Wound Healing. *Adv. Wound Care (New Rochelle)* **2018**, *7*, 299–308. [[CrossRef](#)]
180. Kim, S.; Lee, S.K.; Kim, H.; Kim, T.M. Exosomes Secreted from Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells Accelerate Skin Cell Proliferation. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3119. [[CrossRef](#)]
181. Kobayashi, H.; Ebisawa, K.; Kambe, M.; Kasai, T.; Suga, H.; Nakamura, K.; Narita, Y.; Ogata, A.; Kamei, Y. Editors' Choice Effects of exosomes derived from the induced pluripotent stem cells on skin wound healing. *Nagoya J. Med. Sci.* **2018**, *80*, 141–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
182. Wang, X.; Jiao, Y.; Pan, Y.; Zhang, L.; Gong, H.; Qi, Y.; Wang, M.; Gong, H.; Shao, M.; Wang, X.; et al. Fetal Dermal Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Accelerate Cutaneous Wound Healing by Activating Notch Signaling. *Stem Cells Int.* **2019**, *2019*, 2402916. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Yan, Y.; Wu, R.; Bo, Y.; Zhang, M.; Chen, Y.; Wang, X.; Huang, M.; Liu, B.; Zhang, L. Induced pluripotent stem cells-derived microvesicles accelerate deep second-degree burn wound healing in mice through miR-16-5p-mediated promotion of keratinocytes migration. *Theranostics* **2020**, *10*, 9970–9983. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Hu, Y.; Rao, S.S.; Wang, Z.X.; Cao, J.; Tan, Y.J.; Luo, J.; Li, H.M.; Zhang, W.S.; Chen, C.Y.; Xie, H. Exosomes from human umbilical cord blood accelerate cutaneous wound healing through miR-21-3p-mediated promotion of angiogenesis and fibroblast function. *Theranostics* **2018**, *8*, 169–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Zhang, J.; Guan, J.; Niu, X.; Hu, G.; Guo, S.; Li, Q.; Xie, Z.; Zhang, C.; Wang, Y. Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis. *J. Transl. Med.* **2015**, *13*, 49. [[CrossRef](#)]
186. Kim, Y.J.; Yoo, S.M.; Park, H.H.; Lim, H.J.; Kim, Y.L.; Lee, S.; Seo, K.W.; Kang, K.S. Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulates rejuvenation of human skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *493*, 1102–1108. [[CrossRef](#)]
187. Wang, L.; Hu, L.; Zhou, X.; Xiong, Z.; Zhang, C.; Shehada, H.M.A.; Hu, B.; Song, J.; Chen, L. Exosomes secreted by human adipose mesenchymal stem cells promote scarless cutaneous repair by regulating extracellular matrix remodelling. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 13321. [[CrossRef](#)]
188. Marino, D.; Luginbuhl, J.; Scola, S.; Meuli, M.; Reichmann, E. Bioengineering dermo-epidermal skin grafts with blood and lymphatic capillaries. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 221ra214. [[CrossRef](#)]
189. Zhang, J.; Chen, C.; Hu, B.; Niu, X.; Liu, X.; Zhang, G.; Zhang, C.; Li, Q.; Wang, Y. Exosomes Derived from Human Endothelial Progenitor Cells Accelerate Cutaneous Wound Healing by Promoting Angiogenesis Through Erk1/2 Signaling. *Int. J. Biol. Sci.* **2016**, *12*, 1472–1487. [[CrossRef](#)]
190. Chen, B.; Sun, Y.; Zhang, J.; Zhu, Q.; Yang, Y.; Niu, X.; Deng, Z.; Li, Q.; Wang, Y. Human embryonic stem cell-derived exosomes promote pressure ulcer healing in aged mice by rejuvenating senescent endothelial cells. *Stem Cell Res. Ther.* **2019**, *10*, 142. [[CrossRef](#)]
191. Zhang, B.; Wu, X.; Zhang, X.; Sun, Y.; Yan, Y.; Shi, H.; Zhu, Y.; Wu, L.; Pan, Z.; Zhu, W.; et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes enhance angiogenesis through the Wnt4/beta-catenin pathway. *Stem Cells Transl. Med.* **2015**, *4*, 513–522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
192. Shi, Q.; Qian, Z.; Liu, D.; Sun, J.; Wang, X.; Liu, H.; Xu, J.; Guo, X. GMSC-Derived Exosomes Combined with a Chitosan/Silk Hydrogel Sponge Accelerates Wound Healing in a Diabetic Rat Skin Defect Model. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Tao, S.C.; Guo, S.C.; Li, M.; Ke, Q.F.; Guo, Y.P.; Zhang, C.Q. Chitosan Wound Dressings Incorporating Exosomes Derived from MicroRNA-126-Overexpressing Synovium Mesenchymal Stem Cells Provide Sustained Release of Exosomes and Heal Full-Thickness Skin Defects in a Diabetic Rat Model. *Stem Cells Transl. Med.* **2017**, *6*, 736–747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. Sze, S.K.; de Kleijn, D.P.; Lai, R.C.; Khia Way Tan, E.; Zhao, H.; Yeo, K.S.; Low, T.Y.; Lian, Q.; Lee, C.N.; Mitchell, W.; et al. Elucidating the secretion proteome of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Mol. Cell Proteom. MCP* **2007**, *6*, 1680–1689. [[CrossRef](#)]
195. Timmers, L.; Lim, S.K.; Hoefer, I.E.; Arslan, F.; Lai, R.C.; van Oorschot, A.A.; Goumans, M.J.; Strijder, C.; Sze, S.K.; Choo, A.; et al. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res.* **2011**, *6*, 206–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
196. Timmers, L.; Lim, S.K.; Arslan, F.; Armstrong, J.S.; Hoefer, I.E.; Doevendans, P.A.; Piek, J.J.; El Oakley, R.M.; Choo, A.; Lee, C.N.; et al. Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Res.* **2007**, *1*, 129–137. [[CrossRef](#)]

197. Lai, R.C.; Arslan, F.; Lee, M.M.; Sze, N.S.; Choo, A.; Chen, T.S.; Salto-Tellez, M.; Timmers, L.; Lee, C.N.; El Oakley, R.M.; et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* **2010**, *4*, 214–222. [[CrossRef](#)]
198. Khan, M.; Nickoloff, E.; Abramova, T.; Johnson, J.; Verma, S.K.; Krishnamurthy, P.; Mackie, A.R.; Vaughan, E.; Garikipati, V.N.; Benedict, C.; et al. Embryonic stem cell-derived exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following myocardial infarction. *Circ. Res.* **2015**, *117*, 52–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
199. Oskouei, B.N.; Lamirault, G.; Joseph, C.; Treuer, A.V.; Landa, S.; Da Silva, J.; Hatzistergos, K.; Dauer, M.; Balkan, W.; McNiece, L.; et al. Increased potency of cardiac stem cells compared with bone marrow mesenchymal stem cells in cardiac repair. *Stem Cells Transl. Med.* **2012**, *1*, 116–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
200. Li, T.S.; Cheng, K.; Malliaras, K.; Smith, R.R.; Zhang, Y.; Sun, B.; Matsushita, N.; Blusztajn, A.; Terrovitis, J.; Kusuoka, H.; et al. Direct comparison of different stem cell types and subpopulations reveals superior paracrine potency and myocardial repair efficacy with cardiosphere-derived cells. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2012**, *59*, 942–953. [[CrossRef](#)]
201. Kervadec, A.; Bellamy, V.; El Harane, N.; Arakelian, L.; Vanneau, V.; Cacciapuoti, I.; Nemetalla, H.; Perier, M.C.; Toeg, H.D.; Richart, A.; et al. Cardiovascular progenitor-derived extracellular vesicles recapitulate the beneficial effects of their parent cells in the treatment of chronic heart failure. *J. Heart Lung Transpl.* **2016**, *35*, 795–807. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
202. Liu, B.; Lee, B.W.; Nakanishi, K.; Villasante, A.; Williamson, R.; Metz, J.; Kim, J.; Kanai, M.; Bi, L.; Brown, K.; et al. Cardiac recovery via extended cell-free delivery of extracellular vesicles secreted by cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells. *Nat. Biomed. Eng.* **2018**, *2*, 293–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
203. Bittel, D.C.; Jaiswal, J.K. Contribution of Extracellular Vesicles in Rebuilding Injured Muscles. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
204. Choi, J.S.; Yoon, H.I.; Lee, K.S.; Choi, Y.C.; Yang, S.H.; Kim, I.S.; Cho, Y.W. Exosomes from differentiating human skeletal muscle cells trigger myogenesis of stem cells and provide biochemical cues for skeletal muscle regeneration. *J. Control. Release* **2016**, *222*, 107–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
205. Kharraz, Y.; Guerra, J.; Pessina, P.; Serrano, A.L.; Munoz-Canoves, P. Understanding the process of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 965631. [[CrossRef](#)]
206. Fry, C.S.; Kirby, T.J.; Kosmac, K.; McCarthy, J.J.; Peterson, C.A. Myogenic Progenitor Cells Control Extracellular Matrix Production by Fibroblasts during Skeletal Muscle Hypertrophy. *Cell Stem Cell* **2017**, *20*, 56–69. [[CrossRef](#)]
207. Zanotti, S.; Gibertini, S.; Blasevich, F.; Bragato, C.; Ruggieri, A.; Saredi, S.; Fabbri, M.; Bernasconi, P.; Maggi, L.; Mantegazza, R.; et al. Exosomes and exosomal miRNAs from muscle-derived fibroblasts promote skeletal muscle fibrosis. *Matrix Biol.* **2018**, *74*, 77–100. [[CrossRef](#)]
208. Wang, H.; Wang, B.; Zhang, A.; Hassounah, F.; Seow, Y.; Wood, M.; Ma, F.; Klein, J.D.; Price, S.R.; Wang, X.H. Exosome-Mediated miR-29 Transfer Reduces Muscle Atrophy and Kidney Fibrosis in Mice. *Mol. Ther.* **2019**, *27*, 571–583. [[CrossRef](#)]
209. Wang, B.; Zhang, A.; Wang, H.; Klein, J.D.; Tan, L.; Wang, Z.M.; Du, J.; Naqvi, N.; Liu, B.C.; Wang, X.H. miR-26a Limits Muscle Wasting and Cardiac Fibrosis through Exosome-Mediated microRNA Transfer in Chronic Kidney Disease. *Theranostics* **2019**, *9*, 1864–1877. [[CrossRef](#)]
210. Aminzadeh, M.A.; Rogers, R.G.; Fournier, M.; Tobin, R.E.; Guan, X.; Childers, M.K.; Andres, A.M.; Taylor, D.J.; Ibrahim, A.; Ding, X.; et al. Exosome-Mediated Benefits of Cell Therapy in Mouse and Human Models of Duchenne Muscular Dystrophy. *Stem Cell Rep.* **2018**, *10*, 942–955. [[CrossRef](#)]
211. Murphy, C.; Withrow, J.; Hunter, M.; Liu, Y.; Tang, Y.L.; Fulzele, S.; Hamrick, M.W. Emerging role of extracellular vesicles in musculoskeletal diseases. *Mol. Asp. Med.* **2018**, *60*, 123–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
212. Gao, X.; Ran, N.; Dong, X.; Zuo, B.; Yang, R.; Zhou, Q.; Moulton, H.M.; Seow, Y.; Yin, H. Anchor peptide captures, targets, and loads exosomes of diverse origins for diagnostics and therapy. *Sci. Transl. Med.* **2018**, *10*. [[CrossRef](#)]
213. Rome, S.; Forterre, A.; Mizgier, M.L.; Bouzakri, K. Skeletal Muscle-Released Extracellular Vesicles: State of the Art. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 929. [[CrossRef](#)]
214. Cho, H.; Blatchley, M.R.; Duh, E.J.; Gerecht, S. Acellular and cellular approaches to improve diabetic wound healing. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *146*, 267–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
215. Paganini, C.; Capasso Palmiero, U.; Pocsfalvi, G.; Touzet, N.; Bongiovanni, A.; Arosio, P. Scalable Production and Isolation of Extracellular Vesicles: Available Sources and Lessons from Current Industrial Bioprocesses. *Biotechnol. J.* **2019**, *14*, e1800528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
216. Ludwig, N.; Whiteside, T.L.; Reichert, T.E. Challenges in Exosome Isolation and Analysis in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4684. [[CrossRef](#)]
217. Li, J.; Lee, Y.; Johansson, H.J.; Mager, I.; Vader, P.; Nordin, J.Z.; Wiklander, O.P.; Lehtio, J.; Wood, M.J.; Andaloussi, S.E. Serum-free culture alters the quantity and protein composition of neuroblastoma-derived extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* **2015**, *4*, 26883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
218. Whitford, W.; Guterstam, P. Exosome manufacturing status. *Future Med. Chem.* **2019**, *11*, 1225–1236. [[CrossRef](#)]
219. Shelke, G.V.; Lasser, C.; Gho, Y.S.; Lotvall, J. Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *J. Extracell. Vesicles* **2014**, *3*. [[CrossRef](#)]
220. Eitan, E.; Zhang, S.; Witwer, K.W.; Mattson, M.P. Extracellular vesicle-depleted fetal bovine and human sera have reduced capacity to support cell growth. *J. Extracell. Vesicles* **2015**, *4*, 26373. [[CrossRef](#)]

221. Mateescu, B.; Kowal, E.J.; van Balkom, B.W.; Bartel, S.; Bhattacharyya, S.N.; Buzas, E.I.; Buck, A.H.; de Candia, P.; Chow, F.W.; Das, S.; et al. Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA—An ISEV position paper. *J. Extracell. Vesicles* **2017**, *6*, 1286095. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
222. Lener, T.; Gimona, M.; Aigner, L.; Borger, V.; Buzas, E.; Camussi, G.; Chaput, N.; Chatterjee, D.; Court, F.A.; Del Portillo, H.A.; et al. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials—An ISEV position paper. *J. Extracell. Vesicles* **2015**, *4*, 30087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
223. Li, P.; Kaslan, M.; Lee, S.H.; Yao, J.; Gao, Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics* **2017**, *7*, 789–804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
224. Gardiner, C.; Di Vizio, D.; Sahoo, S.; They, C.; Witwer, K.W.; Wauben, M.; Hill, A.F. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: Results of a worldwide survey. *J. Extracell. Vesicles* **2016**, *5*, 32945. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
225. Brennan, K.; Martin, K.; FitzGerald, S.P.; O’Sullivan, J.; Wu, Y.; Blanco, A.; Richardson, C.; Mc Gee, M.M. A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1039. [[CrossRef](#)]
226. Lamparski, H.G.; Metha-Damani, A.; Yao, J.Y.; Patel, S.; Hsu, D.H.; Ruegg, C.; Le Pecq, J.B. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J. Immunol. Methods* **2002**, *270*, 211–226. [[CrossRef](#)]
227. Lobb, R.J.; Becker, M.; Wen, S.W.; Wong, C.S.; Wiegmanns, A.P.; Leimgruber, A.; Moller, A. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J. Extracell. Vesicles* **2015**, *4*, 27031. [[CrossRef](#)]
228. Andriolo, G.; Provasi, E.; Lo Cicero, V.; Brambilla, A.; Soncin, S.; Torre, T.; Milano, G.; Biemmi, V.; Vassalli, G.; Turchetto, L.; et al. Exosomes From Human Cardiac Progenitor Cells for Therapeutic Applications: Development of a GMP-Grade Manufacturing Method. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 1169. [[CrossRef](#)]
229. Watson, D.C.; Yung, B.C.; Bergamaschi, C.; Chowdhury, B.; Bear, J.; Stellas, D.; Morales-Kastresana, A.; Jones, J.C.; Felber, B.K.; Chen, X.; et al. Scalable, cGMP-compatible purification of extracellular vesicles carrying bioactive human heterodimeric IL-15/lactadherin complexes. *J. Extracell. Vesicles* **2018**, *7*, 1442088. [[CrossRef](#)]
230. Nordin, J.Z.; Lee, Y.; Vader, P.; Mager, I.; Johansson, H.J.; Heusermann, W.; Wiklander, O.P.; Hallbrink, M.; Seow, Y.; Bultema, J.J.; et al. Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties. *Nanomedicine* **2015**, *11*, 879–883. [[CrossRef](#)]
231. Mol, E.A.; Goumans, M.J.; Doevendans, P.A.; Sluijter, J.P.G.; Vader, P. Higher functionality of extracellular vesicles isolated using size-exclusion chromatography compared to ultracentrifugation. *Nanomedicine* **2017**, *13*, 2061–2065. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
232. Yanez-Mo, M.; Siljander, P.R.; Andreu, Z.; Zavec, A.B.; Borrás, F.E.; Buzas, E.I.; Buzas, K.; Casal, E.; Cappello, F.; Carvalho, J.; et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles* **2015**, *4*, 27066. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
233. Wiklander, O.P.B.; Bostancioglu, R.B.; Welsh, J.A.; Zickler, A.M.; Murke, F.; Corso, G.; Felldin, U.; Hagey, D.W.; Evertsson, B.; Liang, X.M.; et al. Systematic Methodological Evaluation of a Multiplex Bead-Based Flow Cytometry Assay for Detection of Extracellular Vesicle Surface Signatures. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1326. [[CrossRef](#)]
234. Gorgens, A.; Bremer, M.; Ferrer-Tur, R.; Murke, F.; Tertel, T.; Horn, P.A.; Thalmann, S.; Welsh, J.A.; Probst, C.; Guerin, C.; et al. Optimisation of imaging flow cytometry for the analysis of single extracellular vesicles by using fluorescence-tagged vesicles as biological reference material. *J. Extracell. Vesicles* **2019**, *8*, 1587567. [[CrossRef](#)]
235. Jeyaram, A.; Jay, S.M. Preservation and Storage Stability of Extracellular Vesicles for Therapeutic Applications. *AAPS J.* **2017**, *20*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
236. Kusuma, G.D.; Barabadi, M.; Tan, J.L.; Morton, D.A.V.; Frith, J.E.; Lim, R. To Protect and to Preserve: Novel Preservation Strategies for Extracellular Vesicles. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 1199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

METHOD

Open Access



Semi-automated optimized method to isolate CRISPR/Cas9 edited human pluripotent stem cell clones

Elie Frank^{1,2}, Michel Cailleret^{1,2}, Constantin Nelep³, Pascal Fragner^{1,2,4}, Jérôme Polentes^{1,2,4}, Elise Herardot^{1,2}, Lina El Kassar^{1,2,4}, Karine Giraud-Triboulet^{1,2,4}, Christelle Monville^{1,2*} and Karim Ben M'Barek^{1,2,4*} 

Abstract

Background CRISPR/Cas9 editing systems are currently used to generate mutations in a particular gene to mimic a genetic disorder in vitro. Such “disease in a dish” models based on human pluripotent stem cells (hPSCs) offer the opportunity to have access to virtually all cell types of the human body. However, the generation of mutated hPSCs remains fastidious. Current CRISPR/Cas9 editing approaches lead to a mixed cell population containing simultaneously non-edited and a variety of edited cells. These edited hPSCs need therefore to be isolated through manual dilution cloning, which is time-consuming, labor intensive and tedious.

Methods Following CRISPR/Cas9 edition, we obtained a mixed cell population with various edited cells. We then used a semi-automated robotic platform to isolate single cell-derived clones.

Results We optimized CRISPR/Cas9 editing to knock out a representative gene and developed a semi-automated method for the clonal isolation of edited hPSCs. This method is faster and more reliable than current manual approaches.

Conclusions This novel method of hPSC clonal isolation will greatly improve and upscale the generation of edited hPSCs required for downstream applications including disease modeling and drug screening.

Keywords CRISPR/Cas9, Gene edition, Human pluripotent stem cell, Clonal isolation

*Correspondence:

Christelle Monville

cmonville@istem.fr

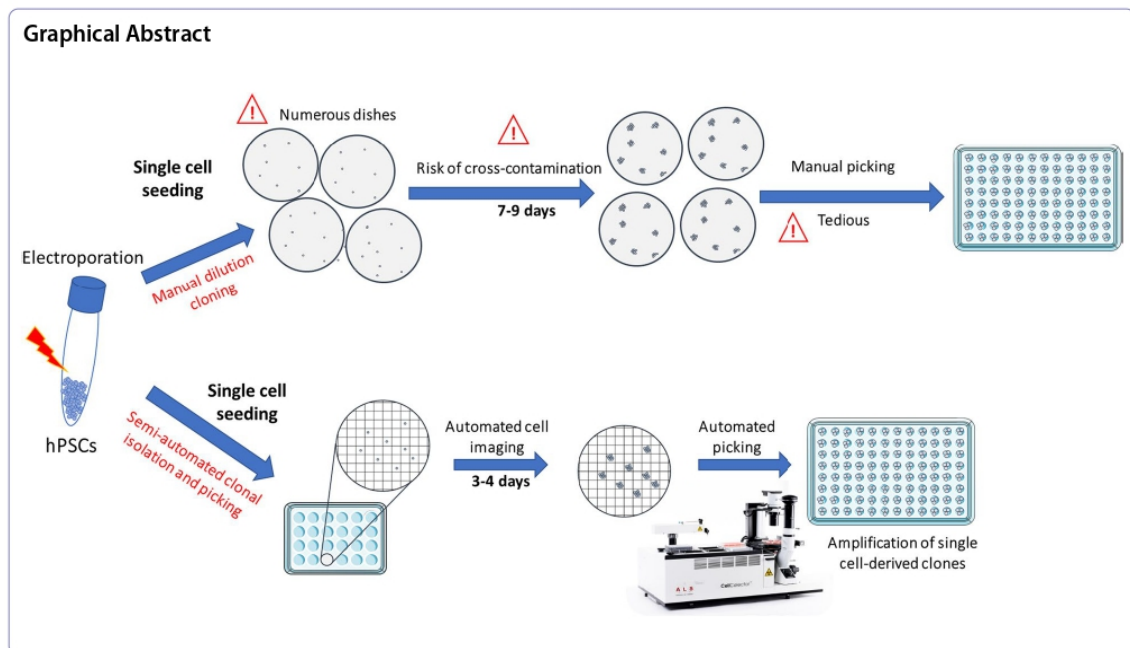
Karim Ben M'Barek

kbenmbarek@istem.fr

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.



Introduction

Disease modeling of human pathologies *in vitro* using human pluripotent stem cells (hPSCs) is exponentially increasing in the scientific community [15, 22]. While retaining self-renewal capacity allowing large-scale expansion, these cells hold the potential to give rise to any differentiated cell type of the adult body if appropriate signaling cues are provided [25]. Thus, hPSCs allow obtaining adult differentiated cells and tissues that would be difficult to obtain otherwise. Indeed, sampling specific cells or tissues from a patient can be traumatic or impossible to perform without taking the risk to cause irreparable damages (e.g., brain areas and retina). Moreover, some organs contain non-proliferating cells that cannot be cultured and amplified after sampling (e.g., neurons).

A variety of differentiation protocols from hPSCs *in vitro* were already developed to generate different adult cell types such as retinal pigment epithelial cells [20], photoreceptors [10], keratinocytes [13] or cardiomyocytes [29]. A drawback of hPSC disease modeling is the need for several genetic disease patient and control cell lines to decipher molecular pathological mechanisms of a specific gene. Gene edition technology overcomes these obstacles and isogenic hPSC models have been generated through gene edition to study the contribution of a specific mutation to a pathology in a controlled genetic background.

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and its CRISPR-associated protein Cas9 is a bacterial mechanism of adaptive immunity that can be used to edit DNA within living cells [1, 16]. Cas9 protein forms a complex with a selected guide RNA to induce a double-stranded break at a targeted locus. DNA repair processes engender a variety of insertions and deletions (indels) at the DNA cleavage site. These indels can result in the knockout of a selected gene. Alternatively, when a homologous DNA template is added concomitantly with CRISPR/Cas9-guide RNA complexes, DNA repair through homology-directed repair elicits a desired modification contained in the DNA template to correct a gene mutation or introduce a novel sequence. More recently, Komor et al. developed a base editor combining catalytically impaired Cas protein associated with a deaminase [18]. Such system allows precise base substitutions to mimic or correct point mutations associated to a pathology. Although recent updates of the CRISPR/Cas9 edition system have been published [23], this method is still limited by its maximum efficiency rate [21, 28]. Indeed, this rate can be variable and depends on guide RNA [23], on the type of Cas9 [17] as well as its delivery method [24, 28]. Therefore, following the gene edition of a cell population, isolation of clones is required to separate non-edited and different types of edited cells [7]. The standard approach consists of manual selection and harvesting of clones in culture dishes plated

with very low cell densities (dilution cloning) [12]. Such approach is time-consuming and labor intensive. In addition, there is a risk that clones could be a mixture of more than one cell. A risk that can be mitigated by two successive dilution clonings.

To overcome these limitations, we developed a novel approach to isolate single cells from a mixed cell population following CRISPR/Cas9 gene editing and to pick colonies derived from these isolated single cells. Our method relies on a semi-automated robotic platform (CellCelector™), which combines an epifluorescence microscope setup associated with a dedicated software allowing automated single cell identification and clonal follow-up, and a robotic arm to collect identified clones. We first showed that this semi-automated method is reliable to isolate single cell-derived clones without mixing cells during cell culture using dedicated CellCelector nanowell culture plates. Then, we demonstrated how this method could be applied for a CRISPR/Cas9 gene editing experiment in hPSCs in order to model a genetic disorder: the Alström Syndrome (AS). This novel method is robust, easier and faster than standard dilution cloning and may be up scaled to generate various gene edition experiments at the same time.

Methods

hPSCs culture

Wild-type hiPSCs PC056c2 were derived by Phenocell (Grasse, France) from human primary fibroblasts using Sendai vectors [2] and cultured with StemMACS iPS-Brew XF medium (Miltenyi Biotec) in vitronectin (Gibco-coated dishes). Culture medium was changed three times a week. Cells were passaged following gentle harvesting with EDTA 0.25 mM (Invitrogen every 5–7 days). For CRISPR/Cas9 editing experiments, hiPSCs were pretreated with a rock inhibitor (Y-27632; Tocris) at least one-hour prior transfection and harvested with an enzymatic treatment (Stempro Accutase cell dissociation reagent; Life technologies). Following amplification of single cell-derived clones, cells were banked using CryoStor CS10 (Sigma-Aldrich).

CRISPR/Cas9 gene editing

For p.Glu192fs mutation, guide RNA (gRNA) was selected based on CRISPOR.org predictions [8]. Twenty possible gRNAs were proposed of which 18 gRNAs with a required MIT specificity score superior to 50. Of these 18 gRNAs, we selected one with both the higher Lindel score (prediction probability of frameshift) and the higher Doench'16 score (predicted cleavage efficiency). One hundred thirty-seven off-targets were predicted with up to four mismatches with the original guide sequence. Of these, the top 15 off-targets were not localized into

an exon. Integrated DNA Technologies (Iowa, USA) synthesized selected gRNA. hiPSCs were plated in 24-well plates at 80–120,000 cells per well. Lipid-based transfection was performed the next day with 15 μM of ribonucleoprotein (RNP) complexes (gRNA, SpCas9 protein), according to the manufacturer's protocol (Lipofectamine Stem Transfection Reagent, ThermoFisher Scientific). SpCas9 purified protein is a gift from Jean-Paul Concordet (MNHN-CNRS UMR 7196/INSERM U1154).

After enzymatic dissociation with Stempro Accutase (Life technologies), 150,000 hiPSCs in 7.5 μL of resuspension buffer (Neon Transfection Kit, Invitrogen) were mixed with 7.5 μL of RNP complexes. The mix was then electroporated at 1200 V/20 ms/2 pulses using 10 μL Neon Tips. For limiting dilution cloning experiments, the cell suspension was plated in several 100-mm culture dishes at different concentrations (1000/2000/5000/10,000 cells/dish). For semi-automated cell picking, cells were seeded in 6-well plates or directly seeded following electroporation in a vitronectin-coated nanowell plate at a density of 3000 cells per well.

For the base editing strategy, different pathogenic nonsense mutations were identified within *ALMS1* using the ClinVar database (NCBI). Among the identified mutations, we selected the p.Gln3613Ter mutation as it consists in a C→T nonsense mutation. A gRNA targeting this position was then designed using CRISPR RGEN Tools and synthesized by Integrated DNA Technologies (Iowa, USA).

After enzymatic dissociation with Stempro Accutase (Life technologies), 150,000 hiPSCs in 10 μL of resuspension buffer (Neon Transfection Kit, Invitrogen) were mixed with 10 μL of RNA AncBE4max (pCMV_AncBE4max_P2A_GFP was a gift from David Liu (Addgene plasmid # 112100; <http://n2t.net/addgene:112100>; RRID: Addgene_112100)) and 2.5 pmol gRNA. The mix was then electroporated using the same protocol. For semi-automated cell picking, cells were seeded in a vitronectin-coated nanowell plate at a density of 3,000 cells per well.

Sequence analysis

Genomic DNA was extracted with QuickExtract DNA extraction solution (Lucigen) according to the manufacturer's instructions. PCR amplification corresponding to the edited DNA sequence (p.Glu192fs: forward primer: TATACACTGGCAGCGGCG; reverse primer: TCTGTAGAGACCTACTCAGAGGG; p.Gln3613Ter: forward primer: CCCGTACACCTACCAAGTGA; reverse primer: CATCATCGAGCTGGGAGGTC) was subjected to Sanger sequencing (Genewiz, Germany). To evaluate edition rates, decomposition of quantitative sequence

trace data was based on TIDE [4]. Sequence analysis was performed using Snapgene software (Insightful Science).

CellCelector clonal isolation

24-well nanowell plates (ALS, Germany) were coated with vitronectin (Gibco) and centrifugated for 5 min at 1258 g (to eliminate micro-bubbles) prior to incubation at 37 °C for 1 h. Approximately 3000 cells were seeded per well (4300 square-shaped nanowells in total in a well of a 24-well plate). Seeded cells are randomly distributed in nanowells following Poisson distribution resulting in ~30% of nanowells occupied with single cells.

After cell seeding, plates were centrifuged again for 3 min at 100 g to allow all cells to be captured in nanowells. Nanowells with seeded cells were automatically scanned on the CellCelector system (ALS, Germany) on D0 just after cell seeding. Identification of single cell nanowells on D0 was performed using a specific image analysis algorithm using CellCelector software (v3.1) including gating with single cell size and sphericity. At time of picking on D3-5, the nanowell plate was scanned again and the system automatically selected single cell-derived colonies based on their outgrowth. Selected single cell-derived colonies were detached with Stempro Accutase (Life technologies) just prior to picking run. Single-use CellCelector glass capillaries (ALS, Germany) with internal diameter of 80 µm with aspiration volume of 0.5 µL were used for picking. The tip of the capillary was calibrated at the height of approximately 80 µm from the bottom of nanowells. Colonies were deposited in a vitronectin-coated 96-well plate with 200 µL of StemMACS iPS-Brew XF medium (Miltenyi Biotec) containing rock inhibitor. Cell growth was followed using INCUCYTE S3 (Sartorius).

Flow cytometry

Cells were dissociated with TrypLE (ThermoFisher) and stained with TRA1-81-AF647 (Biolegend) or SSEA-4-PE (Miltenyi Biotec) and corresponding isotypes from the same suppliers. For intracellular markers, cells were fixed with 4% PFA following dissociation. Cells were treated with PBS 0.1% tritonX100 and then incubated overnight with OCT3/4 (Santa Cruz, sc-5279, 1:100) and LIN28A (R&D SYSTEMS, AF3757, 1:200). The day after, cells were washed and incubated with corresponding secondary antibodies (Invitrogen). Acquisitions were done with a MACSQuant analyzer (Miltenyi Biotec) and data were analyzed using the FlowJo software.

Immunofluorescence

After fixation with 4% PFA for 15 min at room temperature, cells were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: OCT3/4 (Santa Cruz,

sc-5279, 1:100), LIN28A (R&D SYSTEMS, AF3757, 1:200), Pericentrin (Abcam, ab28144, 1:200) and ALMS1 (Abcam, ab84892, 1:200). Appropriate Alexa fluorescent secondary antibodies (Invitrogen) and DAPI were added for 1 h. Image acquisitions were performed on a Zeiss LSM880-Airyscan Confocal Microscope driven by the Zeiss Zen black software.

Single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis

High-quality genomic DNA was obtained with Nucleospin Tissue kit (Macherey Nagel) according to manufacturer instruction. gDNA hybridization was achieved on Infinium Core-24v1-2 BeadChip (Illumina). Data were analyzed with GenomeStudio v2.0.5 software (Illumina).

Multiplex fluorescence in situ hybridization (mFISH) karyotype analysis

Cells were blocked in metaphase with colchicine (Eurobio) for 90 min and then they were detached with trypsin. After centrifugation, the supernatant was removed and cell pellet was suspended and warmed in a hypotonic solution for several minutes and then fixed with a Carnoy fixative. Drops of the cell suspension were spread on glass slides and let to dry. mFISH 24Xcite probe (MetaSystems) and ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI (Thermo Fisher Scientific) were used for mFISH staining. Seventy metaphases were acquired with Metafer MetaSystems software coupled to an AxioImager Zeiss Z2 microscope furnished with a camera cool cube and 10X and 63X objectives. Images were analyzed with Isis software (MetaSystems).

Results

Accurate algorithmic identification of square-shaped nanowells

Current hPSC culture methods involve passaging as small clumps/aggregates to prevent cell death or cellular stress and to prevent the risk of genetic alterations [11]. Following gene edition, hPSCs need to be isolated as single cells for further clonal isolation and genotype selection. To minimize space taken by many culture dishes seeded at low cell dilution, we used one well of a 24-well plate (Fig. 1A). This well is micro-structured with square nanowells (volume of approximately 4 nL). In that context, the presence of nanowells allows to increase cell density in the well, while keeping single cells efficiently separated from each other by nanowell walls, yet covered by the same medium. This enables to co-culture in adherence cells in the same large macro-well while maintaining their monoclonality. Endogenous factors secreted by hPSCs that favor pluripotency and support clonal proliferation may be more concentrated, reducing therefore cellular stress [14].

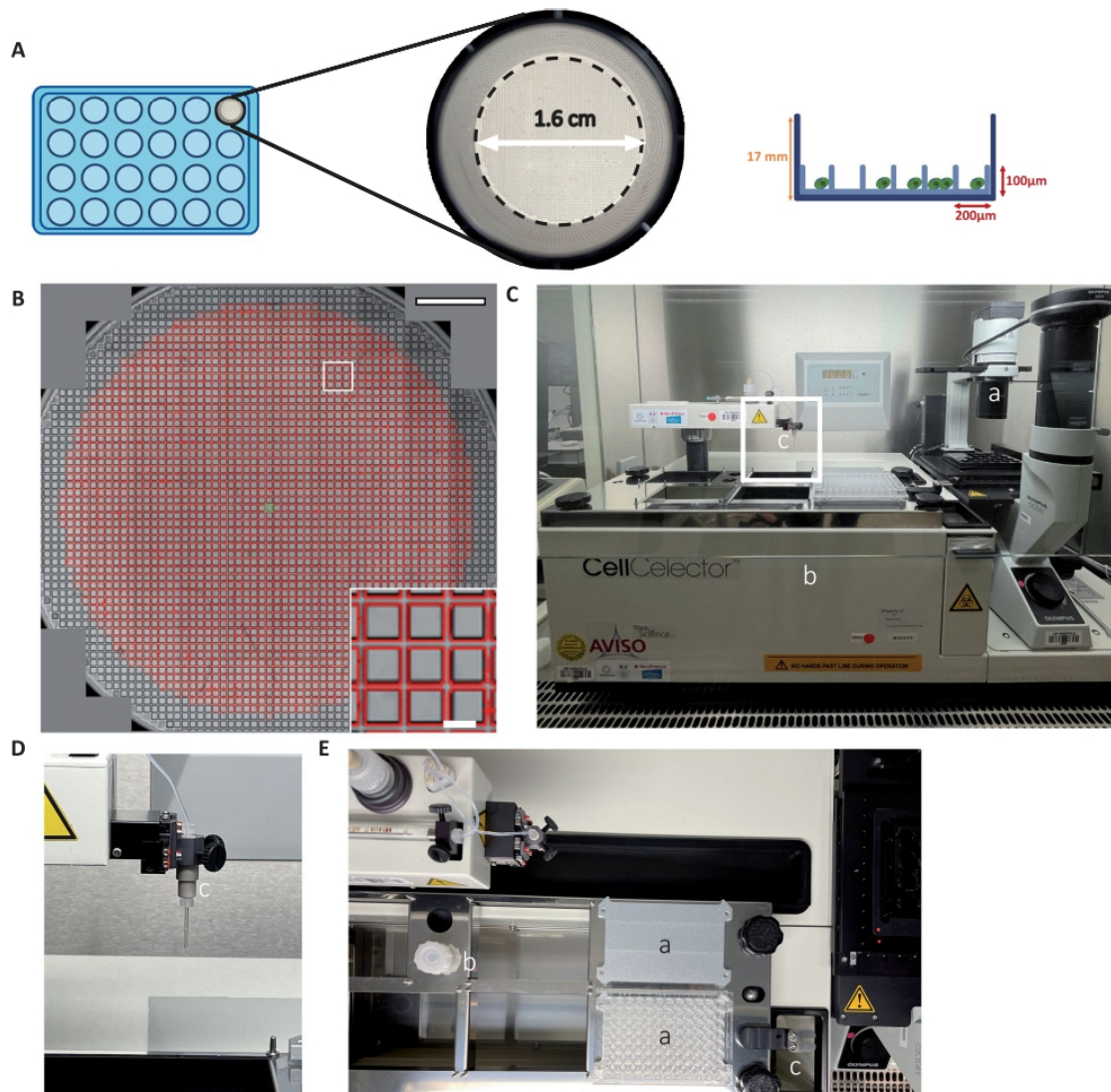


Fig. 1 Algorithm identification of square-shaped nanowells. **A** Illustration of a CellCelector 24-well nanowell plate. Each nanowell forms a square ($200 \times 200 \mu\text{m}$) delimited by $100 \mu\text{m}$ height walls. Well diameter = 1.6 cm . **B** Automated segmentation of nanowells in the automatically stitched whole well image. In each representative well, the software identifies by segmentation 2263 square-shaped nanowells (1 mm peripheral region of the well is not analyzed). Each identified nanowell is surrounded by red lines and assigned a unique ID for traceability through the experiment. Insert corresponds to magnified area. Scale bar = 2 mm and for magnification = $200 \mu\text{m}$. **C**. Overview of the CellCelector™ system: (a) inverted fluorescence microscope and motorized stage; (b) platform to receive destination plates and (c) cell picking robotized arm with high-precision glass capillary (magnification in **D**). **E** Upper view of the robotic system: the platform is composed of dedicated areas: (a) destination plates, (b) sterilization tank and (c) waste container

We evaluated first the ability of the software algorithm to isolate individual nanowells. The algorithm was able to recognize and segment 2031 ± 34 individual squares

in a well of a 24-well plate (Fig. 1B). Thus, this number corresponds to theoretical single cells that can grow

separately in each individual identified nanowells to form clones that can be collected.

Single cells grow in adherence inside nanowells and form colonies pickable using a robotized arm

To identify single cells in nanowells and collect single cell-derived clones, we used the CellCelector™ automated system composed of a standard inverted fluorescent microscope equipped with a camera, a motorized stage and a robotized arm with a mounted thin glass capillary (Fig. 1C–E). This system is associated with a software

that allows precise detection of single cells in nanowells and selection of single cell-derived colonies. In order to validate the ability of this system to recognize, select and pick hPSC clones, we generated two knock-in hPSC lines with constitutive expression of GFP or mCherry, the transgenes being inserted into adeno-associated virus integration site 1 (AAVSI) locus (Additional file 1: Fig. S1). We then mixed in equal proportions label-free, GFP- and mCherry-expressing hPSCs before seeding them as single cells into square-shaped nanowells (Fig. 2A). After cell seeding on day zero (D0), the integrated imaging

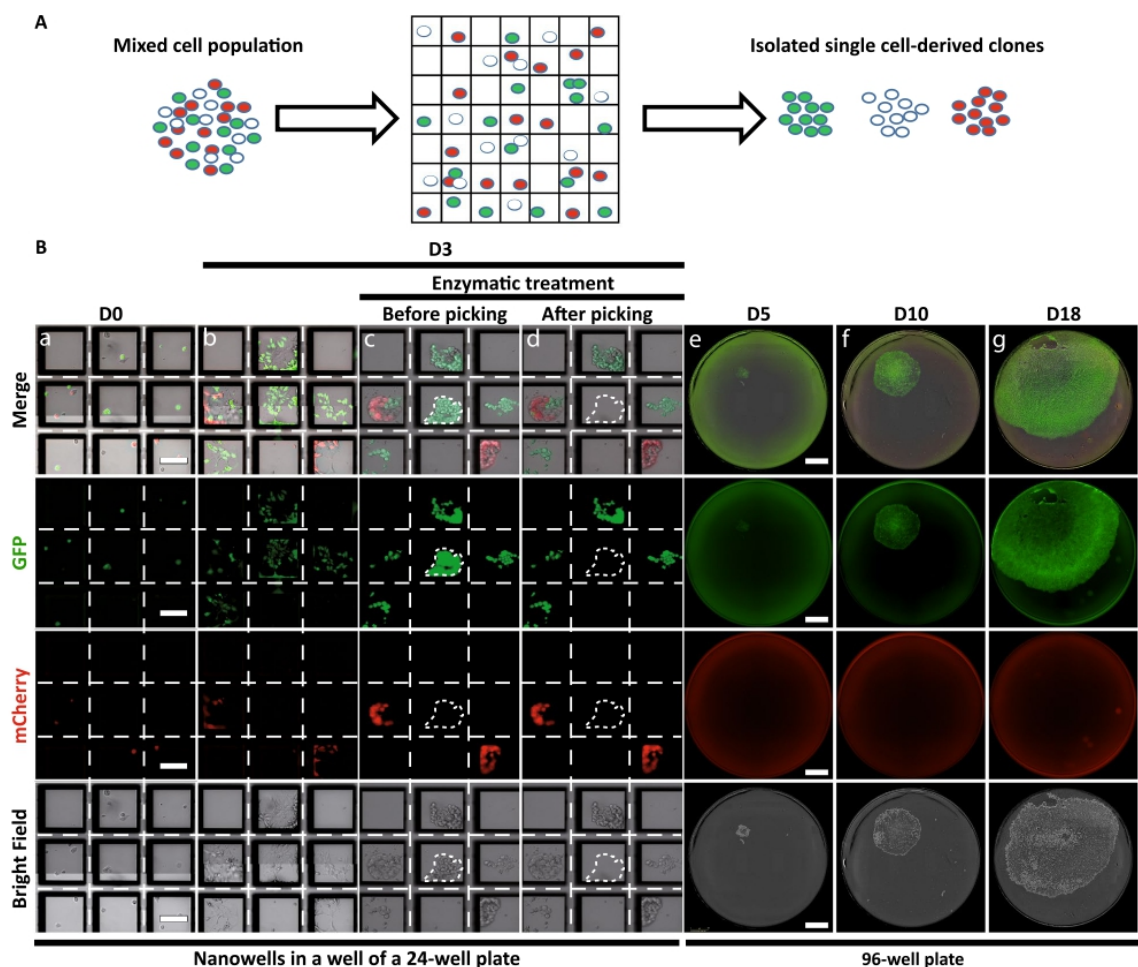


Fig. 2 Automated isolation of single cell-derived clones in nanowells. **A** Schematic representation of the automated isolation of single cell-derived hPSC clones. A mixed population of label-free, mCherry- and GFP-labeled hiPSCs are mixed (1:1:1) prior single cell seeding into nanowell plates and automated clone picking. **B** Representative images of label-free hiPSCs, GFP-hiPSCs and mCherry-hiPSCs seeded as single cells at day 0 (D0; a), at 3 days (D3) of culture within nanowells (b), after enzymatic treatment to harvest clones (c) and after picking by the automated arm of the CellCelector™ (d). The selected square-shaped micro-pattern for picking is at the center of the image. The picked single cell-derived clone is highlighted with dotted lines in panels (c) and (d). Following picking, colonies are deposited into a 96-well plate where their growth is followed by imaging at D5, D10 and D18 (e, f, g). Scale bar in 24-well plate images = 100 μ m; scale bar in 96-well plate images = 500 μ m

setup scanned the seeded wells to automatically identify nanowells containing only one cell, thus providing a robust and documented image-based monoclonality proof (Fig. 2B). On day 3 (D3), a second scan was performed to automatically identify grown hPSC colonies derived from single cells according to the spatial position of each nanowell in the well. An enzymatic treatment with Accutase[®] was applied to gently harvest colonies that grew in adherence. The robotic arm was then used to collect selected single cell-derived clones and to transfer them into a new 96-well culture plate (Additional file 2: Movie 1). Following a few additional days of proliferation, cells were imaged and analyzed for single cell clonality. We showed that this semi-automated system selectively picked colonies without contamination from neighboring cells (expressing another fluorescent protein or without fluorescence) and/or significant loss of cell survival during the collection process.

No cross-contamination following sequential cell colony picking using the same capillary

As the glass capillary is not changed between each individual picks, we evaluated if using the same capillary to pick several single cell-derived colonies sequentially would result in any cross-contamination (Fig. 3). We collected single cell-derived colonies of different single labeling (label-free, GFP or mCherry fluorescence). We did not observe fluorescent color mixing between different consecutive single cell-derived clone pickings and amplification. Thus, we showed that sequential picking of different colonies did not induce cross-contamination.

CRISPR/Cas9 gene edited hPSCs are efficiently isolated using a semi-automated method

As a proof of concept, we selected the *ALMS1* gene for CRISPR/Cas9 editing to create a Knockout model of AS. *ALMS1* is composed of 23 exons and codes for a protein of 4169 amino acids [9]. We targeted the exon 3 (near the 5' end of the coding region) to identify potential guide RNAs for CRISPR/Cas9 edition for which indels may cause a major deletion into the resulting protein. Based on in silico analysis, we selected a guide RNA out of 20 with best-predicted performances (Fig. 4B). We evaluated the efficiency of gene edition using either electroporation or lipofection approaches using this same guide RNA. Sequence analysis of edited cell pools revealed that electroporation engendered significantly more indels than lipofection (77% versus 19% respectively; Fig. 4C).

(See figure on next page.)

Fig. 3 Sequential automated picking of single cell-derived clones does not engender cross-contamination. **A** Representative images of 96-well plate containing single cell-derived colonies 11 days after automated cell picking. The picking order started from A1 to H1, A2 to H2 and finally A3 to D3. Colonies are surrounded with white lines. Scale bar = 4 cm. **B** Magnification of wells F1, G1 and H1. Picking order started from F1 to H1. Scale bar = 2 cm

Following sequence trace decomposition of SANGER sequencing, we estimated the frequency and types of indels. Lipofection induced a diversity of indels at low frequencies whereas electroporation with the same guide engendered mostly one nucleotide insertion (thymine, Fig. 4D, E). This last type of edition *ALMS1* p.Glu192fs was predicted to induce a frameshift that can lead to a premature stop codon (resulting in a shortened protein of 220 amino acids; Fig. 4F). We then dissociated this edited hPSCs population as single cell and seeded the cells in square-shaped nanowells. Single cell-derived colonies were identified by the software algorithm and picked using the CellCeletor[™] robot. Sequence analysis of single cell-derived clones allowed to detect pure clones bearing the desired mutation (+ 1 insertion; Fig. 4G).

CRISPR/Cas9 gene edited clones maintained their pluripotency and genetic integrity following isolation and banking

Single cell-derived hPSC clones of interest were amplified and banked. We then evaluated the pluripotency state and genomic integrity of hPSCs following gene edition, semi-automated clonal isolation and cell banking of amplified clones. Using immunofluorescence for pluripotency markers, we showed that isolated clones maintained a pluripotency state as evaluated by the expression of OCT3/4 and LIN28 (Fig. 5A). Flow cytometry analysis for cell surface markers Tra1-81 and SSEA-4 confirmed also pluripotency (Fig. 5C). Genomic integrity was evaluated by karyotype and single-nucleotide polymorphism (SNP) comparison between parental hPSCs and edited clones following amplification and banking (Fig. 5B and Additional file 3: Fig. S2). We did not find neither chromosomal aberrations nor genetic variations between parental and the majority of edited cell lines, suggesting that genomic integrity was preserved during the process. We next evaluated by immunofluorescence the presence of ALMS1. The protein was present at the centrosome (co-expression with Pericentrin) in both WT and edited cells (Fig. 5D). Thus, the in silico prediction was not verified with this particular mutation as the antibody epitope is localized after the mutation.

We also applied this semi-automated method to isolated CRISPR/Cas9 gene edited clones obtained with a base editing approach. We identified a guide RNA to induce a base substitution at a key locus that engenders a premature termination codon (*ALMS1* p.Gln3613Ter) (Fig. 6A). This point mutation is a phenocopy of an

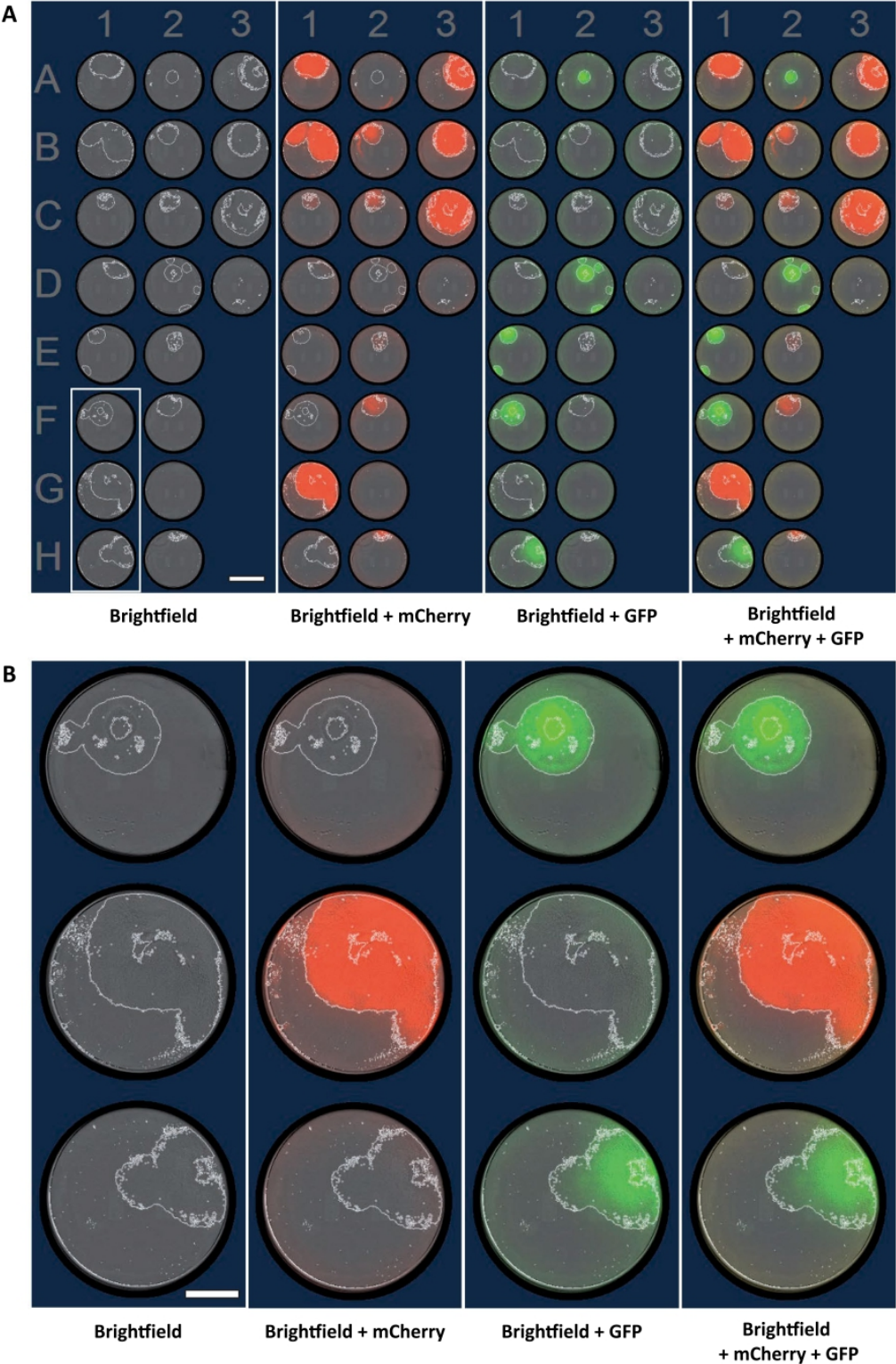


Fig. 3 (See legend on previous page.)

already identified pathological mutation (CLINVAR NCBI website). We edited cells using an electroporation approach. Sequence trace decomposition of SANGER sequencing revealed a base editing rate of 78% (Fig. 6B). After edition, single cells were seeded into nanowells and single cell-derived colonies were collected 3–4 days later. Colonies were banked and analyzed for pluripotency markers (immunofluorescence and flow cytometry; Fig. 6C–E), and genetic integrity (karyotype and SNP comparison to original hiPSCs; Fig. 6H). Base editing and clonal isolation did not affect cell quality. Immunofluorescence for ALMS1 revealed the absence of the protein in edited cell confirming the protein loss (Fig. 6F, G).

Discussion

Herein, we developed a semi-automated method to isolate single cell-derived hPSC clones cultured in adherence. Dissociated cells were seeded into square-shaped nanowells inside wells of a 24-well plate. We identified single cells and followed their proliferation for several days with microscopic image recordings to ensure the traceability of clonality. Colonies were then picked up using a robotic arm and subcultured into new culture plates. We successfully implemented this method to isolate single cell-derived clones from CRISPR/Cas9 gene edited hPSCs. Finally, we developed a simple workflow from hPSC gene editing to clonal isolation and cell banking (Fig. 4A).

Current standard clonal isolation of hPSCs involves dissociation as single cells and manual dilution at very low cell density in numerous culture dishes. This approach is tedious and labor-intensive. Our semi-automated clonal isolation method is faster and more robust than standard dilution cloning. Firstly, we reduce the burden of handling numerous culture dishes by using only one nanowell-containing well of a 24-well plate for each type of cell line/experiment. Indeed, beside the method used to isolate single cells, all cells will not recover and form colonies: an estimation of 1% of hPSCs may survive [27]. This survival rate is improved up to 27% with the addition of rock inhibitor [27]. Thus, the cell culture in micro-pattern nanowells allows the selection and amplification

of potentially 2000 collectable single cells in the same well of a 24-well plate (corresponding to twenty 96-well plates). Our method does not improve survival rates but increases the number of cells followed (throughput) to diminish the effects of these losses. Using this approach, only cells that are proliferative, are subsequently collected and subcultured into new plates. Our strategy is therefore different from cell dispensers or cell sorters that dispatch single cells in wells of 96-well plates or equivalent [5, 26].

Secondly, nanowells allow the separation of one cell from another and a microscopic image allows the follow-up of each single cell growing as a new colony (traceability of clonality). At the opposite, traceability of cultured cells is limited when cells are dispatched with dilution cloning without using adapted separating wells: hPSCs are susceptible to migrate, proliferate and form colonies that could further split into two other colonies or could fuse to form mixed colonies [6]. This risk of non-clonal colony formation is mitigated by low-density cell seeding [19]. Some protocols even recommend two sequential manual dilution clonings to ensure single cell-derived colonies [3].

Thirdly, identified single cell-derived colonies are picked and subcultured based on acquired microscopy images with a robotic arm. This automated picking is an advantage as it suppresses human manipulations and associated risks (fungi/bacterial contamination, picking errors).

Efficiency of gene editing using CRISPR/Cas9 or other editing strategies is variable and depends on numerous factors (e.g., gene locus, Cas9 variant, gRNA, etc.). When editing efficiency is low, a high number of clones need to be isolated to obtain the few clones that are homozygotes for the desired mutation [5]. Thus, some protocols combined CRISPR/Cas9 editing with fluorescence-activated cell sorting to isolate single cell-derived clones into wells of 96-well plates [5]. This engenders the handling of an important number of plates. In addition, in this context, cell sorting is stressful and cell survival is low (about 29–47% of sorted cells will form colonies). Our semi-automatic method

(See figure on next page.)

Fig. 4 Induction of a frameshift mutation in ALMS1 with CRISPR/Cas9 gene editing. **A** Workflow from gene edition to single cell-derived clone semi-automated isolation and amplification. **B** Schematic representation of the targeted area (exon 3 of ALMS1 gene) by CRISPR/ Cas9 with the selected gRNA. PAM = protospacer adjacent motif. **C** Quantification of the percentage of indels following CRISPR/Cas9 according to the mode of transfection. Electroporation method leads to a higher rate of indel events within the cell population compared to lipofection. **D** Evaluation of the percentage of indels according to the nucleotide position. (0 corresponds to the Cas9 cleavage site). **E** Evaluation of the probability of nucleotide insertion according to the type of transfection based on sequencing results. **F** Comparison of the predicted amino acid sequence of ALMS1 protein in WT cells and KO purified clones (with + 1 bp insertion). Following gene edition, the sequence of amino acids is modified (red letters) and a STOP codon appears quickly downstream of the insertion site (red star). **G** Sequences of the site of gene edition before CRISPR/Cas9 editing (wild type); following edition in a representative edited cell population (knock out pooled cells), and in a representative single cell-derived clone using the semi-automated method. The gRNA is underlined in black and the PAM motif in red. The dotted black line corresponds to the Cas9 cleavage site. Mean of 3 independent experiments

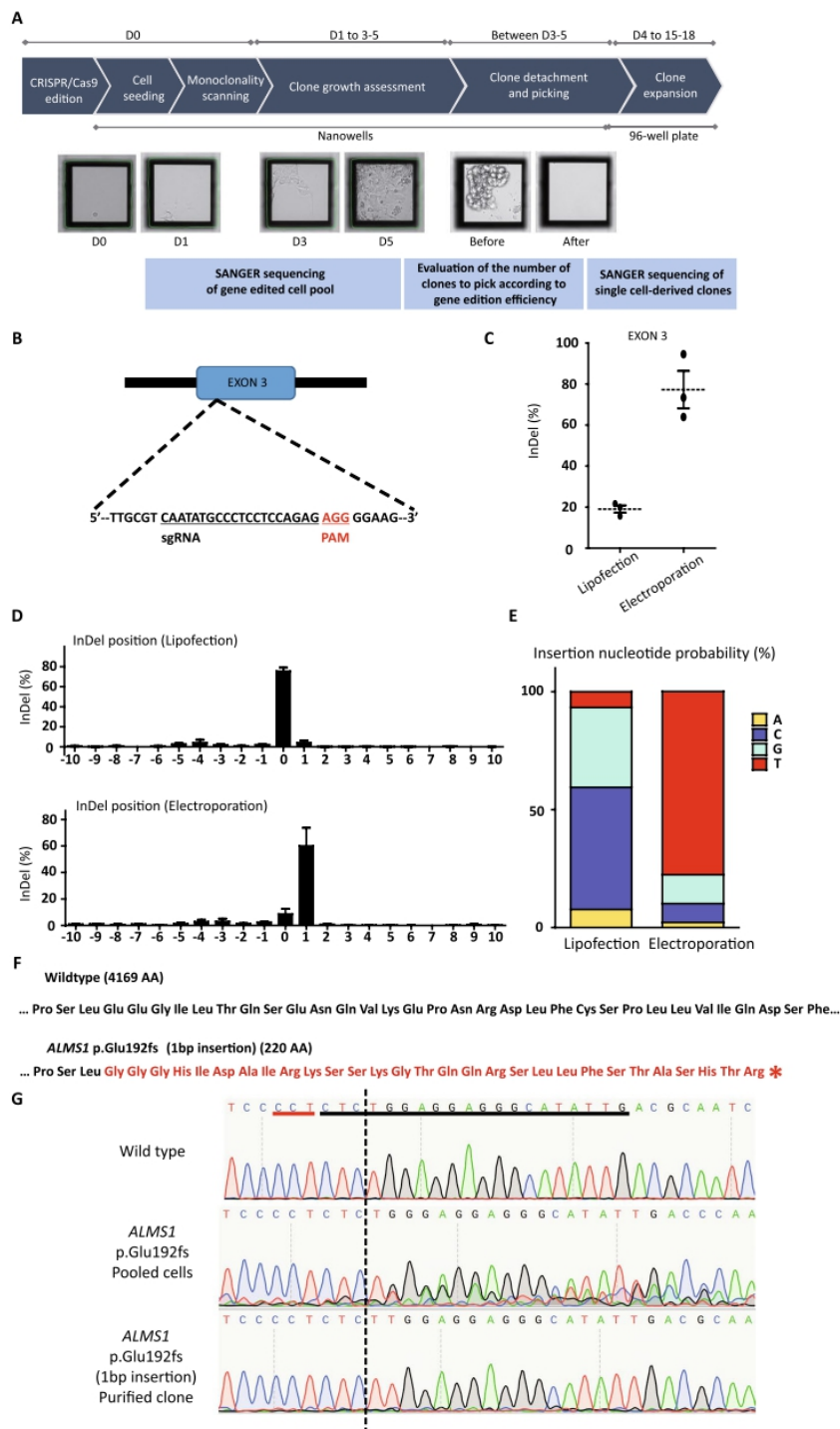


Fig. 4 (See legend on previous page.)

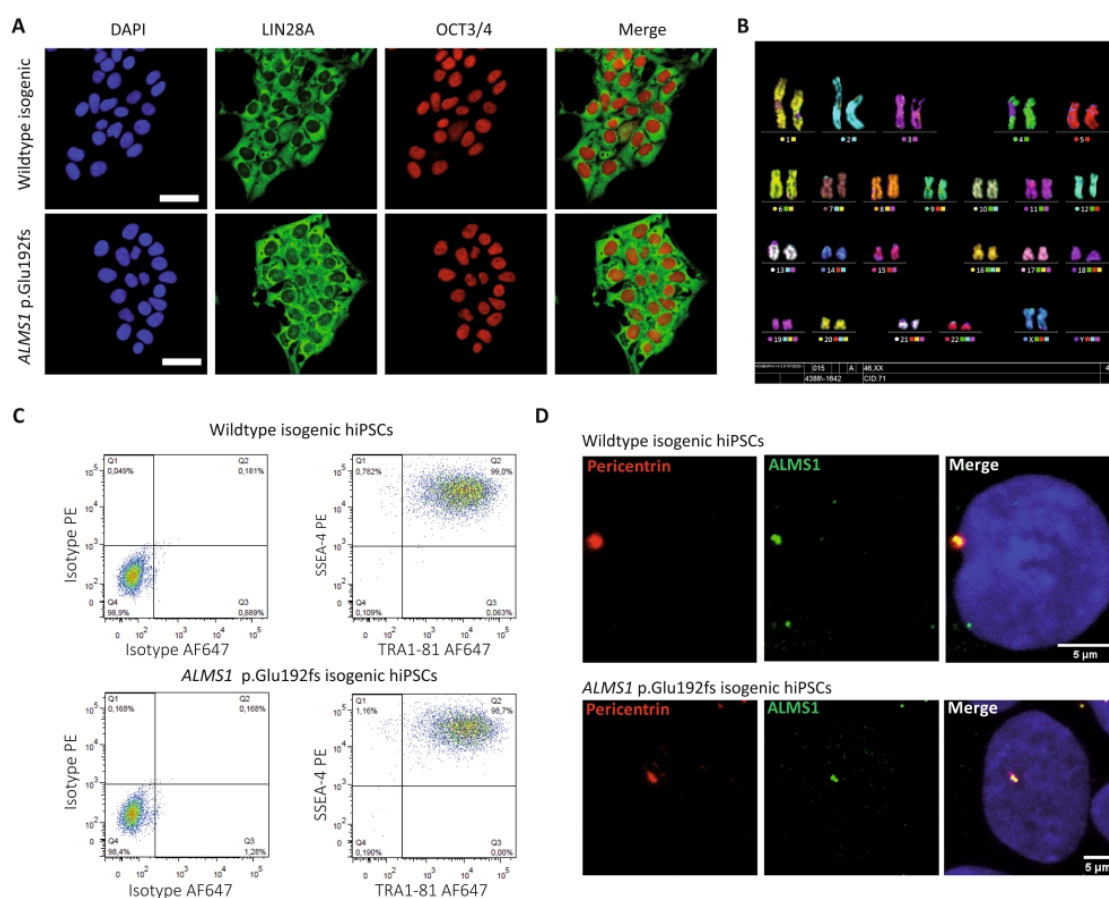


Fig. 5 Single cell-derived clones CRISPR/Cas9 edited remain pluripotent and without genomic aberrations. **A** Immunofluorescence images of hPSC colonies (WT before selection and p.Glu192fs purified clone) stained for pluripotency markers OCT3/4 (red) and LIN28a (green). Scale bar = 50 μ m. **B** Karyotype of a p.Glu192fs purified clone. **C** Flow cytometry analysis of pluripotency markers TRA1-81 and SSEA-4 on WT before selection (upper panel) and p.Glu192fs hPSCs (lower panel). **D** Immunofluorescence images of hPSCs stained for Pericentrin (red) and ALMS1 (green). Scale bar = 5 μ m

(See figure on next page.)

Fig. 6 CRISPR/Cas9 base editing and single cell-derived clone characterization. **A** Schematic representation of the region (exon 16 in ALMS1 gene) targeted by CRISPR/Cas9 with the selected gRNA. **B** SANGER sequences of the site of edition before CRISPR/Cas9 base editing (WT before selection; upper panel), following edition in a representative edited cell population (pooled cells; middle panel), and in a representative single cell-derived clone using the semi-automated method (lower panel). The gRNA is underlined in black and the PAM motif in red. The dotted rectangle corresponds to the position targeted for base editing. **C** Immunofluorescence assay using pluripotency markers (OCT3/4 and LIN28A) on WT before selection and p.Gln3613Ter purified hPSC clone (lower panel). Scale bar = 50 μ m. **D, E** Evaluation of pluripotency of p.Gln3613Ter and p.Glu192fs hPSCs by flow cytometry (pluripotency markers OCT3/4 and LIN28A (**D**) and TRA1-81 and SSEA-4 (**E**)). **F** Immunofluorescence assay showing the expression of Pericentrin (red) and ALMS1 (green) on WT (upper panel) and p.Gln3613Ter purified hPSC clone (lower). Scale bar = 5 μ m. **G** Quantification of ALMS1 area (μ m²) co-localized with Pericentrin according to the genotype (wild type, p.Glu192fs, p.Gln3613Ter). **H** Karyotype of the p.Gln3613Ter purified hPSC clone

is particularly adapted to such experiments with the combination of nanowell cultures and automated picking. We developed a workflow from gene edition and seeding on the same day in nanowells to the automated

picking and subculture into new plates. In particular, the time interval between cell seeding and picking (3–4 days) allows to analyze the pool of edited cells to estimate edition efficiency and adapt accordingly the

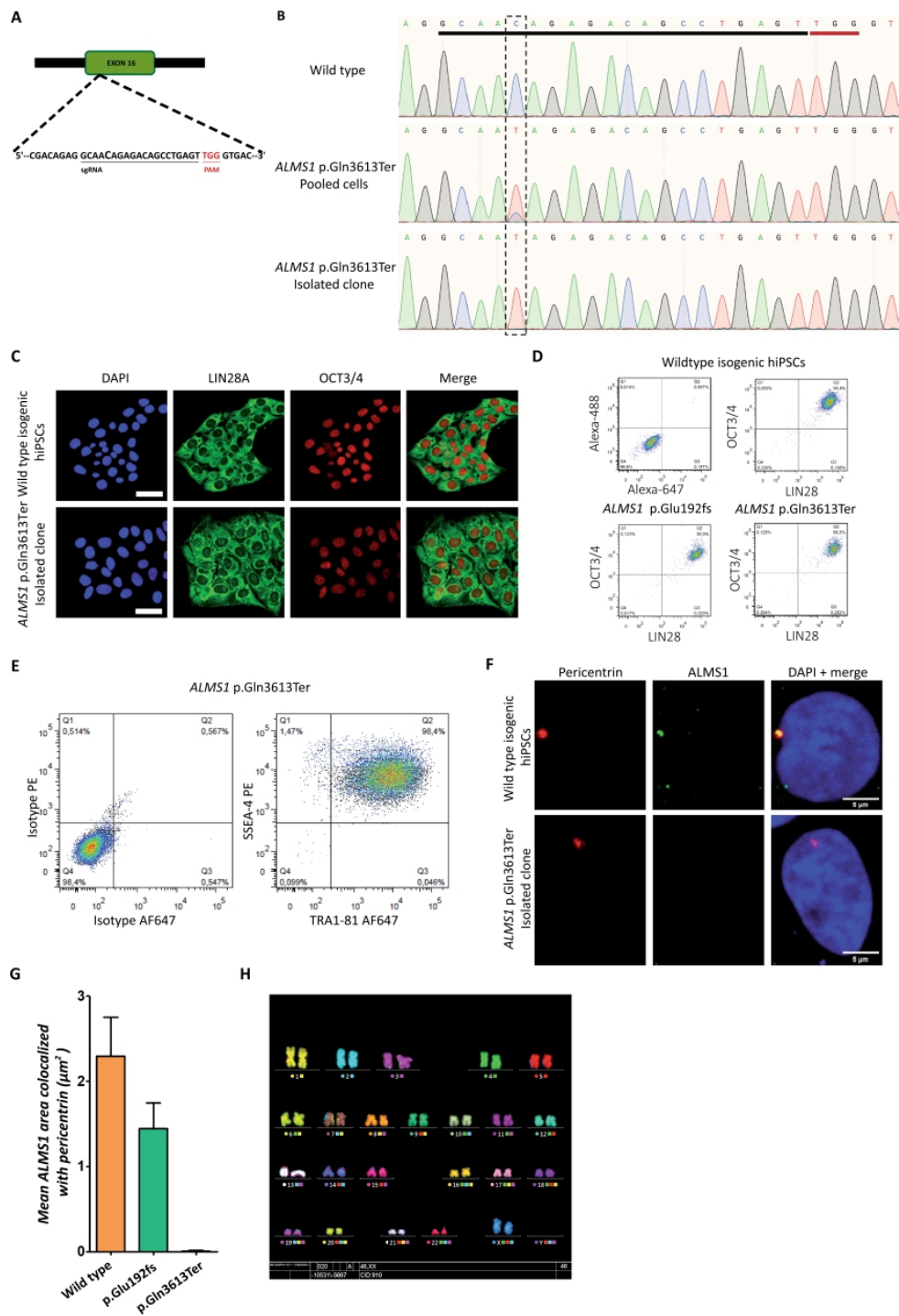


Fig. 6 (See legend on previous page.)

number of single cell-derived clones to collect. Of note, additional testing may be required to fully demonstrate pluripotency of the cells that have undergone the whole selection process (ability to differentiate into the three germ layers).

Finally, the workflow that we developed is compatible with upscaling and several gene edition experiments can be performed at the same time in different wells of 24-well plate (each well being treated independently). Following amplification of single cell-derived hPSC clones, these cells can be used for downstream applications including identification of molecular mechanisms or high throughput drug screenings.

Conclusions

We developed a semi-automated method to isolate reliably single cell-derived clones following gene edition with reduced manual handling, reduced number of culture dishes and increased traceability. This method is completely different from other automated methods that essentially rely on cell dispensers' strategies following gene edition into 96-well plates. This new semi-automated method will be useful for the hPSC research community allowing efficient generation of hPSCs modeling genetic disorders or for the study of gene functions.

Abbreviations

hPSCs	Human pluripotent stem cells
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
Indels	Insertions and deletions
DNA	Deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
AS	Alström syndrome
gRNA	Guide RNA
RNP	Ribonucleoprotein
SNP	Single-nucleotide polymorphism
mFISH	Multiplex fluorescence in situ hybridization

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03327-2>.

Additional file 1: Fig. S1. Upper panel: Design of CRISPR/Cas9 edition into AAVS1 locus and donor DNA insertion to generate hiPSCs with constitutive expression of GFP and mCherry. Middle panel: Flow cytometry analysis of pluripotency markers SSEA-4 and TRA1-81 of edited hPSCs. Lower panel: images of edited hiPSCs with constitutive expression of GFP or mCherry.

Additional file 2: Movie 1. Automated picking of single cell-derived hiPSC clones and seeding into new plates.

Additional file 3: Fig. S2. A Single-nucleotide polymorphism-comparative analysis of parental cells and a representative edited single cell-derived hiPSC clone. B Table recapitulating the comparative analysis of original hiPSCs and clones derived with ALMS1 p.Glu192fs and ALMS1 p.Gln3613Ter mutations. C Number of clones analyzed for SNPs according to the CRISPR/Cas9 experiment.

Acknowledgements

Some elements of figures were created using Servier Medical Art templates (<https://smart.servier.com>), which are licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Un-ported License. The authors greatly acknowledge Peggy SANATINE from institute GENETHON, part of the OCCIGEN facility of Genopole (Evry, France), first French biocluster dedicated to genetic diseases and biotherapies, for precious help in the cell sorting of fluorescent cells.

Author contributions

EF; MC performed experiments related to gene edition, cell culture, IF, automated clonal isolation; CN set up single cell analysis with CellCelector software; PF performed and analyzed experiments to produce hPSCs with constitutive GFP or mCherry expression; JP analyzed immunofluorescence images; EH performed flow cytometry experiments; LEK and KGT performed experiments and analyzed genomic integrity of hPSCs; EF; MC; CM; KB designed the study and discussed the data. EF; CM; KB wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

EF is recipient of a Ph.D. fellowship from the French Ministry of Higher Education and Research. I-Stem is part of the Biotherapies Institute for Rare Diseases supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM)-Téléthon. The funding bodies played no role in the design of the study and collection, analysis and interpretation of data and in writing the manuscript.

Availability of data and materials

Data and cell materials presented in this study are available upon request. SANGER sequences and SNP datasets are available at Mendeley data (<https://doi.org/10.17632/s94y6mw87f.1>).

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

C.N. is an employee of ALS Automated Lab Solutions GmbH. All other authors declare no competing interests.

Author details

¹INSERM U861, I-Stem, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic Diseases, 91100 Corbeil-Essonnes, France. ²U861, I-Stem, AFM, Université Paris-Saclay, Université d'Evry, 91100 Corbeil-Essonnes, France. ³ALS Automated Lab Solutions GmbH, 07745 Jena, Germany. ⁴CECS, Centre d'étude des cellules souches, 91100 Corbeil-Essonnes, France.

Received: 14 December 2022 Accepted: 4 April 2023

Published online: 27 April 2023

References

- Asmamaw M, Zawdie B. Mechanism and applications of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Biol Targets Ther.* 2021;15:353–61.
- Barrault L, Gide J, Qing T, Lesueur L, Tost J, Denis JA, Cailleret M, Aubry L, Peschanski M, Martinat C, et al. Expression of miRNAs from the imprinted DLK1/DIO3 locus signals the osteogenic potential of human pluripotent stem cells. *Cells.* 2019;8:1523.
- Bower OJ, McCarthy A, Lea RA, Alanis-Lobato G, Zohren J, Gerri C, Turner JMA, Niakon KK. Generating CRISPR-Cas9-mediated null mutations and screening targeting efficiency in human pluripotent stem cells. *Curr Protoc.* 2021;1:e232.
- Brinkman EK, Chen T, Amendola M, van Steensel B. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:e168.
- Caillaud A, Leveque A, Thedreux A, Girardeau A, Canac R, Bray L, Baudic M, Barc J, Gaborit N, Lamirault G, et al. FACS-assisted CRISPR-Cas9

- genome editing of human induced pluripotent stem cells. *STAR Protoc.* 2022;3:101680.
6. Chang J, Kim MH, Agung E, Senda S, Kino-Oka M. Effect of migratory behaviors on human induced pluripotent stem cell colony formation on different extracellular matrix proteins. *Regen Ther.* 2019;10:27–35.
 7. Choi DK, Kim YK, HoonYu J, Min SH, Park SW. Genome editing of hPSCs: Recent progress in hPSC-based disease modeling for understanding disease mechanisms. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2021;181:271–87.
 8. Concordet JP, Haeussler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res.* 2018;46:W242–5.
 9. Eintracht J, Forsythe E, May-Simera H, Moosajee M. Translational readthrough of ciliopathy genes BBS2 and ALMS1 restores protein, ciliogenesis and function in patient fibroblasts. *EBioMedicine.* 2021;70:103515.
 10. 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.* 2019;71:1–25.
 11. Garitaonandia I, Amir H, Boscolo FS, Wambua GK, Schultheisz HL, Sabatini K, Morey R, Waltz S, Wang YC, Tran H, et al. Increased risk of genetic and epigenetic instability in human embryonic stem cells associated with specific culture conditions. *PLoS ONE.* 2015;10:e0118307.
 12. Giuliano CJ, Lin A, Girish V, Sheltzer JM. Generating single cell-derived knockout clones in mammalian cells with CRISPR/Cas9. *Curr Protoc Mol Biol.* 2019;128:e100.
 13. Guenou H, Nissan X, Larcher F, Feteira J, Lemaire G, Saidani M, Del Rio M, Barrault CC, Bernard FX, Peschanski M, et al. Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet.* 2009;374:1745–53.
 14. Hsiao C, Palecek SP. Microwell regulation of pluripotent stem cell self-renewal and differentiation. *BioNanoScience.* 2012;2:266–76.
 15. Jang J, Yoo JE, Lee JA, Lee DR, Kim JY, Huh YJ, Kim DS, Park CY, Hwang DY, Kim HS, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells: a platform for human disease modeling and drug discovery. *Exp Mol Med.* 2012;44:202–13.
 16. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337:816–21.
 17. Koblan LW, Doman JL, Wilson C, Levy JM, Tay T, Newby GA, Maianti JP, Raguram A, Liu DR. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. *Nat Biotechnol.* 2018;36:843–6.
 18. Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature.* 2016;533:420–4.
 19. Li L, Wang BH, Wang S, Moalim-Nour L, Mohib K, Lohnes D, Wang L. Individual cell movement, asymmetric colony expansion, rho-associated kinase, and E-cadherin impact the clonogenicity of human embryonic stem cells. *Biophys J.* 2010;98:2442–51.
 20. Morizur L, Herardot E, Monville C, Ben MK. Human pluripotent stem cells: a toolbox to understand and treat retinal degeneration. *Mol Cell Neurosci.* 2020;107:103523.
 21. Peng R, Lin G, Li J. Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *FEBS J.* 2016;283:1218–31.
 22. Rowe RG, Daley GQ. Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Genet.* 2019;20:377–88.
 23. Shivram H, Cress BF, Knott GJ, Doudna JA. Controlling and enhancing CRISPR systems. *Nat Chem Biol.* 2021;17:10–9.
 24. Sondergaard JN, Geng K, Sommerauer C, Atanasoai I, Yin X, Kutter C. Successful delivery of large-size CRISPR/Cas9 vectors in hard-to-transfect human cells using small plasmids. *Commun Biol.* 2020;3:319.
 25. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;131:861–72.
 26. Vallone VF, Telugu NS, Fischer I, Miller D, Schommer S, Diecke S, Stachelscheid H. Methods for automated single cell isolation and sub-cloning of human pluripotent stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2020;55:e123.
 27. Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, Takahashi JB, Nishikawa S, Nishikawa S, Muguruma K, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2007;25:681–6.
 28. Yan J, Kang DD, Dong Y. Harnessing lipid nanoparticles for efficient CRISPR delivery. *Biomater Sci.* 2021;9:6001–11.
 29. Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, Roepke TK, Kattman SJ, Kennedy M, Henckaerts E, Bonham K, Abbott GW, Linden RM, et al. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature.* 2008;453:524–8.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Titre : Utilisation des cellules souches pluripotentes humaines pour la reconstruction d'une rétine par bioingénierie dans le but de traiter des pathologies dégénératives rétinienne.

Mots clés : médecine régénérative, photorécepteurs, Epithélium Pigmenté Rétinien , microscope à force atomique, cellules souches pluripotentes humaines, maladies dégénératives de la rétine

Résumé : Les maladies dégénératives de la rétine telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et les rétinites pigmentaires (RPs) ont pour conséquence la dysfonction et/ou la dégénérescence des photorécepteurs et de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR). La perte de ces cellules est irrémédiable et peut entraîner à terme la cécité. La médecine régénérative est une stratégie thérapeutique en développement qui vise à remplacer les cellules de la rétine qui ont dégénéré par de nouvelles produites *in vitro*. Au cours de ma thèse, j'ai développé et optimisé une approche de thérapie cellulaire complexe de la rétine.

J'ai ainsi produit et caractérisé dans un premier temps des cellules de l'EPR à partir de cellules souches pluripotentes humaines (CSPhs). J'ai en particulier décrit les propriétés biomécaniques de ces cellules.

Ces propriétés mécaniques sont liées à des fonctions épithéliales essentielles pour l'EPR et peuvent être des indicateurs précoces de stress sub-létaux. Dans un second temps, j'ai produit des photorécepteurs à partir de ces CSPhs. Enfin, dans un troisième temps, j'ai assemblé ces différents types cellulaires de la rétine pour reformer une partie de la rétine qui dégénère *in vitro*. Afin de faciliter l'organisation particulière des photorécepteurs, j'ai utilisé une membrane microstructurée contenant des micro-puits sur laquelle j'ai ensemencé les photorécepteurs.

Ces travaux permettent d'envisager l'évaluation dans le futur, du potentiel thérapeutique de cet assemblage de rétine *in vitro* sur des modèles animaux où les photorécepteurs ont déjà dégénéré.