

Université de Montréal

**Analyse génétique de la fonction du gène Polycomb Bmi1 dans le
développement et la survie des photorécepteurs chez la souris.**

par Vicky Plamondon

Programme de Biologie moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc)
en Biologie moléculaire option Générale

Avril, 2013

© Vicky Plamondon, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé:

**Analyse génétique de la fonction du gène Polycomb Bmi1 dans le
développement et la survie des photorécepteurs chez la souris.**

présenté par:

Vicky Plamondon

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

président- rapporteur: Elliot Drobetsky

directeur de recherche: Gilbert Bernier

membre du jury: Sylvain Guérin

RÉSUMÉ

La rétine est constituée de plusieurs types de neurones incluant les cellules amacrines, ganglionnaires, bipolaires et les photorécepteurs. Les photorécepteurs, qui englobent les cônes et les bâtonnets, sont des neurones sensoriels hautement spécialisés qui permettent la conversion de la lumière en signaux électriques par le mécanisme de phototransduction. Les mécanismes moléculaires par lesquels les progéniteurs rétiniens (RPCs) se différencient en différents neurones spécialisés comme les photorécepteurs sont encore peu connus. Le gène Polycomb *Bmi1* appartient à la famille des gènes Polycomb qui forment des complexes multimériques impliqués dans la répression de l'expression génique via le remodelage de la chromatine. Au niveau biologique, le gène *Bmi1* régule, entre autre, le contrôle de la prolifération cellulaire, le métabolisme des radicaux libres, et la réparation de l'ADN. Récemment, il a été démontré que *Bmi1* joue un rôle critique dans la prolifération et l'auto-renouvellement d'un groupe de RPCs immatures. De plus, *Bmi1* est essentiel au développement post-natal de la rétine. L'objectif de cette étude est d'analyser le rôle de *Bmi1* dans le développement et la survie des photorécepteurs chez la souris. Nos résultats révèlent un phénotype de dégénérescence des photorécepteurs de types cônes chez notre modèle de souris déficiente pour *Bmi1*. Les bâtonnets sont insensibles à la mutation. De plus, *Bmi1* est exprimé de façon prédominante dans les cônes. Nos expériences de culture de cellules rétiniennes suggèrent que le phénotype est cellule-autonome. Par ailleurs, la co-délétion du gène *Chk2*, membre de la réponse aux dommages à l'ADN, permet de ralentir la progression du phénotype. Les rétines *Bmi1*^{-/-} et *Bmi1*^{-/-}*Chk2*^{-/-} présentent une augmentation importante des dommages oxydatifs à l'ADN. Ces résultats suggèrent que le stress oxydatif pourrait jouer un rôle important dans la survie des cônes. L'étude du rôle du gène Polycomb *Bmi1* dans les photorécepteurs est importante pour une meilleure compréhension des mécanismes contribuant à la survie des cônes et pourrait mener à la découverte de nouveaux traitements des maladies dégénératives des cônes.

Mots-clés: rétine, photorécepteurs, survie, dégénérescence, gène Polycomb *Bmi1*, cône.

ABSTRACT

The retina is composed of several types of neurons such as amacrin, ganglion, bipolar and photoreceptor cells. Photoreceptors, which include cones and rods, are highly specialized neurons that convert light into electrical signals by phototransduction. The molecular mechanisms involved in differentiation of retinal progenitors (RPCs) into specialized neurons such as photoreceptors are poorly understood. The polycomb gene *Bmi1* is a member of the Polycomb gene family that forms multimeric complexes involved in chromatin remodeling leading to gene repression. Biological functions of *Bmi1* include regulation of cell proliferation, free radical metabolism, and DNA repair. Recently, it was shown that *Bmi1* plays a critical role in the proliferation and self-renewal of a specific immature RPC group. Moreover *Bmi1* is essential for post-natal retinal development. The objective of the current study is to analyze *Bmi1* function in photoreceptor development and survival. Our results show that *Bmi1* deficiency in mice causes degeneration of cone photoreceptors, but not of rods. Furthermore, *Bmi1* is predominantly expressed in cones. Experiments using primary retinal cell cultures suggest a cell-autonomous phenotype. In addition, co-deletion of *Bmi1* and the critical DNA damage response protein *Chk2* resulted in partial rescue and slow-down of cone degeneration. *Bmi1*^{-/-} and *Bmi1*^{-/-}*Chk2*^{-/-} retinas also exhibit an important increase in oxidative DNA damage, suggesting that cellular redox state could play an important role in cone survival. Our studies on the role of *Bmi1* in photoreceptors elucidate the mechanisms contributing to cone survival, and could lead to the development of new treatments for cone degenerative diseases.

Keywords: retina, photoreceptors, survival, degeneration, Polycomb gene *Bmi1*, cone.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES	viii
REMERCIEMENTS	xi
INTRODUCTION	1
1. L'œil	1
1.1. Formation de l'œil.....	1
1.1.1. Organogénèse de l'œil	1
1.1.2. Rétinogenèse.....	1
1.2. Structure de la rétine.....	2
1.3. Mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation des photorécepteurs.....	6
2. Les gènes Polycomb	9
2.1. Définition.....	9
2.2 Les mécanismes de répression génique des PcG.....	12
2.3. <i>Bmi1</i> : protéine PcG	13
2.4. <i>Bmi1</i> , la prolifération cellulaire, la sénescence et l'apoptose	15
2.5. <i>Bmi1</i> et l'auto-renouvellement des cellules souches.....	17
2.6. <i>Bmi1</i> et les dommages à l'ADN.....	17
2.7. <i>Bmi1</i> et le stress oxydatif.....	19
2.8. Rôle de <i>Bmi1</i> dans le développement rétinien	20
2.9. Rôle de <i>Bmi1</i> dans la neurodégénérescence.....	20
HYPOTHÈSE DE RECHERCHE ET OBJECTIFS	22

1. Caractérisation du phénotype des photorécepteurs des souris <i>Bmi1</i> ^{-/-}	22
2. Déterminer le mécanisme moléculaire, régulé par <i>Bmi1</i> , qui est impliqué dans le développement et la survie des photorécepteurs.	22
MATÉRIELS ET MÉTHODES	23
1. Animaux	23
2. Immunomarquage	23
3. PCR en temps réel	25
4. Microscopie électronique	27
5. Électrorétinogramme	27
5.1. Analyse des résultats des ERG	28
6. Culture de cellules de la rétine	29
7. Analyses statistiques.....	30
RÉSULTATS	31
1. Caractérisation du phénotype des photorécepteurs des souris <i>Bmi1</i> ^{-/-}	31
1.1. Diminution du nombre et anomalies morphologiques des cônes chez les souris <i>Bmi1</i> ^{-/-}	31
1.2. La mutation du gène <i>Bmi1</i> affecte la réponse des cônes aux signaux lumineux.	31
1.3. Les cônes présentent des signes de mort cellulaire.	35
1.4. Dégénérescence progressive des cônes <i>Bmi1</i> ^{-/-}	35
1.5. <i>Bmi1</i> est exprimé de façon prédominante dans les photorécepteurs de type cône.....	36
1.6. Les cônes déficients pour <i>Bmi1</i> meurent <i>in vitro</i>	39
2. Déterminer le mécanisme moléculaire, régulé par <i>Bmi1</i> , qui est impliqué dans le développement et la survie des photorécepteurs.	42
2.1. La co-délétion de <i>Chk2</i> engendre une restauration partielle du phénotype.	42
2.2. Les rétines <i>Bmi1</i> ^{-/-} présentent une augmentation des dommages oxydatifs à l'ADN.....	43
2.3. La co-délétion de <i>Chk2</i> ne permet pas de restaurer le niveau de dommages oxydatifs à l'ADN.....	45

2.4. Le profil d'expression des gènes dans les rétines <i>Bmi1</i> ^{-/-} suggère une activation de <i>p53</i>	46
2.5. Le profil d'expression des gènes pro- et antioxydants dans les rétines <i>Bmi1</i> ^{-/-} révèle une tendance pro-oxydante.	47
2.6. La rétine <i>Bmi1</i> ^{-/-} <i>p53</i> ^{-/-} permet une restauration du niveau d'anion superoxyde.48	
2.7. La co-délétion de <i>p53</i> permet la restauration du phénotype des cônes.	52
DISCUSSION	53
1. <i>Bmi1</i> est essentiel à la survie des cônes	53
2. <i>Bmi1</i>, le stress oxydatif et la dégénérescence des cônes	53
3. <i>Bmi1</i>, la voie moléculaire <i>p19</i>^{Arf}/<i>p53</i> et le stress oxydatif	55
4. Modèle de mécanisme moléculaire régulé par <i>Bmi1</i> dans la rétine	56
PERSPECTIVES	58
CONCLUSION	60
BIBLIOGRAPHIE	61

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Protéines des <i>Polycomb group</i>	11
--	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Développement précoce des cupules optiques et du cristallin chez l'embryon de vertébrés.	2
Figure 2. Ordre chronologique de la genèse des différents types cellulaires dans la rétine murine en développement.....	3
Figure 3. Organisation des multiples circuits neuronaux de la rétine.	5
Figure 4. La mosaïque des cônes et des bâtonnets de la rétine de souris.	6
Figure 5. Étapes du développement des photorécepteurs.....	8
Figure 6. Les complexes Polycomb PRC1 et PRC2.....	15
Figure 7. Régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose par Bmi1.	17
Figure 8. Exemples d'ondes d'électrorétinogramme de souris.	29
Figure 9. Diminution du nombre et anomalies morphologiques des cônes chez les souris Bmi1 ^{-/-}	32
Figure 10. La morphologie des bâtonnets reste normale.....	33
Figure 11. La mutation Bmi1 affecte la réponse des cônes aux signaux lumineux.	34
Figure 12. Les cônes présentent des signes de mort cellulaire.....	36
Figure 13. Dégénérescence progressive des cônes Bmi1 ^{-/-}	38
Figure 14. Bmi1 est exprimé de façon prédominante dans les photorécepteurs de type cône.....	40
Figure 15. Les cônes déficients pour Bmi1 meurent in vitro.	42
Figure 16. La co-délétion de Chk2 engendre une restauration partielle du phénotype... ..	45
Figure 17. Les rétines des souris Bmi1 ^{-/-} et Bmi1 ^{-/-} Chk2 ^{-/-} présentent une augmentation des dommages oxydatifs à l'ADN.	45
Figure 18. Profil d'expression de gènes pro-, antioxydants et dépendants de p53 dans les rétines Bmi1 ^{-/-}	47
Figure 19. La rétine Bmi1 ^{-/-} p53 ^{-/-} permet une restauration du niveau d'anion superoxyde.	50
Figure 20. La co-délétion de p53 permet la restauration du phénotype des cônes.....	51
Figure 21. Modèle de la fonction de Bmi1 dans les cellules de la rétine.	56

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNc: ADN complémentaire

AKT/PKB: Protein kinase B

Apaf1: apoptotic peptidase activating factor 1

ARN: acide ribonucléique

ATM: Ataxia telangiectasia mutated kinase

ATR: Ataxia telangiectasia and rad 3-related kinase

BAP1: BRCA1 associated protein 1

BDNF: Brain-derived neurotrophic factor

BMI1: B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog

CBX: chromobox

CHK2: Checkpoint kinase 2

CRX: cone-rod homeobox

Cyp241a: Cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1

DAB: 3,3'-diaminobenzidine

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

dATP: désoxy adénine tri-phosphate

dCTP: désoxy cytosine tri-phosphate

DCF-DA: dichlorodihydrofluoresceine diacétate

dGTP :désoxy guanine tri-phosphate

dTTP: désoxy thymine tri-phosphate

DDR: DNA damage response

DEPC: diéthylpyrocarbonate

dRAF: dRing-associated factors complex

DSB: double strand break

DTT: dithiothréitol

Duox2: Dual oxidase 2

EED: Embryonic ectoderm development

ERG: électrorétinogramme

EZH1/2: Enhancer of Zeste homolog 1/2
FACS: Cytométrie en flux
Fas/CD95: Fas receptor/cluster of differentiation 95
GBM: Glioblastoma multiforme
GST-1 α : Gluthatione S-transférase 1 α
 γ H2AX: phosphorylated H2A family, member X
H3K27Me3: Triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3
HBSS: Hank's balanced salt solution
HSC: hematopoietic stem cell
INL: inner nuclear layer
IPL: inner plexiform layer
LPO: Lactoperoxydase
MAPKAP Kinase 3pK: Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3
MEF: Mouse embryonic fibroblast
M-MLV: Moloney Murine Leukemia Virus
Myc: v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
NAC: N-acétylcystéine
NGF: nerve growth factor
NQO1: NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1
Notch1: Notch homolog 1
NR: neural retina
NR2E3: nuclear receptor subfamily 2, group E, member 3
NRL: neural retina leucine-zipper
NSC: neural stem cell
ONL: outer nuclear layer
OPL: outer plexiform layer
OTX2: orthodenticle homeobox-2
P53: tumor protein p53
PBS: phosphate buffered saline
PcG: polycomb group

PCGF1: Polycomb group ring finger 1
PCGF2: Polycomb group ring finger 2
PCR: Polymerase chain reaction
Pho: Pleihomeotic
PhoRC: Pho-repressive complex
PNA: Peanut agglutinin
PRC1: polycomb repressive complex 1
PRC2: polycomb repressive complex 2
PR-DUB: Pc-repressive deubiquitinase complex
PRE: Polycomb response elements
Psc: Posterior sex combs
Rb: Retinoblastoma protein
RbAp46/48: Retinoblastoma associated protein 46/48
RdCVF: rod-derived cone viability factor
RING1A/B: Ring finger protein 1 A/B
RNF8: Ring finger protein 8
ROR β : RAR related orphan receptor beta
ROS: Reactive oxygen species
RPC: retinal progenitor cell
RPE: retinal pigment epithelium
RT: reverse transcriptase
SESN2: Sestrin-2 ou Stress responsive gene Hi95
SFMBT1: Scm-like with four mbt domains 1
Su(z)2: Suppressor of Zeste 2
SUZ12: Supressor of Zeste 12 homolog
TR β 2: Thyroid hormon receptor beta 2
UV: ultra-violet
WT: Wild-type
YY1: ying-yang 1

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr Gilbert Bernier, pour m'avoir offert ce projet. Je remercie également tous les membres du laboratoire, particulièrement Dr Mohamed Abdouh et Jida El Hajjar pour leurs conseils judicieux et leur support technique et moral, ainsi que Joëlle Lavoie et le Dr Marc Hébert avec qui nous avons collaboré pour les électrorétinogrammes.

J'aimerais aussi remercier mes amis et ma famille pour avoir cru en moi. Enfin, je remercie spécialement Yan pour son optimisme, sa joie de vivre, et son support moral durant ces années, particulièrement lors des moments difficiles où il a su raviver ma motivation.

INTRODUCTION

1. L'œil

1.1. Formation de l'œil

1.1.1. Organogénèse de l'œil

Chez les vertébrés, l'œil est issu de tissus primordiaux provenant du diencephale et de la surface de l'ectoderme l'entourant [1]. Le premier stade de développement de l'œil est la formation des primordiums optiques dans le diencephale. Ces primordiums vont s'allonger pour former les vésicules optiques jusqu'à ce qu'elles entrent en contact avec la couche d'ectoderme. Cette dernière va ensuite se différencier en précurseur du cristallin. La formation des cupules optiques par l'invagination des vésicules optiques et des précurseurs du cristallin va finalement conduire à la formation de la rétine neurale (NR), de l'épithélium pigmenté (RPE), tous deux issus de la vésicule optique, et de la vésicule contenant le cristallin, issu des précurseurs du cristallin (Figure 1) [1].

1.1.2. Rétinogénèse

Dans la rétine, six principaux types de cellules neuronales sont responsables de la détection du signal lumineux jusqu'à la transmission de l'influx nerveux au cerveau. Pour soutenir ces neurones, la rétine possède aussi un type de cellule gliale. Au cours du développement embryonnaire, ces sept types de cellules sont issus d'une seule et même population de précurseurs multipotents rétiniens (RPCs) localisée dans les cupules optiques. [2]. La génération d'une grande variété de types cellulaires à partir d'une seule et même population de progéniteurs est contrôlée de façon stricte par de multiples facteurs de transcription, comme Pax6 et CRX [3, 4]. Par ailleurs, la différenciation des RPCs se fait de façon séquentielle. Les cellules ganglionnaires et horizontales se

différencient les premières, suivies des cellules amacrines, des photorécepteurs de type cône, des photorécepteurs de type bâtonnet, des cellules bipolaires et, finalement, des cellules gliales de Müller (Figure 2) [5]. Au cours de la rétino-genèse, les cellules postmitotiques issues de la différenciation des RPCs vont migrer dans la rétine pour former une mosaïque résultant en la stratification de la NR. Cette organisation spatiale des différents types cellulaires est nécessaire pour une bonne vision [2].

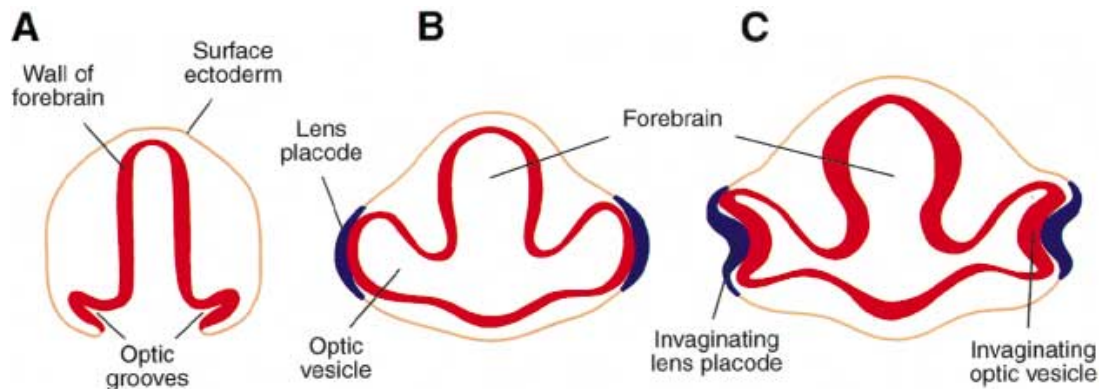


Figure 1. Développement précoce des cupules optiques et du cristallin chez l'embryon de vertébrés.

(A) Les primordiums optiques commencent à s'invaginer dans le diencephale vers la surface de l'ectoderme. (B) Les vésicules optiques entrent en contact avec l'ectoderme et se différencient en précurseurs du cristallin. (C) Les vésicules optiques et les précurseurs du cristallin s'invaginent. Ils vont devenir la rétine neurale et pigmentée ainsi que le cristallin, respectivement. (Adaptation de Oliver et al., 1997).

1.2. Structure de la rétine

En réponse à la diversité des habitats, le système visuel a subi une pression de sélection importante dû à son rôle primordiale dans la survie des espèces de vertébrés. L'organisation de la rétine est donc largement diversifiée d'une espèce à l'autre et répond aux besoins précis de chacune d'entre elles [6]. Dans le cadre de ce projet, nous nous concentrons principalement sur la morphologie de la rétine humaine et murine. La rétine est organisée en strates. Les corps cellulaires des photorécepteurs se trouvent dans la couche nucléaire externe (ONL) et étendent leur segment interne, contenant la

machinerie métabolique, et leur segment externe, qui s'associe avec les cellules du RPE entourant la rétine, dans la couche de photorécepteurs. Les axones des photorécepteurs forment des synapses avec ceux des cellules horizontales et bipolaires au niveau de la couche plexiforme externe (OPL). Les corps cellulaires de ces dernières ainsi que ceux des cellules gliales de Müller et amacrines se retrouvent dans la couche nucléaire interne (INL). Les cellules bipolaires envoient le signal aux cellules ganglionnaires et amacrines par des synapses localisées dans la couche plexiforme interne (IPL). Les cellules ganglionnaires, quant à elles, projettent leurs axones dans le nerf optique et permettent la transmission du signal au cerveau (Figure 3) [7, 8].

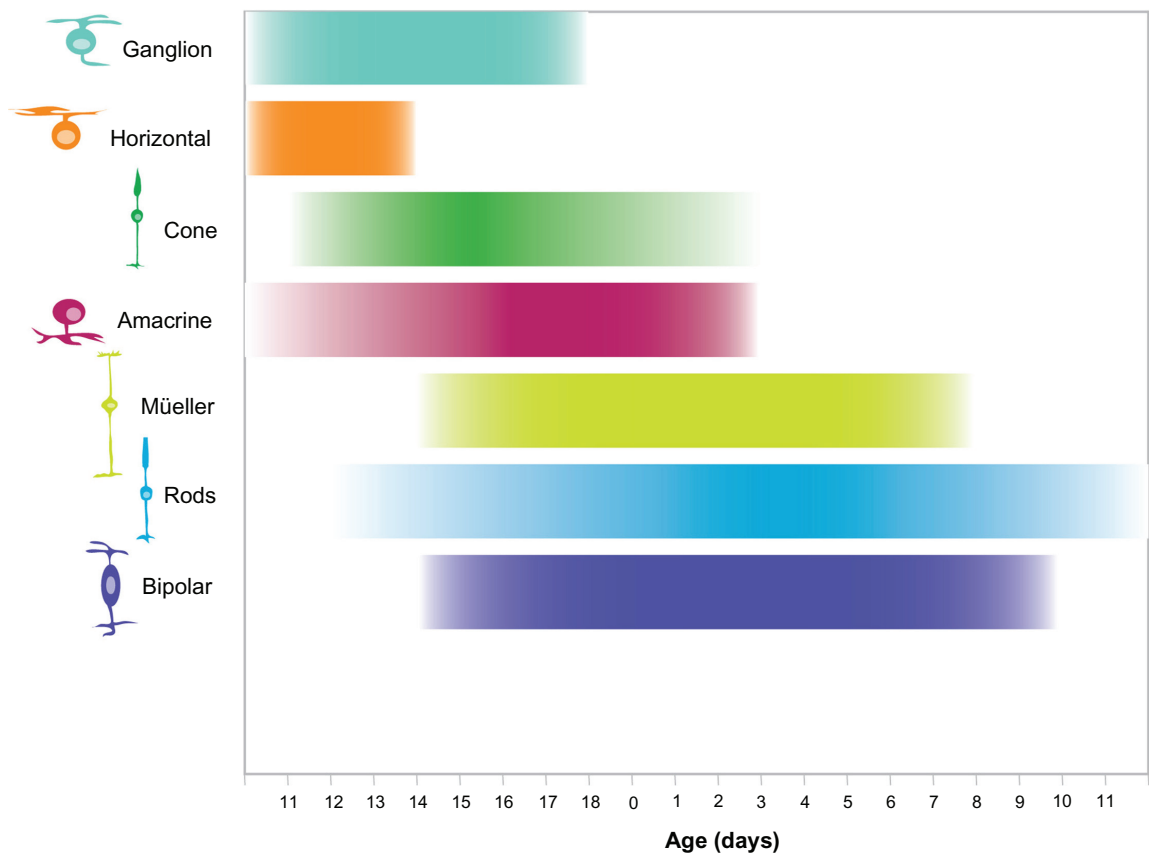


Figure 2. Ordre chronologique de la genèse des différents types cellulaires dans la rétine murine en développement.

Les différents types cellulaires sont indiqués sur l'ordonnée et le temps est représenté sur l'abscisse. La naissance de la souris est indiquée au temps 0. Le développement embryonnaire se situe à gauche du temps 0 et le développement post-natal à droite du 0.

Les barres adjacentes aux différents types cellulaires représentent la période au cours de laquelle le type cellulaire est généré. (Adaptation de Zhang et al., 2011).

Les photorécepteurs sont les neurones photosensibles qui permettent la conversion des signaux lumineux en signaux électriques. Les cônes et les bâtonnets ont des fonctions visuelles différentes. Les bâtonnets sont spécialisés dans la perception de la lumière à la pénombre et sont environ 20 fois plus nombreux que les cônes dans la rétine des mammifères. Les bâtonnets possèdent uniquement un seul type de pigment photosensible que l'on nomme la rhodopsine. Par contre, chez les mammifères, il existe plusieurs types de cônes possédant chacun un type de pigment photosensible différent. Ces pigments se nomment les opsines et chacun d'entre eux sont responsables de l'absorption de la lumière à différentes longueurs d'ondes. Les cônes sont donc les photorécepteurs responsables de la vision en couleur [7]. Chez la souris, les cônes expriment soit la S-Opsine, responsable de l'absorption de la lumière bleue, ou la M-Opsine, responsable de l'absorption de la lumière verte[5]. Chez l'homme, il existe une opsine supplémentaire: la L-Opsine. Cette dernière permet l'absorption de la lumière rouge. Ces trois différents types d'opsines permettent la vision trichromatique caractéristique à l'espèce humaine et certaines autres espèces de mammifères[9]. L'absorption de la lumière par le pigment engendre une hyperpolarisation de la membrane qui est ensuite transmise à la cellule bipolaire spécifique au type de photorécepteur impliqué [7]. La cellule bipolaire relai le signal à une cellule ganglionnaire directement, ou indirectement via une cellule amacrine [5].

Par ailleurs, les cônes et les bâtonnets sont disposés de façon à former une mosaïque prédéfinie dans la couche de photorécepteurs de la rétine (Figure 4). Cette distribution a aussi d'importantes conséquences pour la vision. Chez l'homme, malgré le fait que le nombre de bâtonnets excède largement le nombre de cônes, ce ratio change drastiquement au niveau de la fovéa. La fovéa est une région hautement spécialisée située au centre de la rétine. À cet endroit, la densité de cônes augmente jusqu'à 200 fois comparativement au reste de la rétine. La fovéa est responsable de l'acuité visuelle maximale en éclairage diurne [10]. Chez la souris, la fovéa n'existe pas. La rétine

contient principalement des bâtonnets, à un ratio bâtonnets: cônes de 35:1. À l'exception de la fovéa, la densité de cônes dans la rétine de souris est relativement similaire à celle des primates à 3-4 mm de l'excentricité. La principale différence dans la distribution des photorécepteurs chez la souris comparativement aux primates est la plus grande densité de bâtonnets en périphérie de la rétine [11].

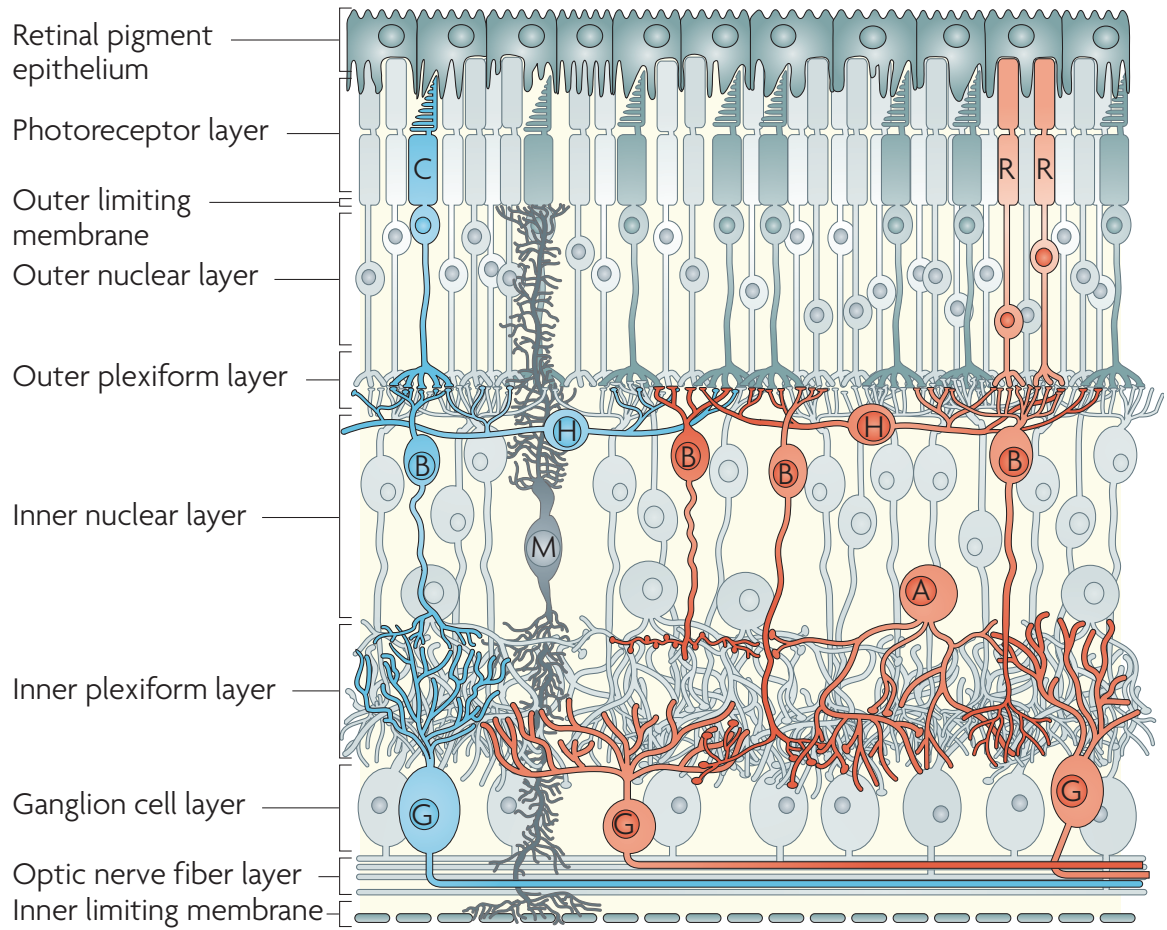


Figure 3. Organisation des multiples circuits neuronaux de la rétine.

Cônes (C), bâtonnets (R), cellules bipolaires (B), cellules horizontales (H), cellules amacrines (A), cellules ganglionnaires (G). (Adaptation de Swaroop et al., 2010).

1.3. Mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation des photorécepteurs

Le processus de différenciation des RPCs en photorécepteurs nécessite une interaction complexe entre plusieurs facteurs de transcription. Le processus de développement des photorécepteurs peut être séparé en 5 étapes: la prolifération des RPCs, la restriction de la multipotence des RPCs, la spécification du destin cellulaire et la différenciation des RPCs en précurseurs de photorécepteurs, l'expression de gènes spécifiques aux photorécepteurs et, finalement, la croissance axonale, la formation de la synapse et la formation du segment externe (Figure 5) [8].

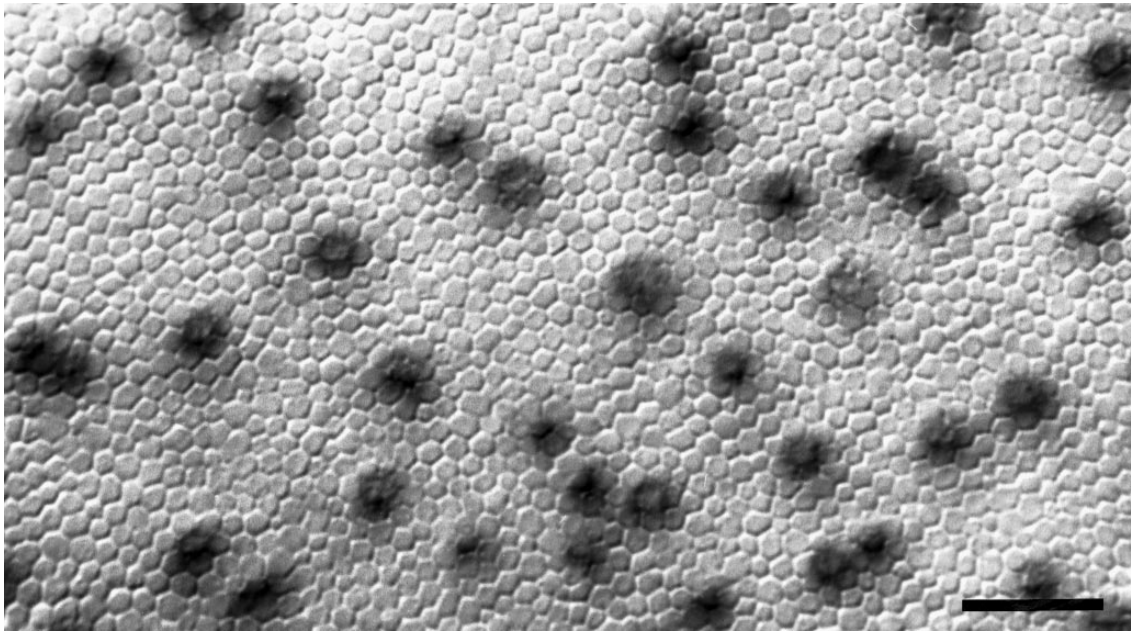


Figure 4. La mosaïque des cônes et des bâtonnets de la rétine de souris.

Plan focal dans le segment interne des photorécepteurs. Les structures pâles sont les segments internes des bâtonnets. Les segments externes des cônes sont colorés par la réaction au diaminobenzidine. Barre d'échelle, 10 μ m. (Adaptation de Jeon et al., 1998).

La première étape importante dans le développement des photorécepteurs est régulée par la voie Notch [8]. Il a été démontré que Foxn4 permet d'activer la voie Notch en stimulant l'expression de *Dll4*, ligand de Notch [12]. Le récepteur transmembranaire

Notch 1 permet de maintenir la réserve de RPCs en inhibant la production de photorécepteurs dans la rétine en développement [13]. L'inhibition de Notch entraîne la différenciation des progéniteurs en bâtonnets ou en cônes. Les mécanismes moléculaires permettant la production de précurseurs de photorécepteurs à partir des RPCs, incluant l'inhibition de Notch, restent peu connus [8]. Six facteurs de transcriptions contrôlent les étapes clés de la différenciation des photorécepteurs chez les mammifères: la protéine *orthodenticle homeobox 2* (OTX2), la protéine *cone-rod homeobox* (CRX), la protéine *neural retina leucine-zipper* (NRL), le récepteur nucléaire spécifique aux photorécepteurs *nuclear receptor subfamily 2, group E, member 3* (NR2E3), le récepteur nucléaire *RAR related orphan receptor beta* (ROR β) et le récepteur de l'hormone thyroïdienne *Thyroid hormon receptor beta 2* (TR β 2). *Otx2* est exprimé lors de la dernière mitose des progéniteurs rétiniens et dans les précurseurs précoces des photorécepteurs. Des résultats montrant que ce gène est exprimé dans les photorécepteurs postnataux suggèrent son implication dans la différenciation terminale des photorécepteurs [14]. *Otx2* est donc un élément régulateur important de la lignée des photorécepteurs. Par contre, *Otx2* induit un signal essentiel mais insuffisant pour la différenciation. *Crx*, quant à lui, est exprimé dans les précurseurs des photorécepteurs et agit en aval de *Otx2*. La protéine stimule l'expression des gènes spécifiques aux photorécepteurs. NRL est le facteur de transcription déterminant la différenciation en bâtonnet. NRL a pour cible transcriptionnelle le gène NR2E3 qui agit comme répresseur de l'expression des gènes spécifiques aux cônes. NR2E3 est exprimé dans les photorécepteurs post-mitotiques et enclenche, de façon irréversible, la différenciation en bâtonnet [15].

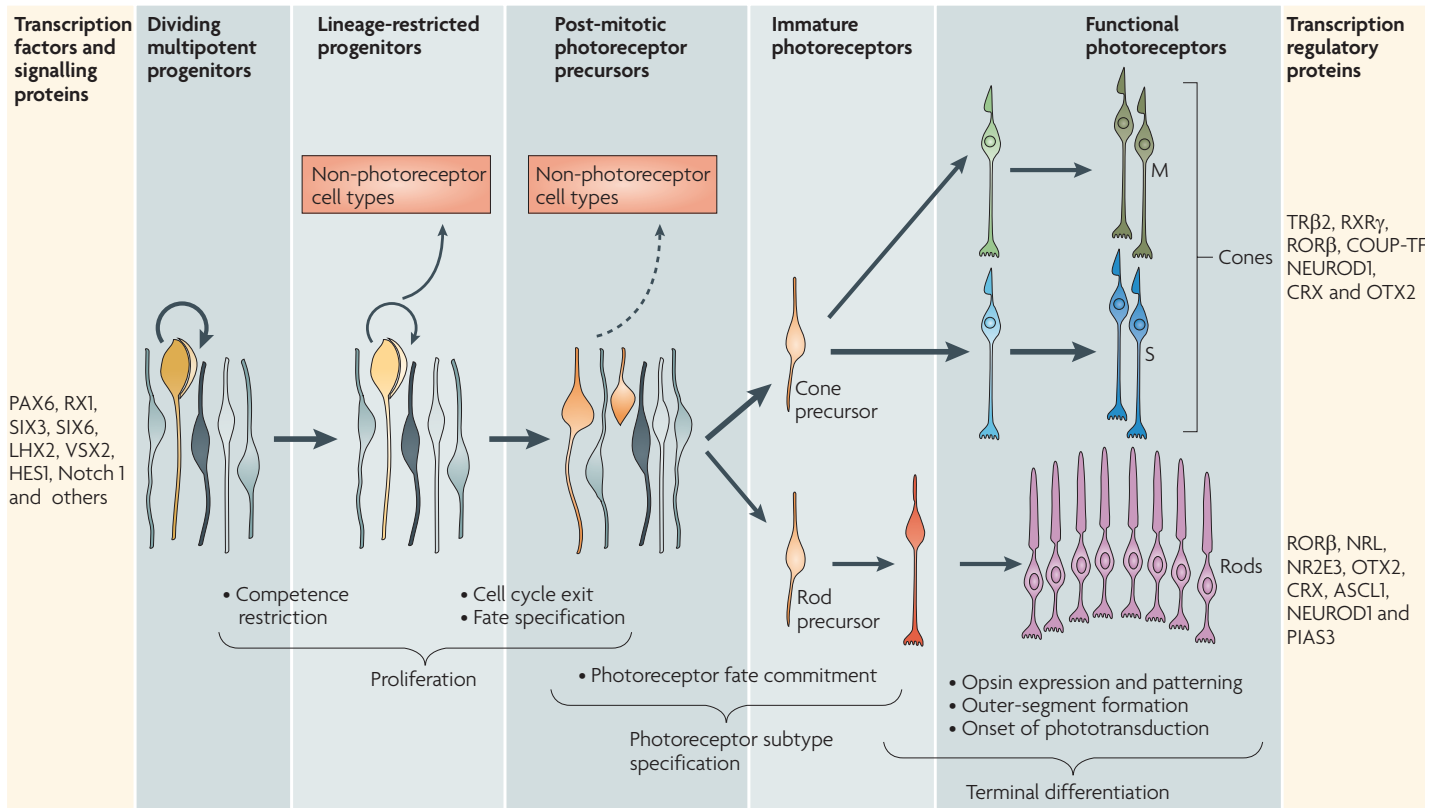


Figure 5. Étapes du développement des photorécepteurs.

Au début de la rétino-génèse, les RPCs se divisent et produisent des RPCs additionnels (flèche circulaire épaisse) ou des progéniteurs qui ont des compétences restreintes pour générer des types cellulaires variés (flèche circulaire mince). Certains de ces progéniteurs en prolifération deviennent restreint à une lignée et produiront au moins un photorécepteur et possiblement d'autres types cellulaires. Durant la différenciation en photorécepteurs, les précurseurs sont dirigés vers la production de cônes ou de bâtonnets qui expriment éventuellement des photopigments (S- et M-Opsine pour les cônes, Rhodopsine pour les bâtonnets), et forment des segments externes et des synapses. La colonne de gauche indique des facteurs de transcription clés et des protéines signalisatrices qui maintiennent la multipotente et la prolifération des RPCs: paired box protein PAX6, retinal homeobox protein RX1, SIX3, SIX6, LIM-homeobox protein LHX2, visual system homeobox 2 (VSX2), HES1 and Notch 1. La colonne de droite indique des protéines de régulation de la transcription clés pour la différenciation et le maintien en cônes et bâtonnets (pour les cônes: thyroid hormone receptor β2 (TRβ2), retinoid X receptor-γ (RXRγ), nuclear receptor RORβ, COUP transcription factor 1 (COUP-TF1; aussi connu sous le nom de NR2F1), neurogenic differentiation factor 1 (NEUROD1), cone-rod homeobox protein (CRX) et homeobox protein OTX2; pour les bâtonnets: RORβ, neural retina leucine zipper protein (NRL), photoreceptor-specific nuclear receptor (NR2E3), OTX2, CRX, achaete-scute homologue 1 (ASCL1; aussi connu sous le nom de MASH1), NEUROD1 et E3 SUMO-protein ligase PIAS3). (Adaptation de Swaroop et al., 2010).

2. Les gènes Polycomb

2.1. Définition

Les gènes Polycomb sont des répresseurs transcriptionnels qui ont été initialement identifiés chez la drosophile comme répresseurs des gènes homéotiques (Hox) responsables de la segmentation de l'embryon. Le phénotype typique des mouches mutantes pour ces gènes montre des malformations résultant en la translocation d'un segment antérieur en un segment plus postérieur [16]. Ces transformations sont dites homéotiques. Des orthologues des Polycomb ont été identifiés chez plusieurs organismes, suggérant une conservation évolutive de ce système de répression. Jusqu'à aujourd'hui, cinq complexes PcG ont été identifiés chez des organismes variés: les *Polycomb repressive complex 1* (PRC1) et 2 (PRC2), le *Pho-repressive complex* (PhoRc), *dRing-associated factors complex* (dRAF) et le *Pc-repressive deubiquitinase complex* (PR-DUB). Les souris mutantes pour des gènes Polycomb montrent plusieurs anomalies hématopoïétiques, neurologiques, des défauts de gastrulation et des transformations de segments individuels du squelette axial [17].

Les protéines formant le *Polycomb group* (PcG) sont des modulateurs épigénétiques qui agissent via le remodelage de la chromatine en induisant des modifications post-traductionnelles de certaines histones. Les composants essentiels du complexe PRC2, qui sont conservés de la drosophile aux mammifères, sont les protéines EZH1/2, SUZ12, EED et RbAp46/48 (Tableau I). Le complexe PRC2 est responsable de la di- et la tri-méthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 via l'activité enzymatique de EZH1/2 [18]. Le complexe PRC1, quant à lui, comprends deux seules composantes essentielles, soit RING1A/B s'associant soit avec BMI1, MEL18 (PCGF2) ou NSPC1 (PCGF1) (Tableau I). Les ligases de l'ubiquitine RING1A/B sont responsables de la mono-ubiquitination de l'histone H2A sur la lysine 119 permettant la stabilisation de la compaction de la chromatine [17]. La composante CBX du complexe PRC1 contient un chromodomaine liant l'histone H3 lorsqu'elle est di- ou tri-méthylée sur la lysine 27 (Figure 6). Le complexe PRC1 reconnaît donc les marques induites par le complexe

PRC2 menant à l'hypothèse que PRC1 agit en aval de PRC2. De plus, certains complexes PRC1 peuvent réguler l'expression génique en compactant la chromatine de façon indépendante de sa fonction enzymatique [18, 19]. Le complexe PhoRc a aussi été initialement identifié chez la drosophile. Il est composé principalement du facteur de transcription YY1 et de SFMBT1 chez les mammifères. Le complexe PhoRc est le seul PcG connu capable de se lier à une séquence d'ADN spécifique (Tableau I) [20]. Aucune activité enzymatique n'a été identifiée jusqu'à ce jour chez le complexe PhoRc. Par contre, il jouerait un rôle dans le recrutement des autres PcG à des loci spécifiques et serait important pour maintenir l'état de répression de la chromatine [17, 20]. Finalement, récemment, de nouveaux complexes PcG ont été identifiés seulement chez la drosophile: dRAF et PR-DUB. dRAF est composé de certaines protéines du PRC1 dont RING et Psc accompagné d'une déméthylase dKDM2 (Tableau I). Ce complexe a la capacité d'ubiquitiner l'histone H2A et de retirer la di-méthylation sur la lysine 36 de l'histone H3, une marque activatrice de la chromatine. dRAF permet donc de retirer une modification activatrice sur l'histone H3 et d'ajouter une modification répressive sur l'histone H2A [21]. Le complexe PR-DUB, quant à lui, possède une activité déubiquitinase conférée par la protéine Calypso, dont l'homologue chez les mammifères est BAP1, qui permet de déubiquitiner l'histone H2A (Tableau I) [22]. Malgré que l'activité de PR-DUB s'oppose à celle de dRAF, ce complexe se retrouve sur les cibles du complexe PRC1 et est essentiel au maintien de la répression par PRC1. Ceci suggère qu'un équilibre entre l'ubiquitination et la déubiquitination de l'histone H2A serait nécessaire à une répression génique efficace [17, 22].

<i>Drosophila</i>	Mouse/human	Function
Polycomb repressive complex 1 (PRC1)		
PC	CBX2 (M33) CBX4 (Pc2) CBX6 CBX7 CBX8	Binding to H3K27me3 SUMO E3 ligase; binding to RNA, H3K9me3, and H3K27me3 Binding to RNA and H3K27me3 Binding to RNA and H3K27me3
PH	PHC1 (HPH1) PHC2 (HPH2) PHC3 (HPH3)	
PSC	BMI1 (PCGF4, RNF51) MEL18 (PCGF2, RNF110) MBLR (PCGF6, RING6, RNF134) NSPC (PCGF1, RNF68) PCGF3 PCGF5	H2AK119 ubiquitination, chromatin compaction H3K4 demethylation H3K36 demethylation
SCM	SCMH1, SCMH2	
ScE (RING)	RING1A (RNF1) RING1B (RNF2)	H2AK119 ubiquitination, RNA Pol II block H2AK119 ubiquitination, RNA Pol II block, chromatin compaction
dRYBP	RYBP YAF2	H2AK119 ubiquitination, PRC1 recruitment PRC1 recruitment
Polycomb repressive complex 2 (PRC2)		
E(z)	EZH1 EZH2	H3K27 trimethylation, chromatin compaction H3K27 trimethylation, H3K27me3 recognition, binding to RNA, chromatin-loop formation, protein methylation
Su(z)12	SUZ12	PRC2 assembly, RNA binding
ESC	EED	H3K27me3 recognition, RNA binding
	JARID2	Histone demethylation, PRC2 recruitment
	RbAp46/48	RNA binding
PCL	PCL1, PCL2, PCL3	PRC2 recruitment, stimulation of PRC2 activity
PHO repressive complex 1 (PHORC)		
PHO	YY1	PRC1 and PRC2 recruitment
dSFMBT	SFMBT1	
dRING-associated factors (dRAF)		
PSC		Chromatin compaction
dRING		
dKDM2		H2AK119 ubiquitination, H3K36me2 removal
Polycomb repressive deubiquitinase (PR-DUB)		
Calypso	BAP1	H2A deubiquitination
ASX	ASXL1	

Tableau I. Protéines des *Polycomb group*.

Abréviations: additional sex combs (ASX), additional sex combs like (ASXL), B

lymphoma Mo-MLV insertion region-1 (Bmi1), chromobox homolog (CBX), Drosophila histone lysine demethylases (dKDM2), embryonic ectoderm development (EED), Extra sex combs (Esc), retinoblastoma-associated protein 46 and 48 (RbAp46/48), Enhancer of zeste (E(z) et EZH), Jumonji AT-rich interactive domain 2 (JARID2), Mel18 and Bmi1-like RING finger protein (MBLR), nervous system polycomb 1 (NSPC1), Polycomb (Pc), Polycomb group RING fingers (PCGFs), Polycomb-like proteins (PCL), polyhomeotic (Ph et PHC), Pleiohomeotic (PHO), Polycomb repressive complex (PRC), posterior sex combs (PSC), Ring Finger protein (RNF), RING1/YY1-binding protein (RYBP), sex comb extra (also known as RING) (Sce), sex comb on Midleg (Scm), Scm-like with four MBT domain-containing protein 1 (Sfmbt), Suppressor of zeste 12 (Su(z)12), YY1-associated factor 2 (YAF2), yin and yang 1 (YY1).

2.2 Les mécanismes de répression génique des PcG

L'analyse de plusieurs régions régulatrices de gènes ciblés par les PcG a révélé la présence de séquences spécifiques nécessaires et suffisantes à la répression par les PcG chez la drosophile et qui sont toujours fonctionnels lorsque retiré du contexte normal du complexe Bithorax [23]. Ces éléments, que l'on nomme *Polycomb response elements* (PRE), ne sont pas définis par une séquence d'ADN précise mais des études chez la drosophile ont montrés que la liaison des PcG à certains de ces sites était dépendante de la présence de répétitions de d(GA)₃, correspondant à la séquence consensus pour le facteur GAGA [24, 25]. Une grande partie de ces éléments contiennent, par ailleurs, la séquence consensus nécessaire à la liaison des membres de la famille de protéines SP1/KLF chez la drosophile [26]. Les trois complexes PRC1, PRC2 et PhoRc se lient à ces éléments. Les protéines Pho, appartenant au complexe PhoRC, et GAF, se lieraient d'abord aux séquences PRE dans une région sans nucléosome. Avec la coopération de complexes de remodelage de la chromatine, ces protéines recruteraient les complexes PRC1 et PRC2. Le recrutement de ces complexes permettra ensuite la triméthylation de H3K27 et l'ubiquitination de H2A de part et d'autre de la séquence PRE. La région méthylée va ensuite s'étendre jusqu'au promoteur du gène cible grâce à la formation d'une boucle dans l'ADN permettant le contact entre les complexes et les nucléosomes environnants. Le PcG, entrant ainsi en contact avec le promoteur, va interférer avec le recrutement de la machinerie transcriptionnelle causant la répression génique [27]. En

effet, l'analyse de mutants pour l'histone méthyltransférase des PcG E(z) révèle que la triméthylation différentielle des histones aux niveaux du promoteur et des séquences codantes confère l'état d'activation et d'inactivation du gène HOX Ultrabithorax (Ubx) [28]. La méthylation permettrait de stabiliser les complexes au PRE et de faciliter l'interaction entre les complexes et un promoteur situé à grande distance du PRE [27].

Par ailleurs, un autre mécanisme de répression génique a été suggéré. Les PcG entrainerait la répression génique par la compaction de la chromatine au niveau des gènes cibles empêchant ainsi l'accès des protéines nécessaires à la transcription. En effet, il a été démontré que le complexe PRC1 permet la compaction de nucléosomes. Un seul complexe peut engendrer la compaction de trois nucléosomes [29]. Cette fonction est conservée entre la drosophile et la souris. Un domaine possédant une région fortement chargée positivement dans une composante de PRC1 est essentiel à cette fonction [30].

2.3. Bmi1: protéine PcG

La gène *B-cell specific Moloney murine leukaemia virus integration I (Bmi1)* a été le premier membre de la famille PcG à être identifié. Initialement, il a été identifié comme un oncogène coopérant avec Myc dans un modèle de lymphome, soit les souris transgéniques E μ -myc. Le gène *Bmi1* encode une protéine de 324 acides aminées avec une localisation majoritairement nucléaire [31]. *Bmi1* est l'homologue des gènes *Psc* et *Su(z)2* chez la drosophile [32]. BMI1 contient un motif en doigt de zinc similaire à celui de nombreuses protéines liant l'ADN, suggérant un rôle de régulateur de la transcription [33]. Le gène *Bmi1* est exprimé dans de nombreux types cellulaires en plus des tissus hématopoïétiques, comme les glandes salivaires, les testicules, le cœur, le cerveau et les reins. Par contre, son niveau d'expression est plus élevé dans les nœuds lymphatiques, le cœur, le cerveau et les testicules [31, 33]. *Bmi1* est aussi fortement conservé dans l'évolution puisque son transcrit a été identifié dans des espèces variées, allant de l'homme au poisson [31].

La protéine BMI1 fait partie du complexe PRC1 et agit en coopération, via son domaine RING, avec les ligases E3 de l'ubiquitine Ring1A/B dans l'ubiquitination de

l'histone H2A [34]. La protéine MAPKAP Kinase 3pK peut phosphoryler Bmi1 ainsi que d'autres membres PcG [35]. La localisation de Bmi1 à la chromatine au cours du cycle cellulaire est dépendante de son état de phosphorylation. Au cours de la phase G1/S, BMI1 est hypophosphorylé et fortement lié à la chromatine. Au cours de la phase G2/M, BMI1 est phosphorylé et se dissocie de la chromatine [36]. Une étude récente a aussi montré que la kinase *Akt/PKB* pouvait aussi phosphoryler Bmi1 dans le contexte du cancer de la prostate murin. Cette phosphorylation régule le potentiel oncogène de Bmi1 en plus d'affecter l'activité E3 ligase du complexe PcG et la réponse aux dommages à l'ADN [37].

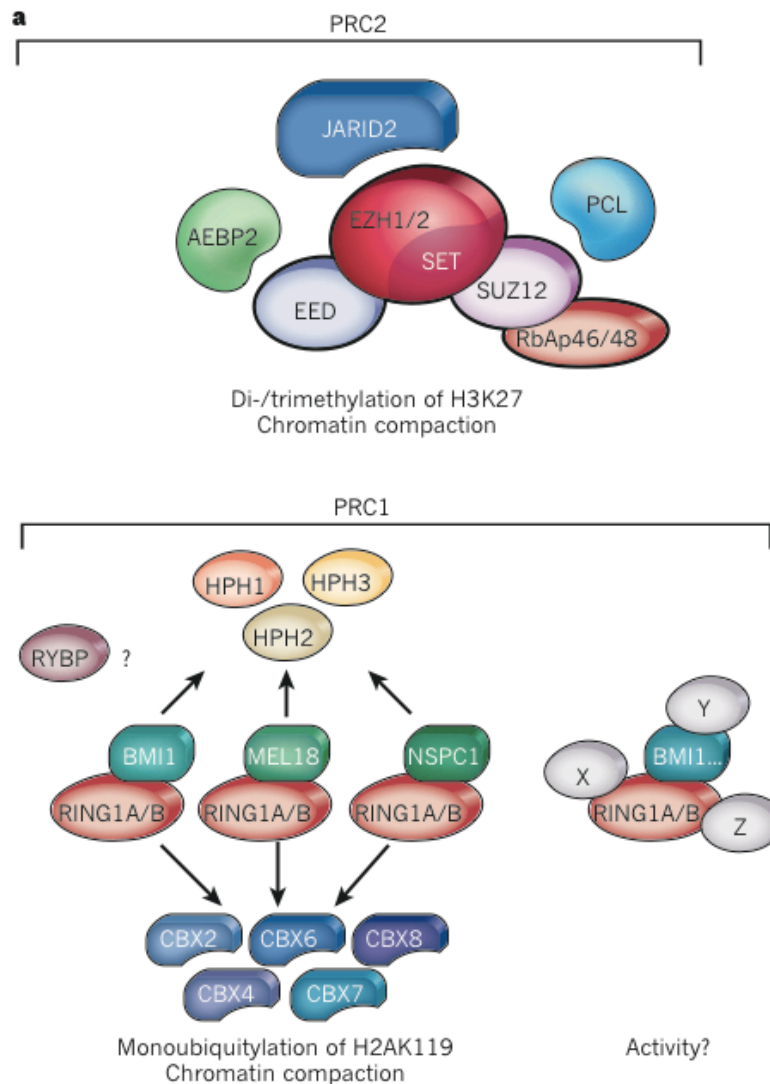


Figure 6. Les complexes Polycomb PRC1 et PRC2.

Représentation schématique montrant la composition de PRC1 et PRC2. Pour PRC1, le diagramme de droite montre les compositions classiques du complexe tandis que le diagramme de gauche représente un complexe *PRC1-like*. Due à leur homologie avec la protéine PSC de la drosophile, on considère que les complexes contenant BMI1, MEL18 ou NSPC1 peuvent compacter la chromatine. La forme de poche des protéines CBX représente le chromodomaine qui reconnaît H3K9/K27Me3. HPH1, 2 et 3 symbolisent les *human polycomb homologues* 1, 2 et 3. X, Y et Z représentent des protéines variées comme SCMH1/2, FBXL10, E2F6 et JARID1D qui peuvent contribuer à la formation des complexes *PRC1-like*, dont la composition est toujours indéfinie. (Adaptation de (Margueron et al., 2011)).

Les souris *Bmi1*^{-/-} présentent plusieurs phénotypes anormaux affectant le développement du squelette de la souris, le système hématopoïétique ainsi que le système nerveux. Tout d'abord, ces souris montrent une diminution progressive du nombre de cellules hématopoïétiques ainsi qu'une altération de la réponse de ces cellules aux mitogènes. Au niveau neurologique, elles manifestent une démarche ataxique et des crises pouvant ressembler à des crises d'épilepsie. Ces symptômes apparaissent généralement entre 2 et 4 semaines et augmentent considérablement avec l'âge. Finalement, des changements morphologiques importants du squelette sont observés le long de l'axe antéropostérieur de l'animal. Les souris *Bmi1*^{-/-} présentent un retard de croissance important. Ces défauts dans le développement général de la souris résultent en une mort précoce de l'animal vers 30 jours de vie [38].

2.4. *Bmi1*, la prolifération cellulaire, la sénescence et l'apoptose

Bmi1 et les PcG jouent un rôle primordial dans la prolifération cellulaire. L'analyse des possibles cibles transcriptionnelles de *Bmi1* a permis d'identifier son rôle de répresseur du locus *ink4a*. Les MEFs déficientes pour *Bmi1* ne peuvent progresser dans la phase S du cycle cellulaire et entrent en sénescence de façon précoce. Elles présentent aussi une surexpression importante des suppresseurs de tumeurs *p16*^{*ink4a*} et *p19*^{*arf*}, encodé par *ink4a*. De plus, la surexpression de *Bmi1* engendre une diminution de

l'expression de *ink4a*. Les souris déficientes pour *Bmi1* et *ink4a* présentent une amélioration des altérations du systèmes hématopoïétique et nerveux présentent chez les souris *Bmi1*^{-/-} [39]. Ces observations s'expliquent par le fait que p16 régule la voie Rb qui mène à l'arrêt du cycle cellulaire et à la sénescence et que p19 régule le supprimeur de tumeur p53 menant à l'apoptose (Figure 7) [40]. Certaines études suggèrent aussi que *Bmi1* préviendrait la sénescence via la régulation de l'activité de la télomérase. *Bmi1* empêcherait le raccourcissement prématuré des télomères par l'induction de la télomérase [40, 41].

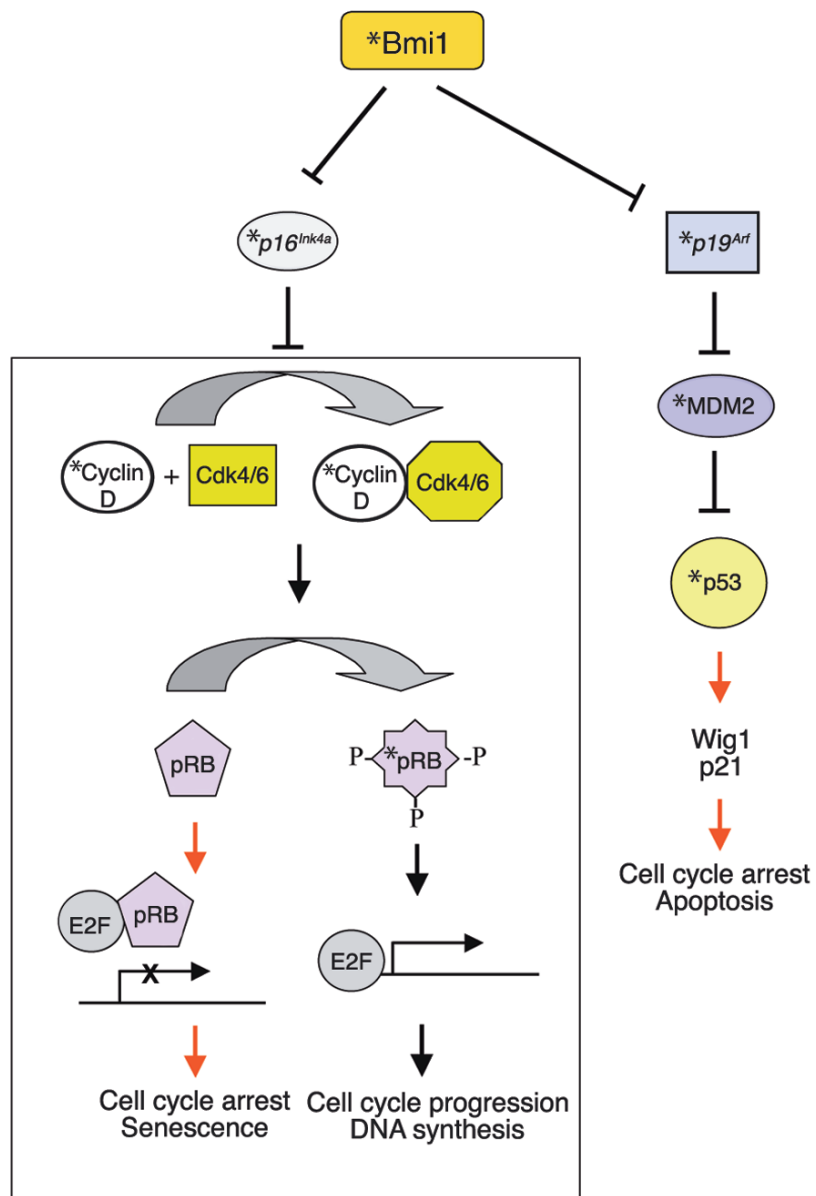


Figure 7. Régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose par *Bmi1*.

Dans des cellules souches normales, $p16^{ink4a}$ et $p19^{arf}$ sont réprimés par *Bmi1*. En absence de $p16^{ink4a}$, le complexe cycline D/Cdk4/6 va phosphoryler pRB. Cet évènement va permettre la liaison du facteur de transcription E2F à l'ADN et mener à la progression dans le cycle cellulaire et à la synthèse de l'ADN. Par ailleurs, en absence de $p19^{arf}$, l'ubiquitine ligase MDM2 va causer la dégradation de p53 résultant en une faible concentration du suppresseur de tumeur. Ceci prévient l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire. L'absence de *Bmi1* relâche la répression du locus *Ink4a*, ce qui augmente les niveaux de $p16^{ink4a}$ et $p19^{arf}$. Ceci résulte en l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et l'apoptose. Les protéines affectées par des hauts et bas niveaux de *Bmi1* sont représentées par des flèches noires et rouges, respectivement. *Sites de mutations fréquents dans le cancer.

2.5. *Bmi1* et l'auto-renouvellement des cellules souches

Bmi1 est impliqué dans l'auto-renouvellement des cellules souches en empêchant la sénescence précoce, soit via la régulation de gènes directement impliqués ou par la régulation de la télomérase. Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) et neuronales (NSC) expriment fortement *Bmi1*. La diminution de l'auto-renouvellement des HSCs et NSCs déficientes pour *Bmi1* engendre leur disparition après la naissance [42, 43]. Par contre, la prolifération et la survie des progéniteurs ne sont pas affectées [42]. *Bmi1* n'est donc pas essentiel à la différenciation efficace des cellules souches en progéniteurs mais est primordiale à l'auto-renouvellement en empêchant la sénescence précoce. D'autre part, tel que mentionné précédemment, la régulation de l'activité de la télomérase par *Bmi1* joue un rôle important dans l'entrée de la cellule souche en sénescence et donc, dans l'auto-renouvellement de celle-ci [40, 41]. Étant donné les multiples phénotypes anormaux des souris *Bmi1*^{-/-}, allant des problèmes neurologiques aux malformations du squelette axial, il est probable que *Bmi1* régule l'auto-renouvellement des cellules souches d'une grande variété de types cellulaires [40].

2.6. *Bmi1* et les dommages à l'ADN

Au cours de la vie d'une cellule, plusieurs sources endogènes et exogènes peuvent entraîner des dommages à l'ADN. Afin d'enrayer l'accumulation de ces

dommages, la cellule possède des mécanismes capables de les détecter et de les réparer. Afin de détecter ces dommages, deux kinases principales sont déterminantes pour la réponse aux dommages à l'ADN (DDR): Ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM) et Ataxia telangiectasia and rad 3-related kinase (ATR). Les bris doubles brins (DSBs) vont généralement activer ATM, qui va ensuite phosphoryler plusieurs cibles dont la protéine Chk2 [44, 45]. Un défaut dans le processus de recombinaison nécessaire à la réparation des DSBs est, en effet, noté chez les fibroblastes mutants pour ATM [46]. Le stress réplicatif, quant à lui, va entraîner l'activation d'ATR qui va ensuite phosphoryler, entre autre, Chk1 [47, 48]. Chk1 et Chk2 sont des kinases qui permettent l'arrêt du cycle cellulaire lorsque la présence de dommages à l'ADN est détectée. Ces kinases vont phosphoryler plusieurs cibles, dont le suppresseur de tumeur p53, et entraîner l'arrêt du cycle cellulaire [49]. Cet arrêt donne le temps à la cellule de réparer ces dommages grâce à plusieurs mécanismes avant d'entrer de nouveau en mitose. Si les dommages ne sont pas réparés correctement, cette cascade de réponse aux dommages à l'ADN peut ultimement mener à l'apoptose de la cellule [44].

Aux cours des dernières années, une nouvelle fonction de *Bmi1* a été mise en lumière. À partir de cellules humaines de Glioblastoma multiforme (GBM), un cancer du cerveau agressif et résistant à la radiothérapie, il a été possible de montrer l'interaction de BMI1 avec les protéines de la réponse aux dommages à l'ADN. Les cellules GBM déficientes pour BMI1 présente une altération importante de l'efficacité de la réparation des DSBs rendant les cellules plus sensibles aux radiations. De plus, la surexpression de BMI1 augmente le recrutement d'ATM à la chromatine et diminue la sensibilité des cellules GBM à la radiation[50]. Par ailleurs, d'autres études ont montré que BMI1 est recruté aux DSBs où il contribue à l'ubiquitination de γ H2AX et de l'histone H2A, des marques qui permettent à la DDR de reconnaître le site de dommages. En stimulant l'accumulation de ces marques, BMI1 contribue au recrutement de la DDR et à la réparation de l'ADN. Le maintien de BMI1 aux sites de dommages est dépendant de ATM/ATR, de la phosphorylation de γ H2AX ainsi que du recrutement de la ligase E3 de l'ubiquitine RNF8 [51, 52].

2.7. *Bmi1* et le stress oxydatif

Le métabolisme normal d'une cellule engendre la production de radicaux libres (ROS). Les ROS sont des molécules très réactives car elles possèdent un ou plusieurs électrons non-appariés. La plupart des ROS sont issus de la respiration cellulaire ayant lieu dans la mitochondrie. Par contre, certaines sources exogènes peuvent aussi engendrer la production de ROS, comme les rayons UV et gamma ainsi que certains polluants environnementaux [53]. À faible concentration, les ROS peuvent avoir un effet bénéfique sur la cellule. Ils jouent un rôle important dans certaines voies de signalisation cellulaire, entre autre via la régulation de facteurs de transcription, et dans l'induction de la réponse aux mitogènes [54, 55]. Par contre, à haute concentration, les ROS peuvent engendrer des dommages importants à certaines composantes de la cellule, comme aux lipides et membranes, aux protéines et acides nucléiques [56, 57]. La peroxydation des lipides et la formation de 8-oxoguanine au niveau de l'ADN de la cellule sont des marqueurs communs d'une accumulation de ROS [53]. Les effets dommageables des ROS sont contrecarrés par les antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques de la cellule [58].

Un déséquilibre entre le niveau de ROS intracellulaire et les défenses antioxydantes est un signe caractéristique du vieillissement d'un organisme [59]. *Bmi1* joue un rôle dans la régulation des défenses antioxydantes dans les neurones et, de ce fait, les souris *Bmi1*^{-/-} présentent un phénotype de vieillissement prématuré du cerveau. Les neurones *Bmi1*^{-/-} sont hypersensibles à plusieurs agents neurotoxiques et présentent une concentration anormalement élevée de ROS. Les principaux rôles de *Bmi1* dans le métabolisme des ROS au niveau neuronal sont liés à son action répressive de l'activité pro-oxydante de *p53* dans ce type cellulaire [60]. De plus, le processus de vieillissement normal du cerveau, chez la souris et chez l'homme, engendre une diminution de l'expression de *Bmi1*, une augmentation de la répression des gènes antioxydants par *p53*, et une accumulation de dommages oxydatifs à l'ADN et aux lipides [61]. Une étude récente révèle aussi que *Bmi1* confère une résistance accrue au stress oxydatif dans les cellules souches hématopoïétiques [62]. Par ailleurs, les cellules de plusieurs autres

tissus déficients pour *Bmi1* présentent une augmentation de la présence de ROS. Une analyse approfondie sur des thymocytes *Bmi1*^{-/-} a révélé une fonction mitochondriale altérée et une augmentation de dommages oxydatifs à l'ADN résultant en une activation de la DDR. Ces thymocytes traités pendant une semaine avec le N-acétylcystéine (NAC), une molécule antioxydante, ont vu leur phénotype s'améliorer considérablement. Une proportion importante des phénotypes observés chez la souris *Bmi1*^{-/-} a aussi pu être rétablie par la délétion de *Chk2*[63].

2.8. Rôle de *Bmi1* dans le développement rétinien

Tel que mentionné précédemment, le développement de la rétine est causé par la prolifération et la différenciation des RPCs en diverses lignées cellulaires. Sachant que *Bmi1* est essentiel à l'auto-renouvellement des HSCs et des NSCs, une étude s'est penchée sur l'importance de *Bmi1* dans le développement rétinien. Les résultats révèlent le rôle essentiel de *Bmi1* dans l'auto-renouvellement et la prolifération de la plupart des RPCs immatures. *Bmi1* est, de plus, essentiel au développement post-natal de la rétine chez la souris. La délétion de *Bmi1* résulte en une réduction du diamètre de la rétine. Le déficit d'auto-renouvellement des RPCs *Bmi1*^{-/-} a été partiellement rétabli par la co-inactivation de p53 [64].

2.9. Rôle de *Bmi1* dans la neurodégénérescence

Une perte de connexions synaptiques, une démyélination des axones, une gliose réactionnelle ainsi que des dommages mitochondriaux sont observés dans le cerveau des souris *Bmi1*^{-/-} de 4 semaines [65]. Le rôle de *Bmi1* dans la régulation des défenses antioxydantes du cerveau a un effet neuroprotecteur et prévient la neurodégénérescence prématurée [61]. Le vieillissement prématuré du cerveau *Bmi1*^{-/-} lié au stress oxydatif accru pourrait donc entraîner l'apparition de signes de neurodégénérescence. La diminution progressive de l'expression de *Bmi1* dans les neurones pourrait être une des

causes de l'augmentation du risque de développer plusieurs maladies neurodégénératives avec l'âge [61, 65].

HYPOTHÈSE DE RECHERCHE ET OBJECTIFS

Bmi1 est un répresseur transcriptionnel nécessaire à l'auto-renouvellement et à la prolifération des RPCs et est essentiel au développement post-natal de la rétine [64]. Son rôle de régulateur des défenses antioxydantes dans les neurones a un effet neuroprotecteur. Les souris déficientes pour Bmi1 montrent un phénotype de vieillissement prématuré du cerveau et des signes de neurodégénérescence [61, 65]. Ces observations suggèrent la possibilité que *Bmi1* pourrait être impliqué dans le développement et la neuroprotection des photorécepteurs, ces neurones rétiniens photosensibles. L'objectif principal de ce projet est donc d'évaluer le rôle de *Bmi1* dans le développement et la survie des photorécepteurs à l'aide d'un modèle murin. Notre hypothèse est que *Bmi1* est essentiel au développement et/ou à la survie des photorécepteurs via son rôle de régulateur des défenses antioxydantes dans les neurones.

1. Caractérisation du phénotype des photorécepteurs des souris *Bmi1*^{-/-}.

Afin de déterminer si notre hypothèse est juste, nous avons analysé le phénotype des différents photorécepteurs chez les souris déficientes pour *Bmi1*. Nous avons comparé leur morphologie, leur photosensibilité et leur nombre aux photorécepteurs des souris de type sauvage (WT). Nous avons aussi observé l'évolution du phénotype au cours du vieillissement *in vivo* ainsi qu'*in vitro*, en culture primaire.

2. Déterminer le mécanisme moléculaire, régulé par *Bmi1*, qui est impliqué dans le développement et la survie des photorécepteurs.

Afin de déterminer le mécanisme moléculaire régulé par Bmi1, nous avons effectué des expériences de génétique inverse et analysé le phénotype des différents mutants. Nous avons vérifié l'activation de différentes voies et mécanismes moléculaires reconnus pour être régulés par Bmi1, dont celle régulant les défenses antioxydantes. Nous avons finalement aussi effectué l'analyse du patron d'expression de différents gènes dans les rétines des souris *Bmi1*^{-/-}.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Animaux

Les souris *Bmi1*^{-/-} (de la souche C57B1/6, cadeau de M. Van Lohuizen, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam), les souris *Bmi1*^{-/-}*Chk2*^{-/-} (cadeau de Toren Finkel, National Heart, Lung and Blood Institute, Bethesda, Maryland) les souris consanguines de type sauvage, les souris *Bmi1*^{-/-}*p16*¹⁹^{-/-}, *Bmi1*^{-/-}*p19*^{-/-} (Charles River laboratories), et les souris *p53*^{+/-} (The Jackson Laboratory) ont été utilisées en accord avec le Comité de soins aux animaux du Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont.

2. Immunomarquage

Les tissus ont été fixés pour 1h à température pièce dans une solution 4% paraformaldéhyde dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4 (PBS). Les tissus ont ensuite été lavés 3 fois avec du PBS, cryoprotégés dans une solution PBS/30% sucrose, congelés dans un milieu d'enrobage CRYOMATRIX (Thermo Shandon) dans l'azote liquide et conservés à -80 °C. Autrement, les tissus ont été fixés dans une tampon 10% formaline et enrobés dans de la paraffine. Des coupes de huit micromètres ont ensuite été montées sur des lames de verres SuperFrost (Fisher Scientific) et soumis à un protocole d'immunohistochimie ou d'immunofluorescence. Pour l'immunofluorescence, les coupes ont été incubées 1h à température pièce avec une solution de blocage constituée de 5% sérum de cheval/PBS et ensuite une nuit avec la solution d'anticorps primaire à 4°C dans une chambre humide. Après 3 lavages au PBS, les coupes ont ensuite été incubées 1h avec la solution d'anticorps secondaire à température pièce à la noirceur. Les lames ont ensuite été lavées 3 fois avec du PBS et montées avec des lamelles de verre (VWR) dans un milieu contenant du DAPI (Vector laboratories). Pour le marquage de l'anion superoxyde, la lame a été incubée dans une solution contenant 5

μ M de l'agent MitoSoxRed (Invitrogen) pendant 10 minutes à 37°C. La lame a ensuite été lavée 3 fois avec du PBS et montée avec une lame de verre et le milieu contenant du DAPI. Pour l'immunohistochimie, les coupes de tissus fixés avec la formaline et enrobés dans de la paraffine ont été déparaffinés et réhydratés dans une solution de xylène (Surgipath) 2 fois 10 minutes, 2 fois 10 minutes dans une solution 100% Alcool de réactif (Surgipath) et finalement 2 fois 5 minutes dans de l'eau distillée. Les lames ont ensuite été incubées 10 minutes dans une solution de citrate de sodium (Sigma Aldrich) 10 mM à pH 6 portée à ébullition pour révéler les antigènes. La peroxydase endogène des tissus a ensuite été inactivée par un traitement au peroxyde d'hydrogène (Sigma Aldrich) 3% pour 10 minutes. Les lames ont ensuite été incubées 1h à température pièce avec un solution de blocage constituée de 5% sérum de cheval (Sigma Aldrich)/PBS et une nuit avec la solution d'anticorps primaire à 4°C dans une chambre humide. Les coupes ont ensuite été analysées en utilisant le Vectastain ABC Kit (Vector laboratories) en suivant les recommandations du fabricant. Le complexe a finalement été révélé avec le substrat chromogène brun DAB (3,3'-diaminobenzidine) (Sigma Aldrich). Les tissus ont ensuite été colorés, ou non, en les plongeant dans une solution d'hématoxyline (Sigma Aldrich). Elles ont ensuite été lavées 10 fois dans l'eau distillée et déshydratées 10 fois dans l'éthanol 95%, 10 fois dans l'éthanol 100% et 10 fois dans le xylène. Les lames ont ensuite été montées en utilisant le milieu de montage Permount (ThermoFisher Scientific) et des lamelles de verre (VWR). Les anticorps utilisés pour les immunomarquages sont: anti-Sopsin (Millipore) 1:300, Anti-8oxoguanine (Chemicon International) 1:200, Anti-Rhodopsine 4D2 (Un cadeau de Rober S.Molday, Ph.D., du Département de Biochimie et Biologie moléculaire de l'Université de Colombie-Britannique) 1:50, Anti-Bmi1 (Millipore) 1:200.

Les observations ont ensuite été faites à l'aide d'un microscope Zeiss Imager.Z2 et les images ont été acquises avec une caméra Zeiss Axiocam MRm et le logiciel AxioVision rel.4.8.

3. PCR en temps réel

Les yeux de souris à P30 ont été disséqués à l'aide de pinces et d'une aiguille dans du PBS 1X afin d'en extraire uniquement la rétine neurale. Un trou a été percé à l'aide de l'aiguille au niveau de la pupille. À l'aide de deux paires de pinces, les tissus enveloppant la rétine neurale ont été déchirés en tirant sur la cornée de part et d'autre du trou préalablement effectué. Cette technique permet de systématiquement libérer la rétine des différents autres tissus de l'oeil. L'ARN des rétines a ensuite été extrait avec le réactif Trizol (Invitrogen), selon le protocole fourni par le fabricant, et conservé à -80°C. L'ARN a ensuite été dilué avec de l'eau distillée traitée diéthylpyrocarbonate (DEPC) pour obtenir un volume total de 9 µl et 1 µl d'oligodT 12-18 (Invitrogen) a été ajouté. La solution a ensuite été incubée à 65°C pour 10 minutes afin de dénaturer l'ARN et mis sur glace 5 minutes. La réaction de transcription inverse a été induite en ajoutant à chaque échantillon d'ARN 10 µL de Master Mix constitué de 4 µL de RT buffer 5x (Invitrogen), 3 µL d'eau distillée DEPC, 1 µL de DTT (dithiothréitol) 0,1 M (Invitrogen), 1 µL de dNTP 10 mM (mélange équimolaire des désoxynucléotides triphosphates: dATP, dTTP, dGTP et dCTP, Sigma), 0,5 µL de RNAGuard et 0,5 µL de l'enzyme Transcriptase inverse, M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase (RT) (Invitrogen), et en incubant à 37°C pendant 1 heure. Les tubes ont ensuite été conservés à -20°C.

La réaction d'amplification par PCR en temps réel a ensuite été effectuée dans une plaque 96 puits (Sarstedt). Chaque puits contenait: 10 µl d'eau DEPC, 12,5 µl Platinum SYBR Green (Invitrogen), 20 ng d'amorces, 0,5 µl ROX dilué 1:60 et 1 µl d'ADNc. Les conditions d'amplifications étaient: 10 minutes 50°C, 10 secondes 95°C, 20 secondes 95°C et 35 secondes 65°C pendant 50 cycles. La réaction a été effectuée dans un thermocycleur ABI 7500 (Applied Biosystems) et les résultats ont été analysés avec le logiciel 7500 software v.2.0.5.

Les séquences des amorces utilisées:

Bmi1

(F) 5'-GGAGACCAGCAAGTATTGTCCTATTTG-3'

(R) 5'-CTTACGATGCCCAGCAGCAATG-3'

Apaf1

(F) 5'-TGCTCAGCGGATAAGAAGGT-3'

(R) 5'-TCCCAGAGC- TTGAGGAAGAA-3'

xCT

(F) 5'-TGGAGGTCTTTGGTCCTTTG-3'

(R) 5'-CCAGGATGTAGCGTCCAAAT-3'

GST-1 α

(F) 5'-CGCCACCAAATATGACCTCT-3'

(R) 5'-CCATGGCTCTTCAACACCTT-3'

NQO1

(F) 5'-TTCTCTGGCCGATTCAGAGT-3'

(R) 5'-GAGTGTGGCCAATGCTGTAA-3'

Sestrin2

(F) 5'-CCTCCTTTGTGTTGTGCTGT-3'

(R) 5'-ACGGTTCTCCATTTCCCTCCT-3'

Cyp24a1

(F) 5'-GGCTCCTTCAAAGGACACA-3'

(R) 5'-GATGCAGGGCTTGA CTGATT-3'

LPO

(F) 5'-GACTTTGCCCTGAAACTGA-3'

(R) 5'-GAACATGATGGGGAAGCAGT-3'

Duox2

(F) 5'-ACAAGGGGTGTATGCCTTTG-3'

(R) 5'-CACAGGTTGTGGTAGGGAAA-3'

Alox15

(F) 5'-TACCTGTGGTTGATCGGACA-3'

(R) 5'-TGCCATTTCTGCACTCTCAC-3'

Fas/CD95

(F) 5'-AAACAAACTGCACCCTGACC-3'

(R) 5'-CAACCATAGGCGATTTCTGG-3'

Hprt

(F) 5'-ACTGTAATGATCAGTCAACGGG-3'

(R) 5'-GGCCTGTATCCAACACTTGG-3'

4. Microscopie électronique

Les yeux de souris à P30 ont été fixés dans une solution 2% paraformaldéhyde/2,5% glutaraldéhyde à 4°C durant une nuit et déshydratés dans une succession de solutions à concentration croissante d'éthanol. Les tissus ont ensuite été enrobés dans une résine Epon et coupés en tranche de 1 µm et placés sur des grilles. Les tissus ont ensuite été colorés avec de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb. Les coupes ont ensuite été observées au microscope électronique à transmission.

5. Électrorétinogramme

Les électrorétinogrammes (ERG) ont été effectués par Joëlle Lavoie du laboratoire de Marc Hébert, de l'Université Laval, Québec. Les animaux ont été anesthésiés avec un mélange de kétamine (80 mg/kg) et xylazine (10mg/kg) injecté par voie intrapéritonéale. La température de l'animal a été maintenue entre 36 et 38°C avec une couverture homéothermique durant toute la durée de l'ERG. Seulement l'œil gauche a été analysé. La pupille a été dilatée avec une goutte de 1% tropicamide (Alcon Canada) appliquée sur la surface cornéenne. La cornée a été anesthésiée avec 0,5%

chlorydrate de proparacaine (Alcon Canada). Les enregistrements ont été faits avec une électrode DTL (Statex) formant une boucle et placée à la surface de la cornée. Les électrodes de référence et de terre (Grass technologies, Astromed) ont été placées à la queue et la bouche de la souris, respectivement. Les stimulations par flash ont été produites avec une lumière blanche générée par des diodes (pour l'ERG scotopique) et par des flashes au xénon (pour l'ERG photopique) logés dans le Ganzfeld Color Dome (Espion, Diagnosys) pour stimuler complètement la rétine.

L'ERG scotopique a été utilisé pour mesurer la fonction des bâtonnets. Après une adaptation à la noirceur d'une nuit, les souris ont été préparées pour l'ERG sous une lumière rouge tamisée. La réponse à la lumière en condition scotopique a été obtenue en soumettant la rétine à 10 flashes lumineux d'intensité croissante allant de -3,62 à 0,46 log cd x sec/m², avec des intervalles inter-stimulus de 15 secondes (pour les 4 premières intensités) et de 30 secondes (pour les 6 dernières intensités). L'ERG photopique a été utilisé pour mesurer la fonction des cônes. Après une adaptation de 10 minutes à une lumière de 30 cd/m², la réponse à la lumière en condition photopique a été obtenue en générant 9 stimuli d'intensités brèves variant de -0.81 à 2.86 log cd x sec/m², avec des intervalles inter-stimulus de 15 secondes (pour les 3 premières intensités) et de 30 secondes (pour les 6 dernières intensités). En conditions photopique et scotopique, pour chaque stimulation, au moins 4 réponses ont été calculées afin d'obtenir un rapport signal-sur-bruit élevé et de confirmer la reproductibilité de la réponse.

5.1. Analyse des résultats des ERG

La réponse ERG est d'abord composée d'une onde négative appelée onde a, suivie d'une onde positive appelée onde b. L'onde a est principalement générée par la réponse des photorécepteurs, tandis que l'onde b est causée par la réponse des cellules bipolaires. Par convention, l'amplitude de l'onde a est mesurée du niveau de base jusqu'au creux et l'amplitude de l'onde b est mesurée du creux de l'onde a jusqu'au sommet de l'onde b (Figure 8) [66].

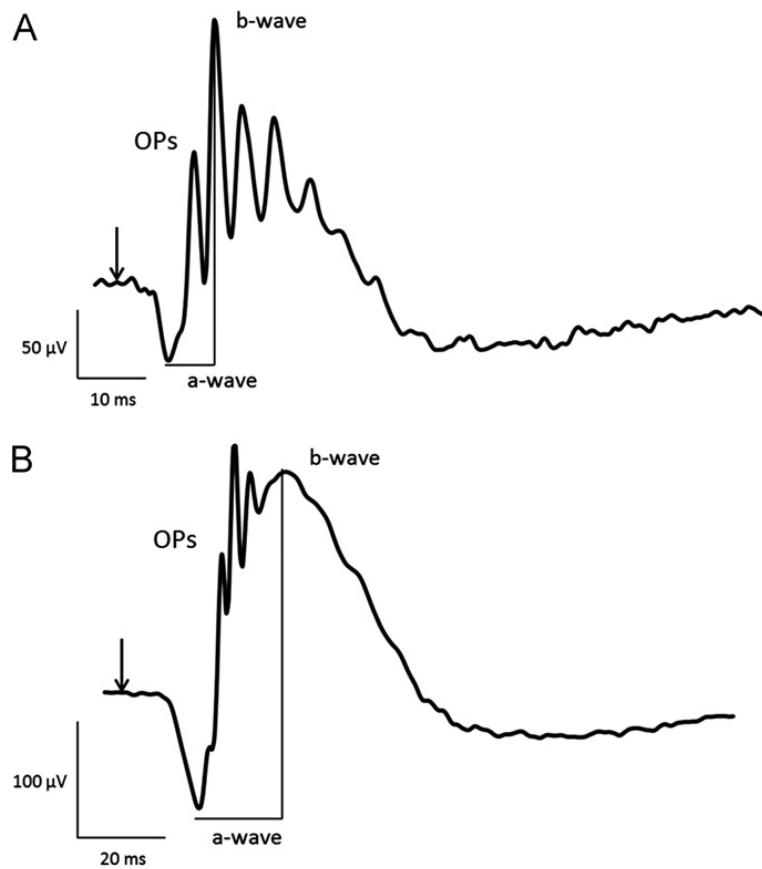


Figure 8. Exemples d'ondes d'électrorétinogramme de souris.

(A) Onde obtenue en condition photopique. (B) Onde obtenue en condition scotopique. L'amplitude de l'onde a est mesurée du niveau de base jusqu'au creux. L'amplitude de l'onde b est mesurée du creux de l'onde a jusqu'au sommet de l'onde b. Les flèches indiquent le déclenchement du flash lumineux (Adaptation de Lavoie et al., 2013).

6. Culture de cellules de la rétine

Les yeux de souris à P5 ont été disséqués à l'aide de pinces et d'une aiguille dans du HBSS 1X oxygéné (Life technologies) afin d'en extraire uniquement la rétine neurale. Un trou a été percé à l'aide de l'aiguille au niveau de la pupille. À l'aide de deux paires de pinces, les tissus enveloppant la rétine neurale ont été déchirés en tirant sur la cornée de part et d'autre du trou préalablement effectué. Cette technique permet de systématiquement libérer la rétine des différents autres tissus de l'oeil. Les rétine ont

ensuite été re-suspendues dans une solution enzymatique (10 ml HBSS 1X, 9,3 mg de Papain (Worthington), 1,632 mg de N-acetyl L-cysteine (Sigma Aldrich), 0,5 mg de DNaseI (Roche) et 10 μ l EDTA 500 mM (Fisher Scientific)) et incubées 10 minutes à 37°C. Après centrifugation, les cellules ont été dissociées dans un milieu de culture composé de 0,02 μ g/ μ l NGF (Invitrogen), 0,02 μ g/ μ l BDNF (Invitrogen), 1% B27 (Invitrogen), 70 μ g/ml gentamycine (Invitrogen), 1% Sérum foetal bovin (Wisent) , 0,5% glucose (Sigma Aldrich) et 10 μ M Forskolin (Sigma Aldrich) dilué dans du Neurobasaltm Medium (Life technologies). Les cellules ont ensuite été réparties et cultivées sur des lames de verre traitées avec la Poly-L-lysine hydrobromide (Sigma Aldrich) et du BD Matrigel Matrix (BD Biosciences).

7. Analyses statistiques

Les données sont présentées en moyenne + écart type, tel que mentionné dans les figures. Les différences statistiques ont été analysées en utilisant le test *t* de Student.

RÉSULTATS

1. Caractérisation du phénotype des photorécepteurs des souris *Bmi1*^{-/-}

1.1. Diminution du nombre et anomalies morphologiques des cônes chez les souris *Bmi1*^{-/-}.

Afin de vérifier si le gène *Bmi1* joue un rôle dans le développement et le maintien des photorécepteurs, une analyse par immunohistochimie du phénotype des cônes chez les souris de 30 jours WT et *Bmi1*^{-/-} a été effectuée (Figure 9A). Pour ce faire, un anticorps contre la S-opsine, un des pigments spécifiques aux cônes, a été utilisé. Les résultats montrent que la rétine de souris déficiente pour *Bmi1* présente des S-cônes anormaux. En effet, le patron de distribution de la S-Opsine dans les rétines de souris *Bmi1*^{-/-} diffère de celui des souris WT. De plus, une morphologie anormale est observée. Certains cônes présentent un gonflement du segment externe. Le dénombrement des S-cônes a aussi permis de révéler une réduction du nombre de cônes d'environ 35% chez les souris *Bmi1*^{-/-} comparativement aux souris WT. Cependant, le nombre de corps cellulaires de photorécepteurs, situé dans la ONL, ne varie pas significativement (Figure 9B). Par ailleurs, l'analyse du phénotype des bâtonnets n'a montré aucune anomalie de distribution ou de morphologie chez ce type de photorécepteurs (Figure 10). Ces résultats suggèrent que *Bmi1* joue un rôle dans le développement et/ou la survie des photorécepteurs de type cônes.

1.2. La mutation du gène *Bmi1* affecte la réponse des cônes aux signaux lumineux.

Étant donné le phénotype anormal des cônes observé chez les mutants, nous avons voulu vérifier si la fonction des photorécepteurs pouvait être affectée par la déficience en *Bmi1*. Pour ce faire, nous avons soumis des souris WT et *Bmi1*^{-/-} à un électrorétinogramme. L'électrorétinogramme est un examen permettant d'évaluer la fonction des photorécepteurs et la fonction post-réceptorale de la rétine. Les tracés d'ERG sont facilement obtenus à l'aide d'une électrode cornéenne, d'une électrode de référence et d'une électrode de terre où l'activité électrique de la rétine est analysée suite

à la présentation d'un stimulus visuel [67].

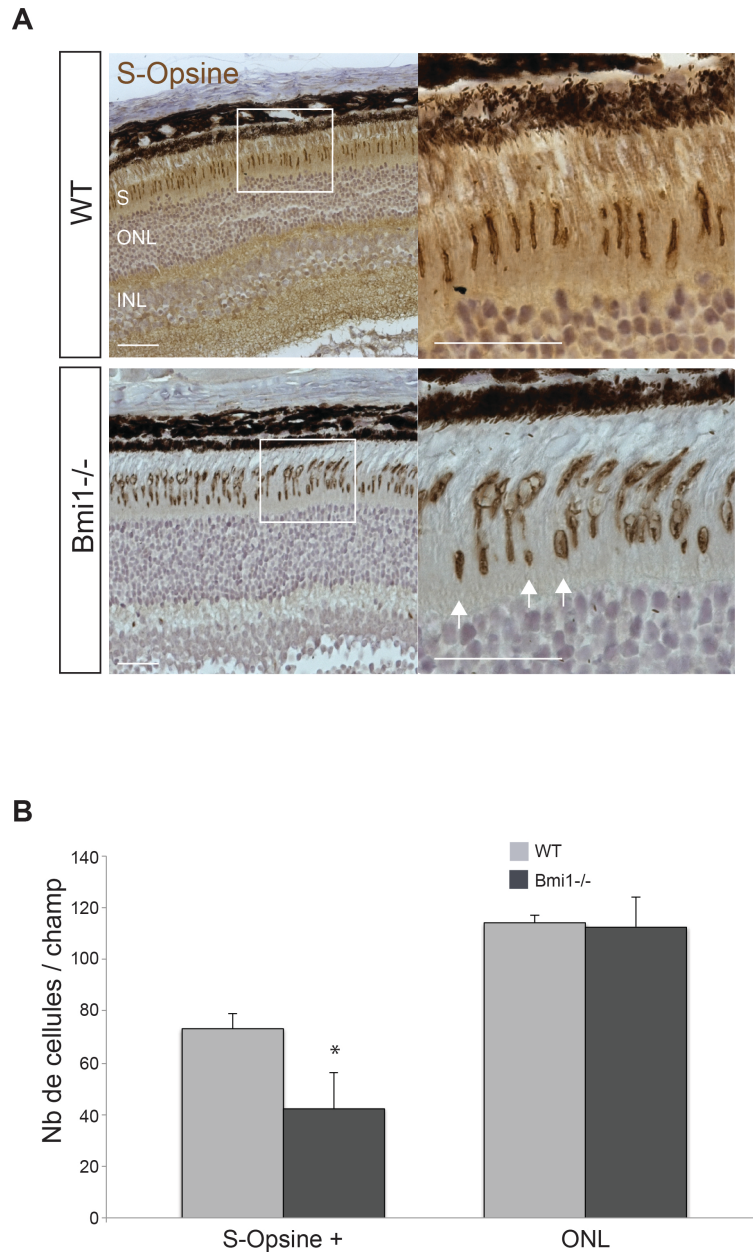


Figure 9. Diminution du nombre et anomalies morphologiques des cônes chez les souris *Bmi1*^{-/-}.

(A) Coupes de rétines de souris de 30 jours marquées par immunohistochimie avec un anticorps contre la S-opsine. Les lames ont été contre-colorées à l'hématoxyline. Les flèches blanches indiquent des cônes à la morphologie anormale. Les cadres blancs indiquent la région agrandie dans l'image de droite. Barre d'échelle: 50 μ m. S : segment. ONL: outer nuclear layer. INL: inner nuclear layer. (B) Quantification du nombre de S-

cônes par champs. Pour chaque échantillon, un champ au niveau de la rétine centrale a été quantifié. Pour chacun de ces champs, le nombre de corps cellulaires dans la ONL a aussi été quantifié. Les résultats sont présentés comme moyenne de 3 échantillons + erreur standard. (n=3, *P<0,05).

Les tracés des ERG ont été compilés et les moyennes des amplitudes des différentes ondes ont été introduites dans un graphique intensité vs réponse. Les courbes intensité vs réponse en condition photopique indiquent clairement une anomalie de la réponse des cônes (onde a) et des cellules bipolaires (onde b) chez la souris *Bmi1*^{-/-} (Figure 11A). L'amplitude de la réponse des cônes aux stimuli lumineux est grandement affectée par la mutation, passant de -215,3 μ V à -86,33 μ V à intensité maximale. Ces résultats confirment que le système des cônes des souris *Bmi1*^{-/-} réagit moins bien à la lumière.

D'autre part, les courbes intensité vs réponse en condition scotopique montrent une légère variation non significative de la réponse des bâtonnets (onde a) et des cellules bipolaires (onde b) (Figure 11B). Ces résultats nous permettent de conclure que la réponse des bâtonnets n'est pas perturbée par la délétion du gène *Bmi1*. Ceci concorde avec les résultats précédents montrant le phénotype normal de ces photorécepteurs chez les souris mutantes.

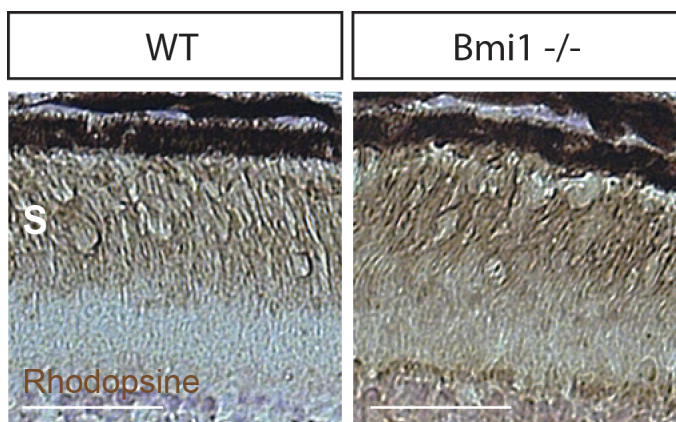


Figure 10. La morphologie des bâtonnets reste normale.

Coupes de rétines de souris de 30 jours marquées par immunohistochimie avec un anticorps contre la rhodopsine. Les lames ont été contre-colorées à l'hématoxyline. S: Segment. Barre d'échelle = 50 μ m.

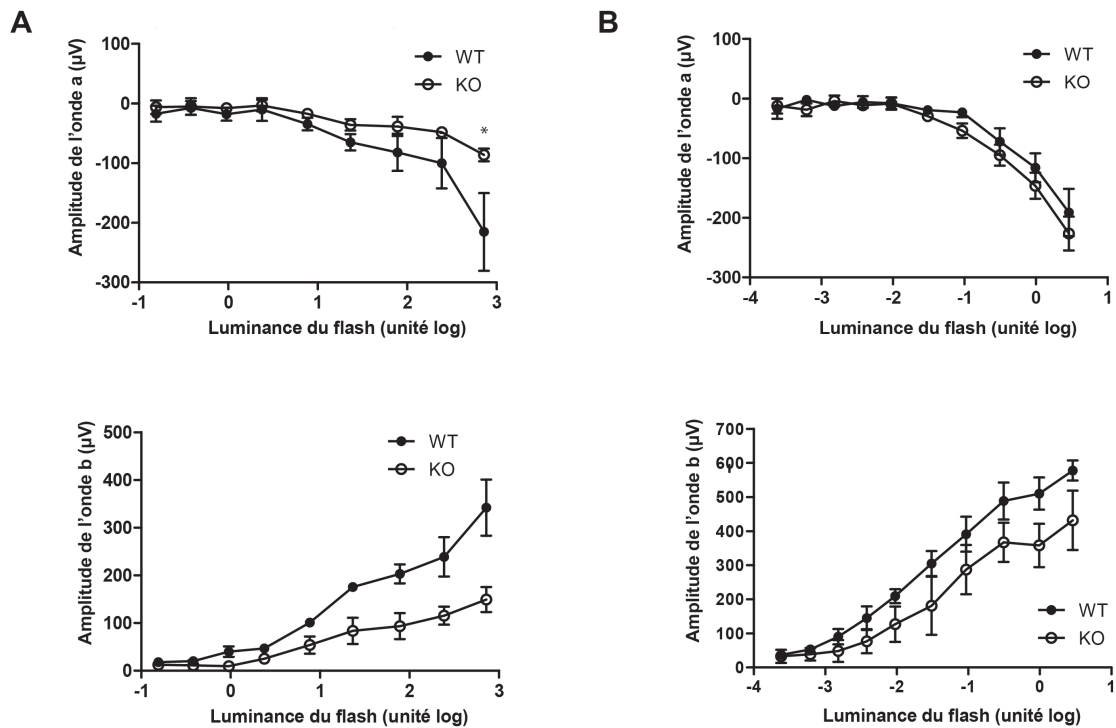


Figure 11. La mutation *Bmi1* affecte la réponse des cônes aux signaux lumineux.

(A) Électrorétinogramme en condition photopique. L'amplitude de l'onde a correspond à la réponse des cônes. L'amplitude de l'onde b correspond à la réponse des cellules bipolaires associées aux cônes. Les tracés montrent l'amplitude des deux ondes en fonction du log de la luminance du flash lumineux. (B) Électrorétinogramme en condition scotopique. L'amplitude de l'onde a correspond à la réponse des bâtonnets. L'amplitude de l'onde b correspond à la réponse des cellules bipolaires associées aux bâtonnets. Les tracés montrent l'amplitude des deux ondes en fonction du log de la luminance du flash lumineux. (WT n=4, *Bmi1*^{-/-} n=3, *P<0,05).

1.3. Les cônes présentent des signes de mort cellulaire.

Nous avons ensuite voulu analyser l'ultrastructure des photorécepteurs afin de détecter d'éventuelles anomalies structurales. Pour ce faire, nous avons observé différents échantillons au microscope électronique à transmission et avons concentré nos observations sur la structure des corps cellulaires retrouvés dans la ONL. Nous avons observé que les cônes *Bmi1*^{-/-} présentaient une compaction de la chromatine et une contraction de la membrane nucléaire (Figure 12, flèches blanches). La formation de corps apoptotiques dans certains cônes a aussi été observée (Figure 12, flèches noires). Ces résultats suggèrent fortement que le processus d'apoptose a été enclenché dans ces cellules. Les corps cellulaires des bâtonnets ne présentent, quant à eux, aucun signe de mort cellulaire (Figure 12, flèches grises). L'analyse de l'ultrastructure des segments internes et externes des photorécepteurs n'a permis de déceler aucune anomalie (Figure 12, image en bas à gauche et en bas au centre).

1.4. Dégénérescence progressive des cônes *Bmi1*^{-/-}.

Afin de déterminer si la réduction du nombre de cônes observée à 30 jours était causée par une dégénérescence progressive de ces cellules, nous avons analysé le phénotype des cônes dans des souris de 5 mois. Par contre, puisque l'unique déficience en *Bmi1* cause la mort prématurée des souris vers l'âge d'un mois, nous avons choisi d'utiliser des souris *Bmi1*^{-/-}*Chk2*^{-/-}. En effet, une étude publiée en 2009 a révélée que la co-délétion de *Chk2* dans les souris *Bmi1*^{-/-} permettait de restaurer partiellement de multiples anomalies normalement présentes chez les mutants *Bmi1*, dont la taille de l'animal, l'anomalie de développement cérébral et la durée de vie [63]. Des rétines de souris *Bmi1*^{-/-}*Chk2*^{-/-} de 30 jours et de 150 jours ont donc été soumises à une analyse par immunohistochimie, avec un anticorps pour la S-Opsine, afin de vérifier l'évolution du phénotype des cônes entre ces deux temps. Les résultats de cette analyse ont révélé une détérioration significative du phénotype et une réduction d'environ 45% du nombre de cônes entre 30 jours et 150 jours de vie (Figure 13). Ces observations suggèrent donc qu'une dégénérescence progressive des cônes au cours du vieillissement de la souris *Bmi1*^{-/-} serait la cause des anomalies observées.

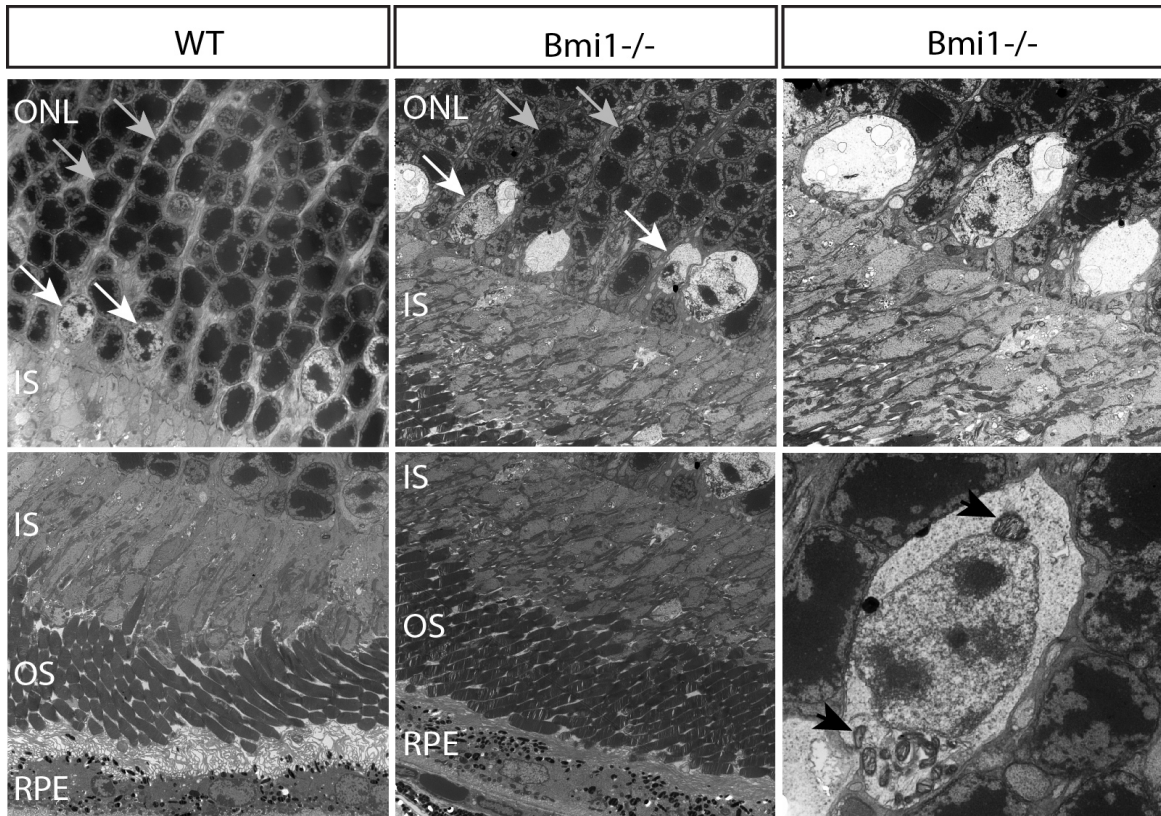


Figure 12. Les cônes présentent des signes de mort cellulaire.

Microscopie électronique à transmission de rétines de souris à 30 jours. Les flèches grises indiquent des corps cellulaires de photorécepteurs de type bâtonnet d'apparence normale dans les deux génotypes. Les flèches blanches indiquent des photorécepteurs de types cônes qui montrent des signes de mort cellulaire chez les souris *Bmi1*^{-/-}. Notez la compaction de la chromatine et la contraction de la membrane nucléaire. Les images de droites sont prises à fort grossissement et permettent de voir la formation de corps apoptotiques (flèches noires). IS : inner segment. OS: outer segment. ONL: outer nuclear layer. RPE: retinal pigment epithelium.

1.5. *Bmi1* est exprimé de façon prédominante dans les photorécepteurs de type cône.

Nos résultats suggérant que la déficience pour *Bmi1* affecte uniquement les cônes, nous avons voulu vérifier si son niveau d'expression diffère entre les bâtonnets et les cônes. Une expression plus élevée de *Bmi1* dans les cônes pourrait suggérer un rôle potentiellement plus important dans ce type de photorécepteurs et expliquerait que la

morphologie et la fonction des bâtonnets ne soient que peu ou pas altérées. Puisqu'aucun anticorps contre un marqueur nucléaire de cônes matures n'est disponible, il était impossible d'effectuer une expérience de co-localisation permettant de vérifier directement l'expression de *Bmi1* dans les cônes. Ainsi, nous avons décidé de comparer l'expression de *Bmi1* dans la ONL entre des rétines de souris WT et des rétines de souris *NRL*^{-/-}. Le gène *NRL* régule la transcription de nombreux gènes essentiels au développement des bâtonnets. Une déficience en *NRL* résulte en l'absence complète de bâtonnets dans la rétine. La totalité des photorécepteurs générés lors du développement rétinien sont des cônes [68]. Des rétines WT et *NRL*^{-/-} ont donc été soumises à un marquage par immunofluorescence avec des anticorps contre *Bmi1* et la S-Opsine. Les résultats révèlent que *Bmi1* n'est pas exprimé de façon uniforme dans toute la couche de photorécepteurs chez la souris WT. Un petit nombre de photorécepteurs montrent un niveau d'expression plus élevé (Figure 14, exemples indiqués par les flèches blanches). Les photorécepteurs de la rétine *NRL*^{-/-}, quant à eux, semblent exprimer fortement *Bmi1* de façon uniforme (Figure 14). En comparant, l'expression de *Bmi1* dans les photorécepteurs des rétines WT et *NRL*^{-/-}, nous observons que les niveaux d'expression de certaines cellules, dont 3 sont indiquées par les flèches blanches, sont similaires aux niveaux d'expression des photorécepteurs *NRL*^{-/-}. Puisque les photorécepteurs de rétines *NRL*^{-/-} sont uniquement des cônes et que, dans une rétine WT, les cônes ne représentent qu'une faible proportion des photorécepteurs, ces résultats suggèrent fortement que les cellules entre autre indiquées par les flèches blanches dans la Figure 14 sont des cônes. De constat, cette expérience révèle que *Bmi1* semble être exprimé de façon prédominante dans les photorécepteurs de type cônes.

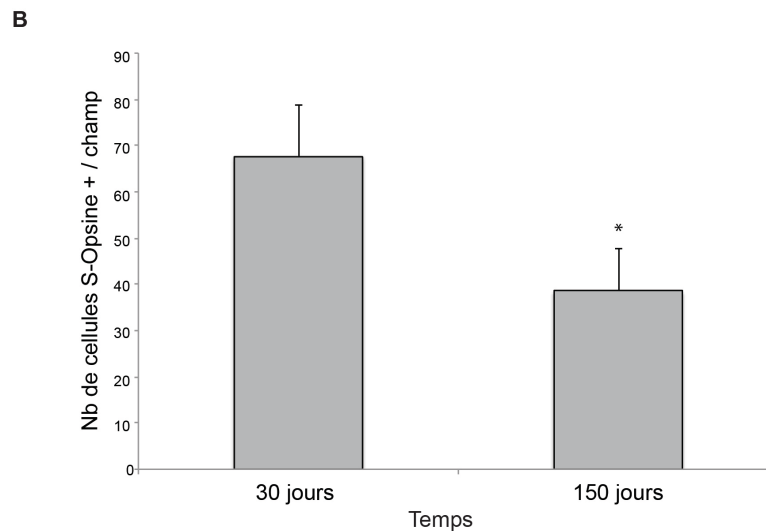
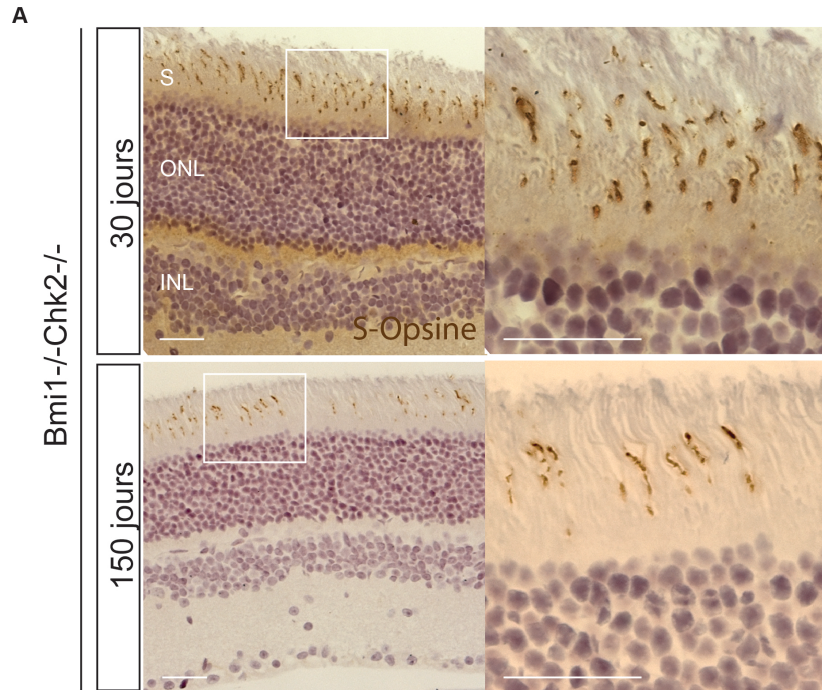


Figure 13. Dégénérescence progressive des cônes *Bmi1*^{-/-}.

(A) Coupes de rétines de souris de 30 jours et de 150 jours marquées par immunohistochimie avec un anticorps contre la S-opsine. Les lames ont été contre-colorées à l'hématoxyline. Les cadres blancs indiquent la région agrandie dans l'image de droite. S : segment. ONL: outer nuclear layer. INL: inner nuclear layer. Barre d'échelle: 50 μ m. (B) Quantification des S-cônes par champ. Pour chaque échantillon, un champ au niveau de la rétine centrale a été quantifié. Les résultats sont présentés comme moyenne des échantillons + erreur standard. (30 jours n=4, 150 jours n=2, *P<0,05).

1.6. Les cônes déficients pour *Bmi1* meurent *in vitro*.

Un phénotype cellule-autonome est un phénotype présent uniquement dans les cellules mutantes pour un gène ou plusieurs gènes donnés. En contrepartie, un phénotype qui n'est pas cellule-autonome en est un où les cellules ayant un génotype mutant entraînent les autres cellules, peu importe leur génotype, à développer un phénotype mutant. Afin de déterminer si le phénotype de dégénérescence des cônes *Bmi1*^{-/-} est cellule-autonome, nous avons procédé à la mise en culture de cellules de rétines dissociées. Il a été démontré que les bâtonnets sécrètent certains facteurs, comme le rod-derived cone viability factor (RdCVF), qui promeut la viabilité des cônes. L'absence de ce facteur peut entraîner la mort des cônes de façon indirecte [69]. Par ailleurs, les cellules du RPE sont aussi capables de sécréter des facteurs de croissance qui contribuent au maintien de l'intégrité structurale des photorécepteurs [70]. La dissection et la dissociation de la rétine permet de retirer l'épithélium pigmenté et empêche le contact direct entre les cellules. De plus, les facteurs sécrétés sont considérablement dilués dans le milieu de culture de sorte que leur contribution devient négligeable. La mise en culture des cellules permet donc d'exclure la possibilité que le phénotype observé soit causé par des modifications des facteurs sécrétés par les autres types cellulaires dans l'environnement des cônes *in vivo*. Des souris WT et *Bmi1*^{-/-} ont été sacrifiées à p5, les rétines ont été dissociées par réaction enzymatique et mise en culture. Des analyses par immunofluorescence ont permis de vérifier l'évolution du phénotype *in vitro*. Tout d'abord, nous avons confirmé l'absence d'expression de *Bmi1* dans les cônes *Bmi1*^{-/-} en culture depuis 4 jours (Figure 15A). Ensuite, la quantification du nombre de cônes à 3 temps donnés a permis de comparer le taux de survie des cônes WT des cônes déficients pour *Bmi1*. Les analyses statistiques révèlent que les cônes *Bmi1*^{-/-} sont significativement ($p < 0,01$) moins nombreux après 12 jours en culture qu'après 4 jours. Cette différence est aussi significative ($p < 0,05$) pour les cônes WT (Figure 15B). Le stress engendré par la mise en culture des cellules peut expliquer la diminution du nombre de cônes WT entre 4 et 12 jours. En effet, la mise en culture de cellules engendre un stress oxydatif considérable qui pourrait avoir un impact sur la viabilité des cellules WT [71]. Par contre, le même stress est imposé aux cellules *Bmi1*^{-/-}

et peut donc être négligé lors de l'analyse des résultats. Après 8 jours en culture, le pourcentage de cônes *Bmi1*^{-/-} restants est significativement moins élevé ($p < 0,05$) que le nombre de cônes WT (Figure 15B). Finalement, après 12 jours en culture, ce nombre est encore moins élevé et l'écart est toujours significatif ($p < 0,01$) (Figure 15B). Ces résultats suggèrent donc que le phénotype de dégénérescence des cônes observé *in vivo* est cellule-autonome.

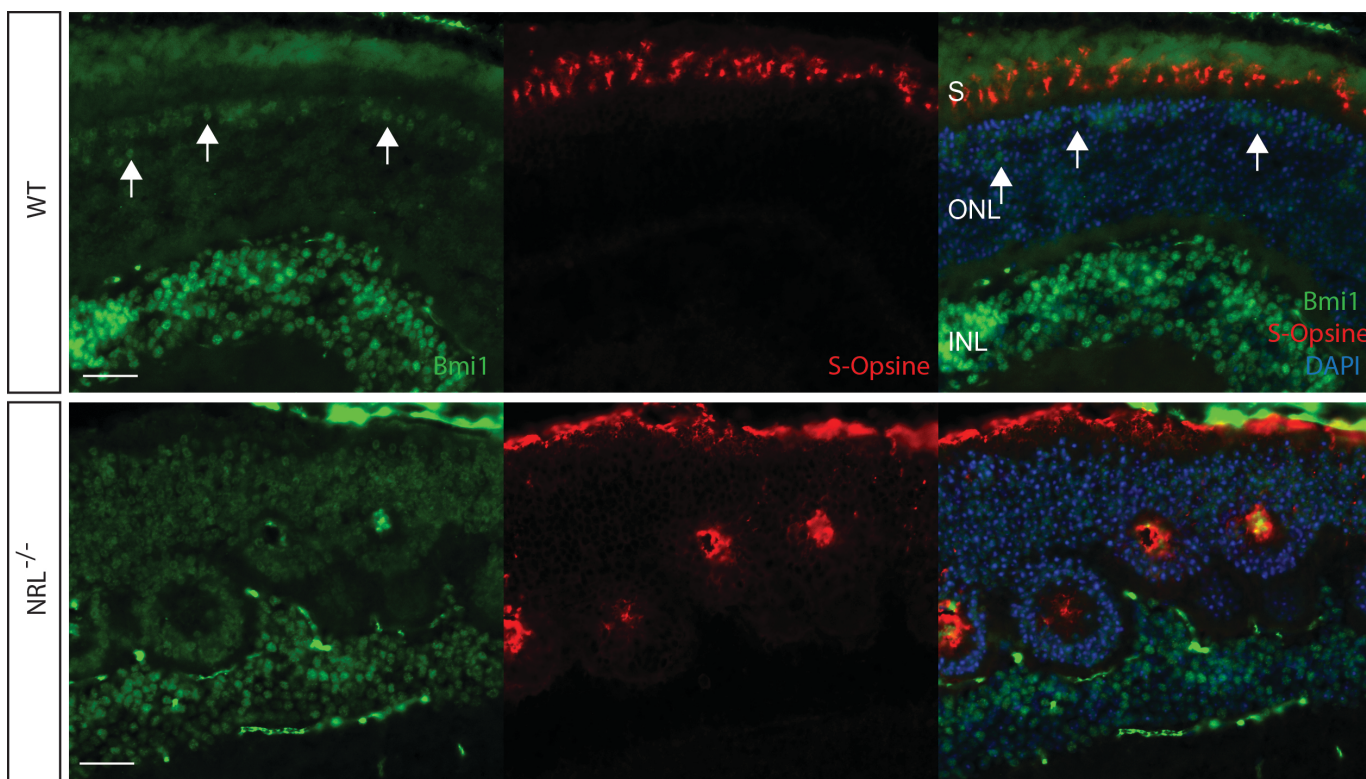


Figure 14. *Bmi1* est exprimé de façon prédominante dans les photorécepteurs de type cône.

Coupes de rétines de souris de 30 jours marquées par immunofluorescence avec des anticorps contre *Bmi1* et la S-opsine. Les flèches blanches indiquent trois exemples de photorécepteurs qui expriment plus fortement *Bmi1*. Notez l'expression uniforme de *Bmi1* dans les cônes *NRL*^{-/-}. S : segment. ONL: outer nuclear layer. INL: inner nuclear layer. Barre d'échelle : 50 μ m.

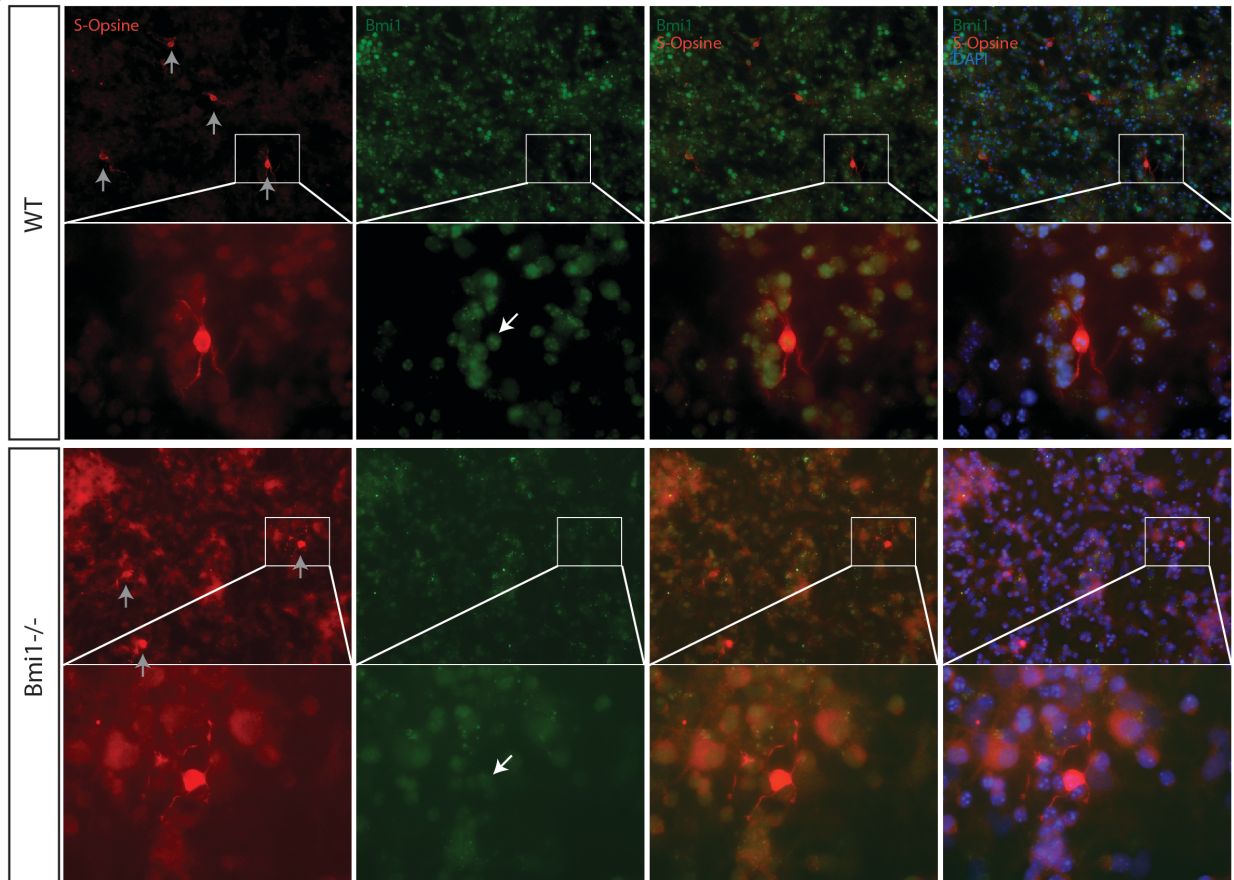
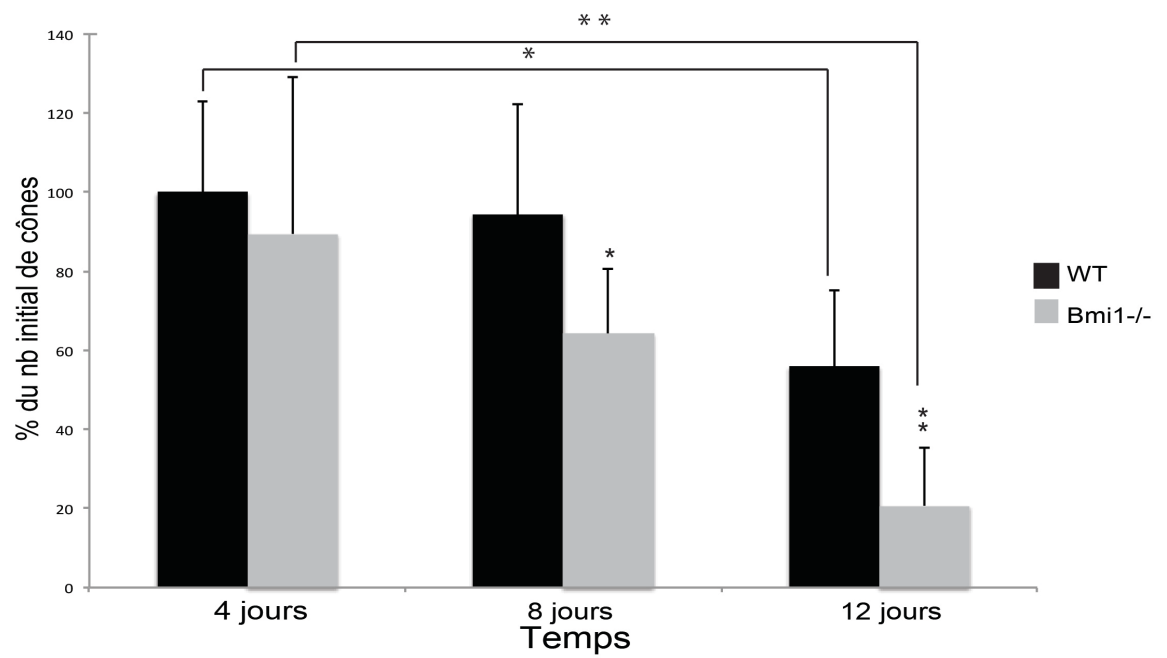
A**B**

Figure 15. Les cônes déficients pour *Bmi1* meurent *in vitro*.

(A) Culture de cellules de rétines à 4 jours. Les lames ont été fixées puis marquées par immunofluorescence avec des anticorps contre *Bmi1* et la S-opsine ainsi qu'avec DAPI pour colorer les noyaux. Les flèches grises indiquent les S-cônes. Le reste du marquage rouge est de l'auto-fluorescence. Les cadres blancs indiquent la région agrandie dans l'image sous-jacente. Notez que les cônes *Bmi1*^{-/-} n'expriment pas *Bmi1* contrairement aux cônes WT (flèches blanches). La dernière colonne est une fusion des 2 photos précédentes et de celle obtenue avec DAPI. (B) Graphique représentant l'évolution de la mort des cônes en culture. Pour chaque échantillon, le nombre de cônes et le nombre de cellules totales ont été quantifiés dans 4 champs différents. Le pourcentage de cônes pour chaque champ a été calculé et la moyenne pour chaque génotype a été déduite. Le pourcentage du nombre de cônes initial des échantillons WT à 4 jours a été normalisé à 100% et les autres valeurs ont été calculées en conséquence. Les résultats sont présentés en pourcentage du nombre initial de cônes + erreur standard. (WT n=4, *Bmi1*^{-/-} n=5, *P<0,05, **P<0,01).

2. Déterminer le mécanisme moléculaire, régulé par *Bmi1*, qui est impliqué dans le développement et la survie des photorécepteurs.

2.1. La co-délétion de *Chk2* engendre une restauration partielle du phénotype.

Afin de déterminer le mécanisme moléculaire impliqué dans la dégénérescence des cônes, nous avons effectué des expériences de génétique inverse. Nous avons ciblé plusieurs composantes de voies de signalisation connues pour être régulées par *Bmi1*: le locus *Ink4a/Arf*, codant pour les protéines p16^{ink4a} et p19^{arf} et directement contrôlé par *Bmi1*, ainsi que le gène *Chk2*, impliqué dans la réponse aux dommages à l'ADN et dont la co-délétion restaure plusieurs phénotypes des souris *Bmi1*^{-/-}. L'analyse de la morphologie des cônes dans les souris *Bmi1*^{-/-}*p16p19*^{-/-}, *Bmi1*^{-/-}*p19*^{-/-} et *Bmi1*^{-/-}*Chk2*^{-/-} n'a révéler aucune amélioration du phénotype observé (Figure 16A). Par contre, les souris *Bmi1*^{-/-}*p16p19*^{-/-} et *Bmi1*^{-/-}*p19*^{-/-} présentent une légère augmentation du nombre de cônes qui est, cependant, non-significative. Cette augmentation est similaire entre les souris *Bmi1*^{-/-}*p16p19*^{-/-} et *Bmi1*^{-/-}*p19*^{-/-}, signifiant que seul le gène *p19*^{arf} est légèrement impliqué dans la mort des cônes. Par ailleurs, une augmentation significative du nombre de cônes a été observée dans les rétines *Bmi1*^{-/-}*Chk2*^{-/-} comparativement aux rétines *Bmi1*^{-/-} (Figure 16B). Ces résultats confirment que la co-délétion de *Chk2* permet de

restaurer partiellement le phénotype de dégénérescence des cônes. Considérant que les souris *Bmi1^{-/-}Chk2^{-/-}* présentent aussi un phénotype de dégénérescence des cônes (Figure 13), il est probable que la co-délétion de *Chk2* permet de retarder la mort des cônes et donc que, pour le même âge, ces souris présentent plus de cônes que les souris *Bmi1^{-/-}*. Ces résultats suggèrent que l'activation de *Chk2* et de la réponse aux dommages à l'ADN joue un rôle important dans le processus observé de dégénérescence des cônes.

2.2. Les rétines *Bmi1^{-/-}* présentent une augmentation des dommages oxydatifs à l'ADN.

L'activation de *Chk2* chez les mutants *Bmi1* peut être causée par l'accumulation de dommages oxydatifs à l'ADN. Ces dommages sont causés par l'augmentation des niveaux de radicaux libres dans les cellules déficientes pour *Bmi1* [63]. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé les niveaux de dommages oxydatifs à l'ADN dans les rétines WT et *Bmi1^{-/-}* par immunohistochimie. Nous avons examiné la présence de 8-oxoguanine, une modification de l'ADN résultant de l'exposition aux radicaux libres. Les résultats montrent clairement une augmentation de la présence de 8-oxoguanine dans l'ensemble des types cellulaires de la rétine *Bmi1^{-/-}* (Figure 17). Ceci confirme qu'il y a augmentation du stress oxydatif dans les rétines *Bmi1^{-/-}*.

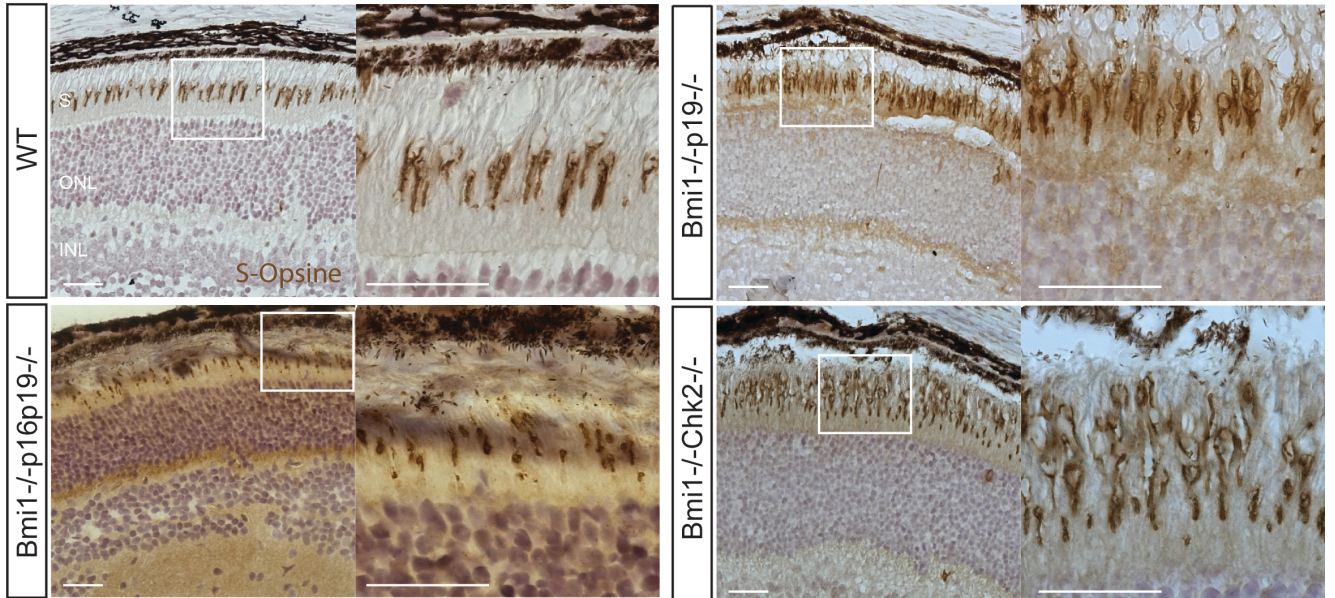
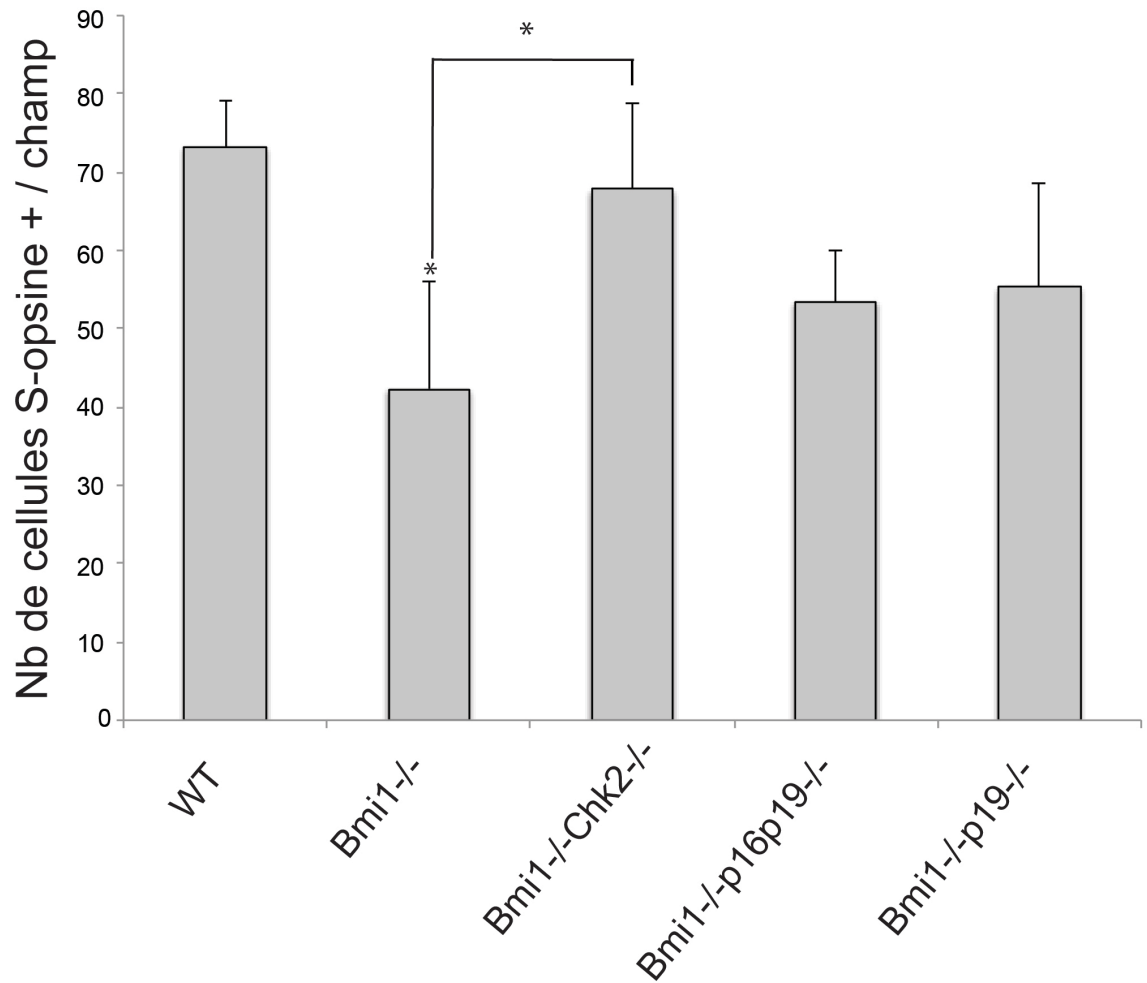
A**B**

Figure 16. La co-délétion de *Chk2* engendre une restauration partielle du phénotype.

(A) Coupes de rétines de souris de 30 jours marquées par immunohistochimie avec un anticorps contre la S-opsine. Les lames ont été contre-colorées à l'hématoxyline. Les cadres blancs indiquent la région agrandie dans l'image de droite. S: segment. ONL: outer nuclear layer. INL: inner nuclear layer. Barre d'échelle: 50 μ m. (B) Quantification du nombre de S-cônes par champs. Pour chaque échantillon, un champ au niveau de la rétine centrale a été quantifié. Les résultats sont présentés en moyenne pour chaque génotype + erreur standard. (WT n=3, *Bmi1*^{-/-} n=3, *Bmi1*^{-/-}*Chk2*^{-/-} n=4, *Bmi1*^{-/-}*p16p19*^{-/-} n=2, *Bmi1*^{-/-}*p19*^{-/-} n=3, *P<0,05).

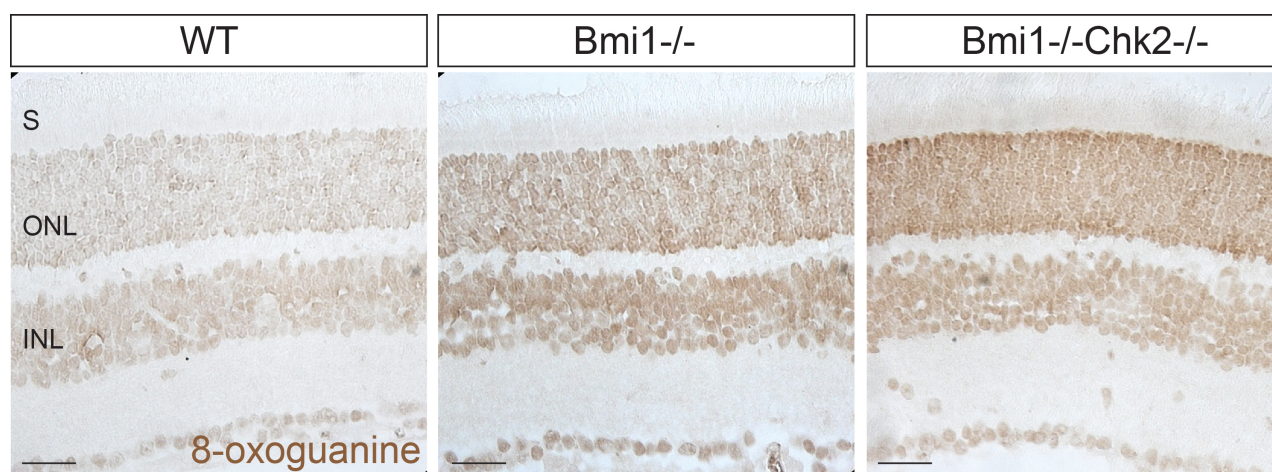


Figure 17. Les rétines des souris *Bmi1*^{-/-} et *Bmi1*^{-/-}*Chk2*^{-/-} présentent une augmentation des dommages oxydatifs à l'ADN.

Coupes de rétines de souris de 30 jours marquées par immunohistochimie avec un anticorps contre 8-oxoguanine. S: segment. ONL: outer nuclear layer. INL: inner nuclear layer. Barre d'échelle: 50 μ m.

2.3. La co-délétion de *Chk2* ne permet pas de restaurer le niveau de dommages oxydatifs à l'ADN.

Selon notre hypothèse, l'augmentation des dommages oxydatifs à l'ADN engendrerait l'activation de la DDR. Dans ce contexte, la co-délétion de *Chk2* ne permettrait pas de restaurer le niveau de dommages oxydatifs à l'ADN présent dans les rétines *Bmi1*^{-/-}. Pour vérifier ce postulat, nous avons également analysé la présence de 8-

oxoguanine à l'ADN dans les rétines *Bmi1^{-/-}Chk2^{-/-}*. Les résultats révèlent effectivement un niveau élevé de cette marque dans l'ensemble de la rétine (Figure 17). Ceci confirme que la co-délétion de *Chk2*, malgré qu'elle engendre un ralentissement de la dégénérescence des cônes, ne permet pas de restaurer les dommages oxydatifs à l'ADN. Il a déjà été démontré que certaines sources de stress oxydatif causent plus de dommages aux photorécepteurs de types cônes qu'aux autres types cellulaires de la rétine. Ces découvertes suggèrent que le système de défenses antioxydantes des cônes diffère de ceux présents chez les bâtonnets ou les autres cellules de la rétine [72]. Les cônes seraient donc plus sensibles à certains dommages oxydatifs, ce qui expliquerait que l'augmentation du stress oxydatif dans la rétine n'affecte que ceux-ci. Nos résultats suggèrent donc la possibilité que les dommages oxydatifs à l'ADN activent la DDR et mènent à la mort des cônes.

2.4. Le profil d'expression des gènes dans les rétines *Bmi1^{-/-}* suggère une activation de *p53*.

Les résultats publiés dans Chatoo et al., 2009, démontrent une fonction pro-oxydante de *p53* dans les neurones corticaux. En effet, *p53* y réprime l'expression de plusieurs gènes antioxydants résultant en l'augmentation de la présence de radicaux libres [60]. Nous avons voulu vérifier si l'activation de *p53* pourrait être la cause de l'augmentation du stress oxydatif dans les rétines de souris *Bmi1^{-/-}*. Pour ce faire, nous avons d'abord analysé l'expression de quelques gènes régulés par *p53* par PCR en temps réel. Les résultats préliminaires montrent une augmentation de l'expression des gènes pro-apoptotiques *Apaf1* et *Fas/CD95*, deux gènes directement activés par *p53* (Figure 18, colonnes vertes). Ces résultats suggèrent donc l'activation de *p53* dans les rétines *Bmi1^{-/-}*.

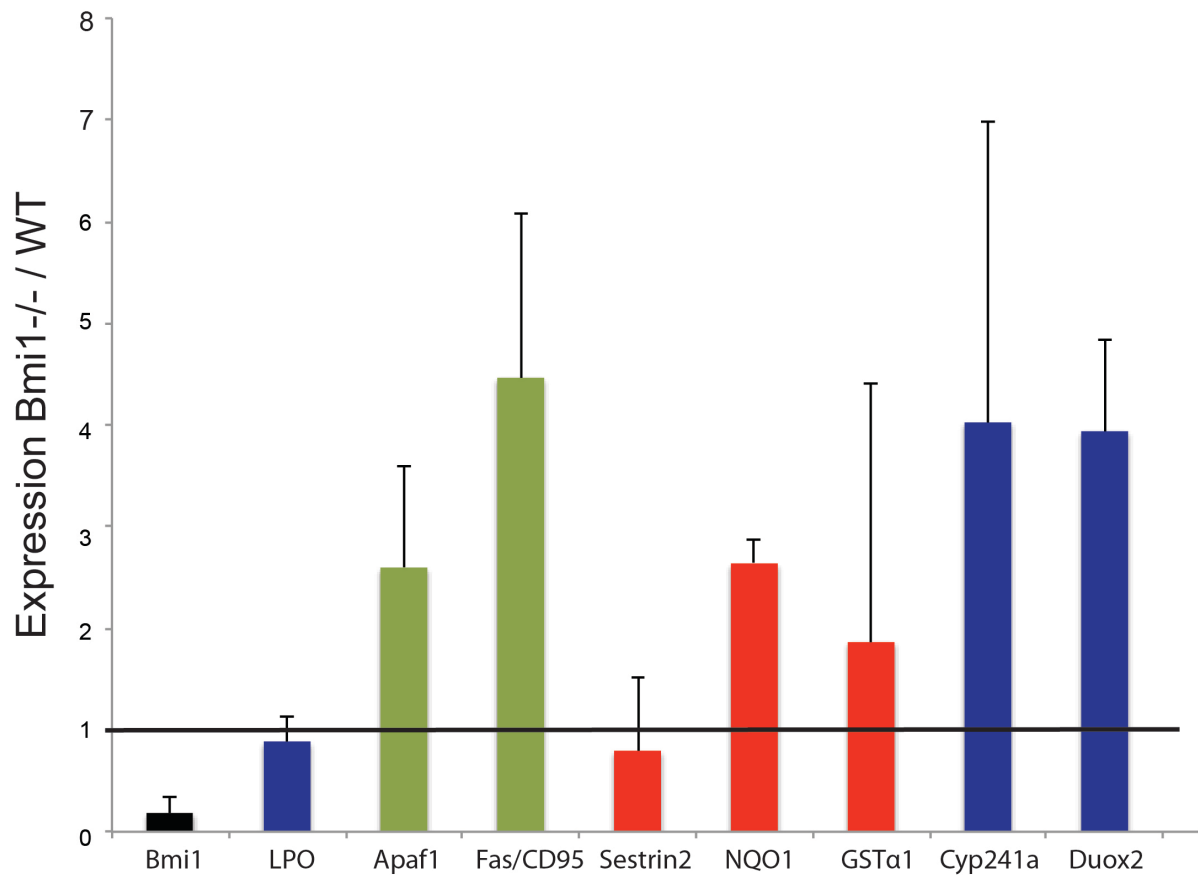


Figure 18. Profil d'expression de gènes pro-, antioxydants et dépendants de p53 dans les rétines *Bmi1*^{-/-}.

Les rétines de souris WT et *Bmi1*^{-/-} ont été analysées par PCR en temps réel pour l'expression de gènes pro-, antioxydants et dépendants de p53. L'expression de *Bmi1* a aussi été analysée comme contrôle. Les niveaux d'expression de la rétine *Bmi1*^{-/-} sont représentés par rapport au niveau d'expression dans la rétine WT. Les résultats sont présentés en moyenne des 2 échantillons + erreur standard. Vert = gènes dépendants de p53. Bleu = gènes pro-oxydants. Rouge = gènes antioxydants. (n=2).

2.5. Le profil d'expression des gènes pro- et antioxydants dans les rétines *Bmi1*^{-/-} révèle une tendance pro-oxydante.

Nous avons ensuite analysé l'expression de plusieurs gènes pro- et antioxydants. Les résultats préliminaires montrent une augmentation de l'expression des gènes pro-

oxydants *Cyp241a* et *Duox2* chez les souris *Bmi1^{-/-}* (Figure 18, colonnes bleues). Nous observons aussi une légère augmentation de l'expression des gènes antioxydants *NQO1* et *GST-1α* (Figure 18, colonnes rouges). Par contre, l'expression des gènes pro-oxydant *LPO* et antioxydant *Sestrin-2* (SESN2) ne semble pas varier chez les souris *Bmi1^{-/-}* (Figure 18). Ces résultats étant préliminaires, il est difficile de confirmer qu'une expression anormale des gènes pro- et antioxydants est à l'origine de l'augmentation du stress oxydatif dans les rétines. Par contre, l'augmentation importante de l'expression des gènes pro-oxydants observée sur ces 2 échantillons suggère une tendance pro-oxydante chez les souris *Bmi1^{-/-}*. Nos analyses de PCR en temps réel suggèrent donc que l'activation de p53 dans les rétines *Bmi1^{-/-}* pourrait résulter en une dérégulation de plusieurs gènes pro- et antioxydants. Cette dérégulation causerait l'augmentation du stress oxydatif dans les rétines et, ultimement, causerait la dégénérescence des cônes.

2.6. La rétine *Bmi1^{-/-}p53^{-/-}* permet une restauration du niveau d'anion superoxyde.

Les résultats obtenus jusqu'à présent confirment une augmentation de la présence de dommages oxydatifs à l'ADN. Ces dommages sont normalement causés par les radicaux libres. Pour confirmer la présence de radicaux libres, nous avons utilisé l'agent MitoSoxRed qui réagit avec l'anion superoxyde O_2^- et génère de la fluorescence. L'anion superoxyde est un type de radicaux libres produit par la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie [53]. Nous avons effectué cette expérience sur des souris WT, *Bmi1^{-/-}p53^{+/-}* et *Bmi1^{-/-}p53^{-/-}* issue de la même portée. Aucune souris *Bmi1^{-/-}p53^{+/+}* n'ayant été obtenu dans cette portée, nous avons utilisé la souris *Bmi1^{-/-}p53^{+/-}* comme contrôle positif. La perte d'un seul allèle de *p53* n'étant pas une mutation dominante, le phénotype observé chez les souris *Bmi1^{-/-}* ne devrait pas être complètement corrigé par cette mutation. Tel que montré dans le Figure 19, la souris *Bmi1^{-/-}p53^{+/-}* montre une importante augmentation du niveau d'anion superoxyde comparativement à la souris WT issue de la même portée. Ce résultat confirme l'augmentation de la concentration de radicaux libres dans les souris *Bmi1^{-/-}*. Par ailleurs, afin de vérifier si le gène *p53* est responsable de cette augmentation des radicaux libres dans les rétines déficientes pour *Bmi1*, nous avons analysé la présence de l'anion superoxyde dans la rétine d'une souris

Bmi1^{-/-} *p53*^{-/-}. Le résultat révèle que la co-délétion de *p53* permet de restaurer les niveaux d'anion superoxyde (Figure 19). L'activation de p53 dans les rétines déficientes pour Bmi1 est donc la cause principale de l'augmentation des radicaux libres.

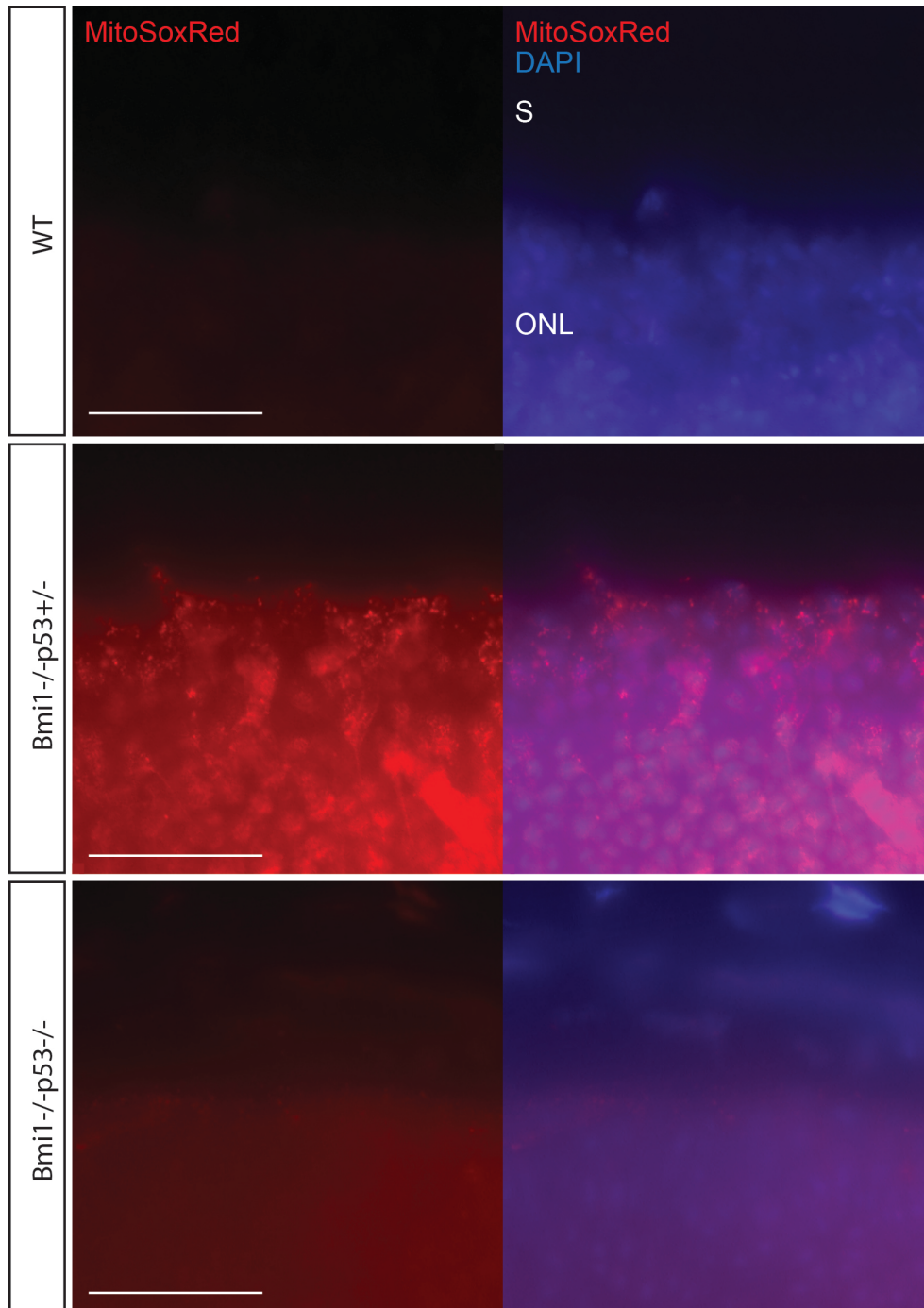


Figure 19. La rétine *Bmi1*^{-/-}*p53*^{-/-} permet une restauration du niveau d'anion superoxyde.

Coupes de rétines de souris de 30 jours marquées avec l'agent MitoSoxRed qui émet de la fluorescence en contact avec l'anion superoxyde, un type de radicaux libres. S : segment. ONL: outer nuclear layer. Barre d'échelle: 50 μ m.

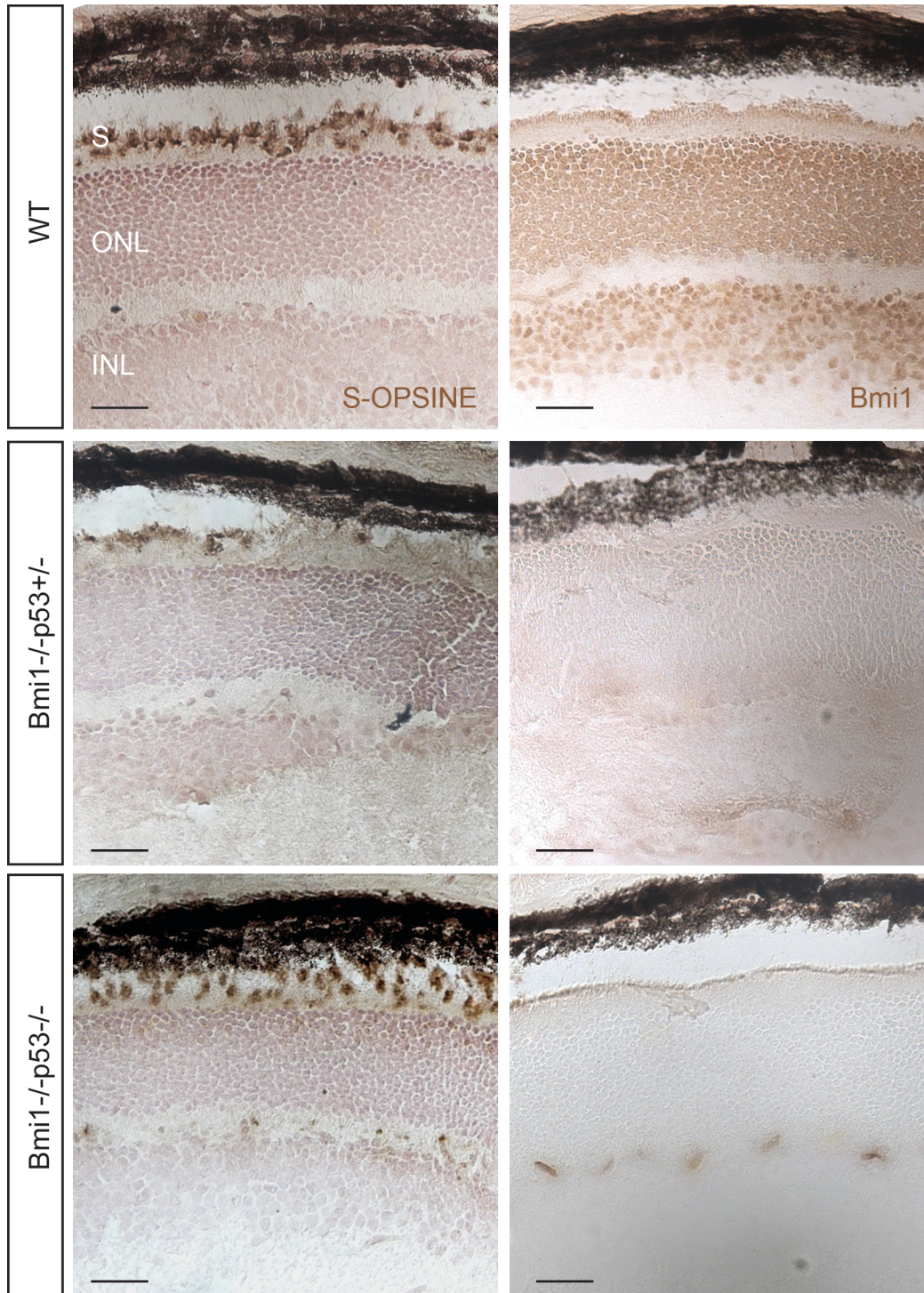


Figure 20. La co-délétion de *p53* permet la restauration du phénotype des cônes.

Coupes de rétines de souris de 30 jours marquées par immunohistochimie avec des anticorps contre Bmi1 et la S-Opsine. S: Segment. ONL: outer nuclear layer. INL: inner nuclear layer. Barre d'échelle: 50 μ m.

2.7. La co-délétion de *p53* permet la restauration du phénotype des cônes.

Selon les résultats présentés jusqu'à présent, nous émettons l'hypothèse que le phénotype anormal des cônes serait causé par l'augmentation du stress oxydatif résultant des effets de l'activation de *p53* chez les souris *Bmi1*^{-/-}. Nous avons donc voulu vérifier le phénotype des cônes dans la rétine de souris *Bmi1*^{-/-}*p53*^{-/-}. D'abord, un marquage avec un anticorps contre *Bmi1* a permis de confirmer les génotypes des souris (Figure 20). Puis, un marquage pour la S-Opsine a révélé que la co-délétion de *p53* permettait d'améliorer considérablement la survie des cônes (Figure 20). Étant donné qu'une seule souris *Bmi1*^{-/-}*p53*^{-/-} a été obtenue dans le laboratoire en plusieurs années, et que cet échantillon a été cryopréservé, la qualité de la coupe du tissu due à ces difficultés techniques ne permet pas d'observer précisément la morphologie des cônes. Par contre, les patrons d'expression de la S-Opsine des rétine de souris WT et *Bmi1*^{-/-}*p53*^{-/-} issues de la même portée sont très similaires ce qui suggère donc fortement que la co-délétion de *p53* permet de restaurer le phénotype des cônes (Figure 20).

DISCUSSION

1. *Bmi1* est essentiel à la survie des cônes.

Nous avons étudié le phénotype des photorécepteurs chez les souris *Bmi1*^{-/-} afin de vérifier le rôle de ce gène Polycomb dans le développement et la survie de ces cellules. Ces souris présentent une dégénérescence progressive des photorécepteurs de types cônes uniquement, et nos résultats suggèrent que ce phénotype est cellule-autonome. De plus, le gène *Bmi1* semble être exprimé de façon prédominante dans ces cellules. Ceci confirme que *Bmi1* est essentiel à la survie des cônes et suggère qu'il joue un rôle différent ou plus important dans ce type de photorécepteurs que dans les autres types de cellules de la rétine.

2. *Bmi1*, le stress oxydatif et la dégénérescence des cônes.

Nous avons ensuite tenté de comprendre le mécanisme moléculaire que régule *Bmi1* dans les cônes. Nos expériences de génétique inverse révèlent que la co-délétion du gène *Chk2*, faisant partie de la DDR et agissant comme point de contrôle du cycle cellulaire, permet de ralentir la dégénérescence des cônes et que les cellules de la rétine *Bmi1*^{-/-} présentent des dommages oxydatifs à l'ADN important (Figures 16-17). Ces résultats concordent avec la littérature actuelle. En effet, il est déjà connu que *Bmi1* est un régulateur des défenses antioxydantes dans le cerveau et que son absence cause un vieillissement prématuré et la neurodégénérescence [60, 61, 65]. De plus, l'activation de la DDR dans certains types de cellules *Bmi1*^{-/-} se fait via un mécanisme sensible au stress oxydatif et la co-délétion de *Chk2* est reconnue comme permettant la restauration de nombreux phénotypes dont ceux associés à ce stress chez les souris *Bmi1*^{-/-} [63]. La dégénérescence des cônes pourrait donc être causée par une augmentation du stress oxydatif et l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN.

Par ailleurs, tel que mentionné précédemment, la co-délétion de *Chk2* permet une restauration partielle du phénotype observé (Figure 16). *Chk2* est un gène agissant

comme point de contrôle du cycle cellulaire [73]. Or, les photorécepteurs sont des neurones post-mitotiques et ne sont donc plus dans le cycle cellulaire. Ces résultats s'expliquent par le fait que l'accumulation de dommages à l'ADN peut stimuler l'entrée de neurones post-mitotiques dans le cycle cellulaire. L'activité du cycle cellulaire couplé à l'activation de la DDR peut potentiellement activer les points de contrôle, comme *Chk2*, et mener à la mort neuronale. Une activité aberrante du cycle cellulaire ainsi que des dommages à l'ADN sont fréquemment observés dans certaines maladies neurodégénératives, comme l'Alzheimer [74]. Dans le contexte de la dégénérescence des cônes, l'accumulation de dommages oxydatifs à l'ADN peut donc entraîner l'activation de la DDR, l'entrée dans le cycle cellulaire, l'activation de *Chk2* et l'apoptose. La co-délétion de *Chk2* empêche l'entrée en apoptose contrôlée par la DDR et retarde ainsi la dégénérescence. Par contre, la co-délétion de *Chk2* ne permet pas de rétablir le stress oxydatif, tel que montré dans la Figure 17. Une forte concentration de radicaux libres peut aussi causer la peroxydation des lipides et l'oxydation des acides aminés [53]. L'accumulation de ces dommages aux lipides et protéines peut induire l'activation des caspases et l'entrée en apoptose de la cellule via différents autres mécanismes, comme l'apoptose induite par la perméabilisation de la membrane lysosomale [75, 76]. Les cônes *Bmi1^{-/-}Chk2^{-/-}* vont donc éventuellement mourir de ces dommages. Ceci explique pourquoi la co-délétion de *Chk2* permet uniquement un ralentissement de la dégénérescence et une restauration partielle du phénotype.

Par ailleurs, les dommages oxydatifs à l'ADN sont présents dans tous les types cellulaires de la rétine (Figure 17). Par contre, seule la mort des photorécepteurs de type cônes est observée dans les rétines *Bmi1^{-/-}* (Figure 9-10). Plusieurs études démontrent que les cônes sont plus sensibles au stress oxydatif et que leur mort, dans le contexte de maladie comme la rétinite pigmentaire, pourrait être prévenue par un traitement antioxydant [72, 77, 78]. Une plus grande sensibilité des cônes au stress oxydatif expliquerait pourquoi seul ce type cellulaire est affecté par l'accumulation de ROS dans la rétine. Ceci expliquerait aussi l'accélération du phénotype de dégénérescence des cônes *Bmi1^{-/-}* et la mort des cônes WT lorsque ces cellules sont cultivées *in vitro* (Figure 15). En effet, il a été démontré que la mise en culture peut engendrer une augmentation

du stress oxydatif [71]. De plus, l'expression prédominante de *Bmi1* dans ce type cellulaire pourrait s'expliquer par sa fonction antioxydante et protectrice des neurones [61]. Les cônes, plus sensibles au stress oxydatif, nécessiteraient une plus grande protection contre les radicaux libres. Par contre, nos résultats actuels ne permettent pas de confirmer que l'augmentation du stress oxydatif est responsable de la mort des cônes. D'autres expériences seront nécessaires pour démontrer ce lien.

3. *Bmi1*, la voie moléculaire *p19^{Arf}/p53* et le stress oxydatif

Dans les neurones corticaux *Bmi1*^{-/-}, l'activation de *p53* via *p19^{Arf}* engendre la répression de nombreux gènes antioxydants et résulte en une augmentation du stress oxydatif [60]. Les résultats préliminaires de PCR en temps réel suggèrent une activation de *p53*. Par contre, les gènes antioxydants ne semblent pas être réprimés. Ce sont plutôt les gènes pro-oxydants analysés qui semblent être surexprimés (Figure 18). Par ailleurs, une légère amélioration du nombre de cônes est notée dans les souris *Bmi1*^{-/-}*p19*^{-/-} et *Bmi1*^{-/-}*p16p19*^{-/-} (Figure 16), suggérant une implication partielle de *p19^{Arf}* dans le déclin des cônes. De plus, nous avons montré que l'augmentation accrue de la présence de l'anion superoxyde dans la rétine *Bmi1*^{-/-}*p53*^{+/-} est restaurée par la co-délétion de *p53*. Finalement, nos résultats préliminaires suggèrent aussi fortement que cette même co-délétion permet de restaurer le phénotype des cônes. Ces résultats suggèrent donc un mécanisme moléculaire impliquant, entre autre, *p19^{Arf}*, résultant en l'activation de *p53*, l'augmentation du stress oxydatif et la mort des cônes. Il est possible que l'activation de *p53*, de façon partiellement dépendante de *p19^{Arf}*, permette l'activation de l'expression de gènes pro-oxydants dans les neurones rétiniens. Par ailleurs, il est important de mentionner que ces derniers résultats sont encore préliminaires et qu'un plus grand échantillonnage permettrait de confirmer le mécanisme moléculaire en question.

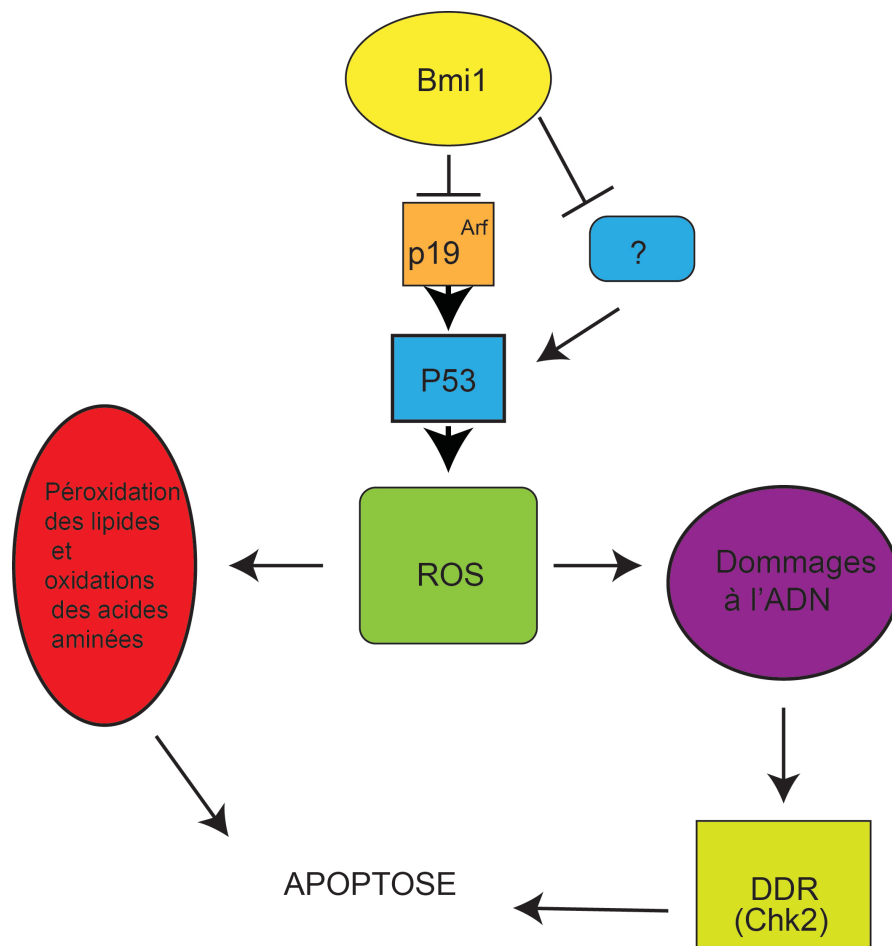


Figure 21. Modèle de la fonction de *Bmi1* dans les cellules de la rétine.

Bmi1 inhibe *p53* par l'intermédiaire de *p19^{arf}* et d'un autre mécanisme inconnu. *p53* a une action pro-oxydante dans la rétine. Les radicaux libres (ROS) engendrent des dommages à l'ADN, la peroxydation des lipides et l'oxydation des acides aminés. Il y a activation de la réponse aux dommages à l'ADN (DDR) et accumulation de dommages oxydatifs aux lipides et protéines, ce qui résulte en l'activation du processus d'apoptose.

4. Modèle de mécanisme moléculaire régulé par *Bmi1* dans la rétine.

Cette étude nous permet de suggérer un modèle de mécanisme moléculaire régulé par *Bmi1* dans la rétine (Figure 21). Selon ce mécanisme, *Bmi1* agirait comme antioxydant et protecteur des cellules de la rétine en régulant indirectement, par l'intermédiaire de *p19arf* et d'un mécanisme inconnu, la fonction pro-oxydante de *p53*.

En absence de Bmi1, l'accumulation de radicaux libres engendre des dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides. Il y aura activation de la réponse aux dommages à l'ADN dans les photorécepteurs de types cônes uniquement puisque ces cellules sont plus sensibles au stress oxydatif. La DDR va ensuite stimuler l'apoptose des cônes. D'autre part, les dommages oxydatifs aux lipides et aux protéines enclencheront aussi le processus d'apoptose des cônes. Par ailleurs, de plus amples investigations seront nécessaires afin de confirmer ce modèle, puisque les résultats montrant que la co-délétion de *p53* permet une restauration de la dégénérescence des cônes ne sont que préliminaires et qu'aucune des expériences effectuées ne permet de conclure que l'augmentation des radicaux libres est la cause de la mort des cônes.

Cette étude devrait nous permettre de mieux comprendre la fonction des gènes Polycomb dans la rétino-genèse et la survie des photorécepteurs chez la souris. De plus, dans le contexte de la santé humaine, il existe plusieurs maladies dégénératives des cônes, comme la dégénérescence maculaire. Les causes de ces maladies sont encore peu connues. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires permettant la survie des cônes permettra éventuellement l'identification de facteurs contribuant à leur maintien, comme la régulation des radicaux libres. Cette étude pourrait ainsi avoir un impact sur le développement de nouvelles innovations dans le traitement des maladies dégénératives liées aux cônes.

PERSPECTIVES

Les résultats de l'étude sur le rôle du gène Polycomb *Bmi1* dans le développement et la survie des photorécepteurs permettent de confirmer que *Bmi1* est essentiel à la survie des cônes. Nos résultats montrent, de plus, que *Bmi1* joue un rôle dans la régulation du métabolisme des radicaux libres dans les cellules de la rétine. Par contre, d'autres investigations seront nécessaires afin de confirmer que cette fonction est primordiale dans les cônes et que l'accumulation de radicaux libres est la cause de la dégénérescence de ces cellules en absence de *Bmi1*.

Tout d'abord, afin de confirmer l'augmentation de la concentration de tous les types de radicaux libres dans les cellules de la rétine, il serait intéressant de mesurer les niveaux de ROS dans un extrait de rétine *Bmi1*^{-/-} à l'aide dichlorodihydrofluoresceine diacétate (DCF-DA). De plus, selon plusieurs études, le traitement avec un antioxydant, comme le N-acétylcystéine, permet de prévenir la mort des cônes dans le contexte de la rétinite pigmentaire [77, 78]. Il serait intéressant de traiter les cultures primaires de cellules de rétine avec le N-acétylcystéine afin de vérifier si le traitement permet d'empêcher le dégénérescence des cônes *Bmi1*^{-/-}. L'injection de ce même produit in vivo au niveau du vitré de la souris pendant un certain temps et l'analyse de ces rétines par immunohistochimie permettrait aussi de vérifier le rôle des radicaux libres dans la mort des cônes. Ces expériences permettraient de confirmer l'implication du stress oxydatif dans la dégénérescence des photorécepteurs de types cônes.

Par ailleurs, la co-délétion de *Chk2* permet de ralentir le processus de dégénérescence. Pour confirmer l'activation de la DDR dans les cônes, nous avons tenté de marquer les rétines *Bmi1*^{-/-} avec un anticorps contre plusieurs membres activés de la réponse aux dommages à l'ADN comme *Chk2*-p, *ATM*-p et *ATR*-p. Le niveau d'activation de la DDR et la très faible proportion de cônes dans la rétine semblent être des obstacles à la détection. Afin de valider l'activation de la DDR dans les cônes, nous suggérons de d'abord trier les cellules de la rétine par cytométrie en flux (FACS) à l'aide du marqueur de cônes *peanut agglutinin* (PNA). Ensuite, une expérience

d'immunobuvardage de types Western contre les différents membres activés de la DDR sur un lysat de cônes uniquement permettrait d'augmenter les chances de détection. Finalement, l'utilisation d'un inhibiteur de Chk2-p dans les cultures primaires de cellules de rétines pourrait permettre de confirmer le ralentissement de la dégénérescence des cônes.

Finalement, dans le but de confirmer les résultats préliminaires obtenus sur la rétine *Bmi1^{-/-}p53^{-/-}*, il serait important d'augmenter le nombre d'échantillons analysés. Par contre, les maintes tentatives dans notre laboratoire ont révélé la létalité synthétique de cette co-délétion et un seul échantillon a été obtenu en plusieurs années. Ainsi, il serait nécessaire d'effectuer des cultures de cellules rétinienne à partir de rétine embryonnaire *Bmi1^{-/-}p53^{-/-}*, tel que présenté dans Chatoo et al., 2009. À partir de ces cultures, nous pourrions mesurer les niveaux de radicaux libres, vérifier les dommages oxydatifs à l'ADN et observer l'évolution de la dégénérescence des cônes. En comparant les résultats obtenus des cellules *Bmi1^{-/-}p53^{-/-}* aux cellules *Bmi1^{-/-}*, nous pourrions confirmer l'implication de *p53* dans le phénotype de dégénérescence des cônes et la régulation du stress oxydatif dans la rétine.

CONCLUSION

Le gène Polycomb *Bmi1* est essentiel à l'auto-renouvellement de la plupart des progéniteurs rétiniens immatures et au développement post-natal de la rétine [64]. De plus, *Bmi1* joue un rôle important dans la régulation des défenses antioxydantes des neurones corticaux et son absence cause un vieillissement prématuré du cerveau et l'apparition de signes de neurodégénérescence [60, 61, 65]. Nos résultats montrent que *Bmi1* est essentiel à la survie des photorécepteurs de types cônes et que son absence résulte en une dégénérescence progressive de ce type cellulaire. Les autres types cellulaires de la rétine ne sont pas affectés par la mutation. Nos résultats révèlent aussi que *Bmi1* jouerait un rôle dans la régulation des défenses antioxydantes dans les cellules de la rétine et que cette fonction implique la répression du gène suppresseur de tumeur *p53*. Nos résultats suggèrent aussi fortement que le phénotype de dégénérescence des cônes serait causé par l'activation de *p53*. D'autres expériences seront nécessaires afin de confirmer le rôle du stress oxydatif dans le mort des cônes. Cette étude devrait nous permettre de mieux comprendre la fonction des gènes *Polycomb* dans la rétino-genèse et la survie des photorécepteurs chez la souris et pourrait contribuer à l'innovation de nouveaux traitements des maladies dégénératives des cônes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Oliver, G. and P. Gruss, *Current views on eye development*. Trends Neurosci, 1997. **20**(9): p. 415-21.
2. Marquardt, T., *Transcriptional control of neuronal diversification in the retina*. Prog Retin Eye Res, 2003. **22**(5): p. 567-77.
3. Chen, S., et al., *Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes*. Neuron, 1997. **19**(5): p. 1017-30.
4. Chow, R.L., et al., *Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate*. Development, 1999. **126**(19): p. 4213-22.
5. Zhang, X., J.M. Serb, and M.H. Greenlee, *Mouse retinal development: a dark horse model for systems biology research*. Bioinform Biol Insights, 2011. **5**: p. 99-113.
6. Collin, S.P., *A web-based archive for topographic maps of retinal cell distribution in vertebrates*. Clin Exp Optom, 2008. **91**(1): p. 85-95.
7. Masland, R.H., *The neuronal organization of the retina*. Neuron, 2012. **76**(2): p. 266-80.
8. Swaroop, A., D. Kim, and D. Forrest, *Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina*. Nat Rev Neurosci, 2010. **11**(8): p. 563-76.
9. Jacobs, G.H., *The evolution of vertebrate color vision*. Adv Exp Med Biol, 2012. **739**: p. 156-72.
10. Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A-S., McNamara, J.O., and Williams, S.M., *Neuroscience, 2nd Edition*. 2001: Sunderland, Mass. : Sinauer Associates ; Basingstoke : Palgrave distributor. 759.
11. Jeon, C.J., E. Strettoi, and R.H. Masland, *The major cell populations of the mouse retina*. J Neurosci, 1998. **18**(21): p. 8936-46.
12. Luo, H., et al., *Forkhead box N4 (Foxn4) activates Dll4-Notch signaling to suppress photoreceptor cell fates of early retinal progenitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(9): p. E553-62.
13. Jadhav, A.P., H.A. Mason, and C.L. Cepko, *Notch 1 inhibits photoreceptor production in the developing mammalian retina*. Development, 2006. **133**(5): p. 913-23.
14. Koike, C., et al., *Functional roles of Otx2 transcription factor in postnatal mouse retinal development*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(23): p. 8318-29.
15. Ohsawa, R. and R. Kageyama, *Regulation of retinal cell fate specification by multiple transcription factors*. Brain Res, 2008. **1192**: p. 90-8.
16. Lewis, E.B., *A gene complex controlling segmentation in Drosophila*. Nature, 1978. **276**(5688): p. 565-70.
17. Lanzuolo, C. and V. Orlando, *Memories from the polycomb group proteins*. Annu Rev Genet, 2012. **46**: p. 561-89.

18. Margueron, R. and D. Reinberg, *The Polycomb complex PRC2 and its mark in life*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 343-9.
19. Eskeland, R., et al., *Ring1B compacts chromatin structure and represses gene expression independent of histone ubiquitination*. Mol Cell, 2010. **38**(3): p. 452-64.
20. Klymenko, T., et al., *A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities*. Genes Dev, 2006. **20**(9): p. 1110-22.
21. Lagarou, A., et al., *dKDM2 couples histone H2A ubiquitylation to histone H3 demethylation during Polycomb group silencing*. Genes Dev, 2008. **22**(20): p. 2799-810.
22. Scheuermann, J.C., et al., *Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB*. Nature, 2010. **465**(7295): p. 243-7.
23. Simon, J., et al., *Elements of the Drosophila bithorax complex that mediate repression by Polycomb group products*. Dev Biol, 1993. **158**(1): p. 131-44.
24. Hodgson, J.W., B. Argiropoulos, and H.W. Brock, *Site-specific recognition of a 70-base-pair element containing d(GA)(n) repeats mediates bithoraxoid polycomb group response element-dependent silencing*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(14): p. 4528-43.
25. Horard, B., et al., *Structure of a polycomb response element and in vitro binding of polycomb group complexes containing GAGA factor*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(9): p. 3187-97.
26. Brown, J.L., et al., *An Sp1/KLF binding site is important for the activity of a Polycomb group response element from the Drosophila engrailed gene*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(16): p. 5181-9.
27. Schwartz, Y.B. and V. Pirrotta, *Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(1): p. 9-22.
28. Papp, B. and J. Muller, *Histone trimethylation and the maintenance of transcriptional ON and OFF states by trxG and PcG proteins*. Genes Dev, 2006. **20**(15): p. 2041-54.
29. Francis, N.J., R.E. Kingston, and C.L. Woodcock, *Chromatin compaction by a polycomb group protein complex*. Science, 2004. **306**(5701): p. 1574-7.
30. Grau, D.J., et al., *Compaction of chromatin by diverse Polycomb group proteins requires localized regions of high charge*. Genes Dev, 2011. **25**(20): p. 2210-21.
31. van Lohuizen, M., et al., *Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging*. Cell, 1991. **65**(5): p. 737-52.
32. Brunk, B.P., E.C. Martin, and P.N. Adler, *Drosophila genes Posterior Sex Combs and Suppressor two of zeste encode proteins with homology to the murine bmi-1 oncogene*. Nature, 1991. **353**(6342): p. 351-3.
33. Haupt, Y., et al., *Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice*. Cell, 1991. **65**(5): p. 753-63.
34. Cao, R., Y. Tsukada, and Y. Zhang, *Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing*. Mol Cell, 2005. **20**(6): p. 845-54.

35. Voncken, J.W., et al., *MAPKAP kinase 3pK phosphorylates and regulates chromatin association of the polycomb group protein Bmi1*. J Biol Chem, 2005. **280**(7): p. 5178-87.
36. Voncken, J.W., et al., *Chromatin-association of the Polycomb group protein BMI1 is cell cycle-regulated and correlates with its phosphorylation status*. J Cell Sci, 1999. **112 (Pt 24)**: p. 4627-39.
37. Nacerddine, K., et al., *Akt-mediated phosphorylation of Bmi1 modulates its oncogenic potential, E3 ligase activity, and DNA damage repair activity in mouse prostate cancer*. J Clin Invest, 2012. **122**(5): p. 1920-32.
38. van der Lugt, N.M., et al., *Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene*. Genes Dev, 1994. **8**(7): p. 757-69.
39. Jacobs, J.J., et al., *The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus*. Nature, 1999. **397**(6715): p. 164-8.
40. Park, I.K., S.J. Morrison, and M.F. Clarke, *Bmi1, stem cells, and senescence regulation*. J Clin Invest, 2004. **113**(2): p. 175-9.
41. Zhang, F.B., L.H. Sui, and T. Xin, *Correlation of Bmi-1 expression and telomerase activity in human ovarian cancer*. Br J Biomed Sci, 2008. **65**(4): p. 172-7.
42. Molofsky, A.V., et al., *Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation*. Nature, 2003. **425**(6961): p. 962-7.
43. Lessard, J., S. Baban, and G. Sauvageau, *Stage-specific expression of polycomb group genes in human bone marrow cells*. Blood, 1998. **91**(4): p. 1216-24.
44. McGowan, C.H. and P. Russell, *The DNA damage response: sensing and signaling*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(6): p. 629-33.
45. Matsuoka, S., M. Huang, and S.J. Elledge, *Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase*. Science, 1998. **282**(5395): p. 1893-7.
46. Dar, M.E., T.A. Winters, and T.J. Jorgensen, *Identification of defective illegitimate recombinational repair of oxidatively-induced DNA double-strand breaks in ataxia-telangiectasia cells*. Mutat Res, 1997. **384**(3): p. 169-79.
47. Zhao, H. and H. Piwnicka-Worms, *ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(13): p. 4129-39.
48. Ward, I.M., K. Minn, and J. Chen, *UV-induced ataxia-telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR) activation requires replication stress*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 9677-80.
49. Shieh, S.Y., et al., *The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites*. Genes Dev, 2000. **14**(3): p. 289-300.
50. Facchino, S., et al., *BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery*. J Neurosci, 2010. **30**(30): p. 10096-111.

51. Ginjala, V., et al., *BMI1 is recruited to DNA breaks and contributes to DNA damage-induced H2A ubiquitination and repair*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(10): p. 1972-82.
52. Ismail, I.H., et al., *BMI1-mediated histone ubiquitylation promotes DNA double-strand break repair*. J Cell Biol, 2010. **191**(1): p. 45-60.
53. Valko, M., et al., *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chem Biol Interact, 2006. **160**(1): p. 1-40.
54. Drigotas, M., et al., *Reactive oxygen species activation of MAPK pathway results in VEGF upregulation as an undesired irradiation response*. J Oral Pathol Med, 2013.
55. Law, S.K., et al., *Regulation of multiple transcription factors by reactive oxygen species and effects of pro-inflammatory cytokines released during myocardial infarction on cardiac differentiation of embryonic stem cells*. Int J Cardiol, 2013.
56. Floyd, R.A., et al., *Hydroxyl free radical mediated formation of 8-hydroxyguanine in isolated DNA*. Arch Biochem Biophys, 1988. **262**(1): p. 266-72.
57. Flynn, T.P., et al., *Oxidant damage of the lipids and proteins of the erythrocyte membranes in unstable hemoglobin disease. Evidence for the role of lipid peroxidation*. J Clin Invest, 1983. **71**(5): p. 1215-23.
58. Halliwell, B., *Antioxidants in human health and disease*. Annu Rev Nutr, 1996. **16**: p. 33-50.
59. Harman, D., *Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1067**: p. 10-21.
60. Chatoos, W., et al., *The polycomb group gene Bmi1 regulates antioxidant defenses in neurons by repressing p53 pro-oxidant activity*. J Neurosci, 2009. **29**(2): p. 529-42.
61. Abdouh, M., et al., *Bmi1 is down-regulated in the aging brain and displays antioxidant and protective activities in neurons*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31870.
62. Nakamura, S., et al., *Bmi1 confers resistance to oxidative stress on hematopoietic stem cells*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e36209.
63. Liu, J., et al., *Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway*. Nature, 2009. **459**(7245): p. 387-92.
64. Chatoos, W., et al., *Bmi1 distinguishes immature retinal progenitor/stem cells from the main progenitor cell population and is required for normal retinal development*. Stem Cells, 2010. **28**(8): p. 1412-23.
65. Cao, G., et al., *Bmi-1 absence causes premature brain degeneration*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e32015.
66. Lavoie, J., et al., *The Electroretinogram as a Biomarker of Central Dopamine and Serotonin: Potential Relevance to Psychiatric Disorders*. Biol Psychiatry, 2013.
67. Berrow, E.J., et al., *The electroretinogram: a useful tool for evaluating age-related macular disease? Doc Ophthalmol, 2010. **121**(1): p. 51-62.*

68. Daniele, L.L., et al., *Cone-like morphological, molecular, and electrophysiological features of the photoreceptors of the Nrl knockout mouse*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. **46**(6): p. 2156-67.
69. Leveillard, T., et al., *Identification and characterization of rod-derived cone viability factor*. Nat Genet, 2004. **36**(7): p. 755-9.
70. Strauss, O., *The retinal pigment epithelium in visual function*. Physiol Rev, 2005. **85**(3): p. 845-81.
71. Halliwell, B., *Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem?* FEBS Lett, 2003. **540**(1-3): p. 3-6.
72. Rogers, B.S., et al., *Differential sensitivity of cones to iron-mediated oxidative damage*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(1): p. 438-45.
73. Harper, J.W. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: ten years after*. Mol Cell, 2007. **28**(5): p. 739-45.
74. Kim, D. and L.H. Tsai, *Linking cell cycle reentry and DNA damage in neurodegeneration*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1170**: p. 674-9.
75. Choudhary, S., et al., *Cellular lipid peroxidation end-products induce apoptosis in human lens epithelial cells*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(4): p. 360-9.
76. Dunlop, R.A., U.T. Brunk, and K.J. Rodgers, *Proteins containing oxidized amino acids induce apoptosis in human monocytes*. Biochem J, 2011. **435**(1): p. 207-16.
77. Komeima, K., et al., *Antioxidants reduce cone cell death in a model of retinitis pigmentosa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(30): p. 11300-5.
78. Shen, J., et al., *Oxidative damage is a potential cause of cone cell death in retinitis pigmentosa*. J Cell Physiol, 2005. **203**(3): p. 457-64.

