Université de Montréal

Caractérisation de la rétinopathie induite par la lumière chez le rat nouveau-né

Par

SANDRINE JOLY

Département de Sciences Biologiques

Faculté des Arts et des Sciences- Secteur des Sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade Philosophiæ Doctor (Ph.D.)

en Sciences Biologiques

Avril 2006

© Sandrine Joly, 2006

QH
302
.C54
2006
v.C02

Université de Montréal

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté des Études Supérieures

Cette thèse de doctorat intitulée :

"Caractérisation de la rétinopathie induite par la lumière chez le rat nouveau-né"

présentée par :

SANDRINE JOLY

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Stéphane Molotchnikoff, Ph.D.
Président-rapporteur

Pierre Lachapelle, Ph.D.
Directeur de recherche

Nicole Leclerc, Ph.D.
Membre du jury

Barry Winkler, Ph.D.
Examinateur externe

Jocelyn Faubert, Ph.D.
Représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

La photodégénérescence de la rétine de rat albinos adulte est un modèle expérimental employé depuis longtemps pour étudier les mécanismes de mort des photorécepteurs. L'exposition de rats adultes à une intensité de plus 1 000 lux conduit à la mort apoptotique des photorécepteurs, tout en épargnant les autres couches de cellules rétiniennes (bipolaires, ganglionnaires, etc). Dans certaines pathologies dégénératives de la rétine telle que la rétinite pigmentaire, la mutation d'un ou plusieurs gènes provoque une atteinte spécifique des photorécepteurs qui meurent par apoptose (Wenzel et al., 2005). La mort des photorécepteurs exposés à la lumière présentent de grandes similitudes avec celle des maladies dégénératives et aident à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement pathologique.

Contrairement au patron de dégénérescence bien décrit chez l'animal mature, de rares études se sont penchées sur les effets d'une exposition lumineuse chez le rat albinos juvénile (O'Steen et al., 1974; Kuwabara and Funahashi, 1976; Malik et al., 1986). Pourtant, la rétine postnatale immature ne semble pas posséder la même sensibilité aux dommages oxydatifs que la rétine adulte. Par exemple, les photorécepteurs de la rétine postnatale sont peu sensibles aux lésions hyperoxiques (Dembinska et al., 2001) par rapport au rat adulte (Dembinska et al., 2001; Wellard et al., 2005). Dans un type de blessure qui cible aussi spécifiquement les photorécepteurs qu'une exposition lumineuse intense, on ne connaît pas les conséquences sur la rétine de rat juvénile encore immature.

Le but de cette thèse était donc de documenter les dommages fonctionnels (électrophysiologie) et structurels (histologie) subis par la rétine de jeunes rats albinos après une exposition lumineuse intense.

Pour ce faire, des rats albinos nouveau-nés ont été exposés à 10 000 lux avant l'ouverture des paupières, de la naissance au jour postnatal 14 (P14) (Chapitre 2, Article 1). Contre toute attente, nous avons découvert que les rats nouveau-nés ne présentaient pas de dommages rétiniens à P30 lorsque les électrorétinogrammes (ERG) étaient enregistrés à ce moment-là. Par contre, les ERGs enregistrés à P60 présentaient des anomalies, suggérant une apparition retardée des lésions au niveau des photorécepteurs. Néanmoins, ces altérations restaient minimes par rapport à des rétines adultes exposées aux mêmes conditions lumineuses.

Dans un deuxième temps, des rats albinos juvéniles ont été exposés à 10 000 lux après ouverture des paupières, pendant différentes périodes de temps entre P14 et P34

(Chapitre 3, Article 2). Les données électrophysiologiques et histologiques ont montré que les rétines des jeunes rats possédaient une remarquable résistance endogène par rapport à des rétines de rats adultes. Par exemple, seulement 50% de l'activité électrique des photorécepteurs est abolie et 50% de l'épaisseur de la couche nucléaire externe est détruite chez le rat juvénile exposé pendant 6 jours, alors que dans le même temps l'activité et la structure des photorécepteurs sont totalement perdues chez l'adulte. Nous avons établi que cette fenêtre de résistance à la lumière persistait jusqu'à la fin du premier mois postnatal.

Pour étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la résistance des photorécepteurs, les niveaux endogènes de certains facteurs de survie comme les facteurs neurotrophiques FGF-2, CNTF et BDNF ont été déterminés par immunobuvardage protéique après exposition à la lumière (Chapitre 4, Article 3). Après 14 jours d'exposition lumineuse, les rétines des rats juvéniles ont montré une surexpression de FGF-2 et de CNTF alors qu'aucun changement n'a été détecté chez l'adulte. Nos résultats indiquent que l'augmentation de FGF-2 et de CNTF se produisait essentiellement dans les cellules de Müller, suggérant que la libération de facteurs de survie par les cellules gliales pourrait être un mécanisme de protection naturelle de la rétine juvénile blessée.

Les résultats de la thèse montrent que les rétines de rats albinos juvéniles possèdent une résistance endogène aux dommages induits par un environnement lumineux intense et suggèrent que les mécanismes neuroprotecteurs des photorécepteurs impliquent l'augmentation des facteurs neurotrophiques.

Mots clés : électrorétinographie, dommages lumineux, développement, rétine, facteurs neurotrophiques, résistance, photorécepteurs.

SUMMARY

Retinal photodegeneration in adult albino rat is a well-established experimental model to study the mechanisms of photoreceptor death. Exposure of adult rats to an intensity superior to 1 000 lux leads to apoptotic cell death of photoreceptors while other retinal cell layers are preserved (bipolar cell, ganglion cell, etc). In retinal degenerative diseases such as retinitis pigmentosa, mutations in one or more genes induce specific damages in photoreceptors leading to apoptotic cell death (Wenzel et al., 2005). The death of the photoreceptors exposed to light is very similar to that occurring in degenerative diseases and can thus be used to improve our understanding of mechanisms involved in these pathologic processes.

In contrast to the well-known pattern of degeneration in the mature animal, only a few studies investigated the effects of a light exposure in albino juvenile rats (O'Steen et al., 1974; Kuwabara and Funahashi, 1976; Malik et al., 1986). However, the immature postnatal retina does not seem to possess the same sensitivity to oxidative damages as that of adult retina. For example, photoreceptors of the immature postnatal retina have little susceptibility to hyperoxic damages (Dembinska et al., 2001) compared to those of adult rats (Dembinska et al., 2001; Wellard et al., 2005). In a model of injury that specifically targets photoreceptors, such as a bright light exposure, the consequences on the juvenile immature rat retina are not known.

The aim of this thesis was to document the functional (electrophysiology) and structural (histology) damages caused to the juvenile albino rat retina after bright light exposure.

To do so, newborn albino rats were exposed to 10 000 lux before eyelid opening, from birth to postnatal day 14 (P14) (Chapter 2, Article 1). Unexpectedly, we discovered that newborn rats did not display retinal damages when electroretinograms (ERGs) were recorded at P30. However, ERGs recorded at P60 presented anomalies suggesting some delayed damages in photoreceptors. Nevertheless, these alterations were subtle compared to those observed in adult retinas exposed to the same luminous conditions.

In a subsequent experiment, albino juvenile rats were exposed to 10 000 lux after eyelid opening, for different periods of time comprised between P14 and P34 (Chapter 3, Article 2). Electrophysiological and histological data showed that young rat retinas possessed a remarkable endogenous resistance compared to adult rat retinas. For example, only 50% of the electrical activity of photoreceptors was abolished and 50%

of the thickness of the outer nuclear layer was degraded in juvenile rat exposed for 6 days, while photoreceptor activity and structure were completely lost in adults. We established that this window of resistance to light lasted until the end of the first postnatal month.

In order to study the cellular and molecular mechanisms involved in the resistance of photoreceptors, endogenous variations of some survival factors such as FGF-2, CNTF and BDNF neurotrophic factors were determined by western-blot analysis after light exposure (Chapter 4, Article 3). After 14 days of exposure, juvenile rat retinas displayed FGF-2 and CNTF upregulations while no change was detected in adult retinas. Our results indicate that FGF-2 and CNTF increase mainly occurred in Müller cells, suggesting that survival factor release by glial cells may be a natural mechanism of protection in the injured juvenile retina.

The results of the thesis demonstrate that juvenile albino rat retinas possess endogenous mechanism of resistance to bright light stress and suggest that neuroprotective mechanisms of photoreceptors may involve the increase of neurotrophic factors.

Keywords: electroretinography, light damages, development, retina, neurotrophic factors, resistance, photoreceptors.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....iii
SUMMARY.....v
TABLE DES MATIÈRES.....vii
LISTE DES TABLEAUX.....xiii
LISTE DES FIGURES.....xiv
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....xvi
REMERCIEMENTS.....xx

CHAPITRE 1.....1
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....1
I.1- La rétine.....2
I.1.1- Organisation générale de la rétine.....2
I.1.2- Développement de la rétine chez le rat nouveau-né.....2
I.1.2.1- Genèse des cellules rétiniennes.....2
I.1.2.2- Différenciation des couches cellulaires de la rétine chez le rat....3
I.1.3- Prolifération et régénération : Comparaison entre une rétine juvénile et une rétine adulte.....4
I.1.3.1- Poissons, Amphibiens et Oiseaux.....4
I.1.3.2- Rats et Souris.....5
I.1.4- Description des différents neurones rétiniens.....5
I.1.4.1- La voie directe de transmission du signal.....5
I.1.4.1.a- Les photorécepteurs.....5
I.1.4.1.b- Les cellules bipolaires.....8
I.1.4.1.c- Les cellules ganglionnaires.....8
I.1.4.2- La voie latérale de transmission du signal par les interneurones..9
I.1.4.2.a- Les cellules horizontales.....9
I.1.4.2.b- Les cellules amacrines.....10
I.1.4.3- Les cellules gliales de Müller.....10
I.1.4.4- Les deux types de circulation sanguine dans la rétine.....10
I.2- Cascade de phototransduction dans les photorécepteurs.....11
I.2.1- Le potentiel membranaire de repos atypique et le "courant d'obscurité"..11

I.2.2- Cascade de phototransduction.....11

I.3- L'électrorétinogramme.....14

I.3.1- Historique.....14

I.3.2- Origines cellulaires des ondes de l'ERG.....15

I.3.2.1- Onde-a.....15

I.3.2.2- Onde-b.....16

I.3.2.3- Onde-c.....17

I.3.2.4- Les potentiels oscillatoires (PO).....17

I.4- Les dégénérescences rétiniennes.....18

I.4.1- Dégénérescence débutant par les bâtonnets.....19

I.4.1.1- Amaurose Congénitale de Leber (ACL).....19

I.4.1.2- Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge (DMLA).....20

I.4.1.3- Rétinopathie diabétique.....20

I.4.1.4- Rétinopathie Du Prématuré.....21

I.4.1.5- Rétinite Pigmentaire (RP).....22

I.4.1.5.a- RP autosomale récessive (RPar).....22

I.4.1.5.b- RP autosomale dominante (RPad).....23

I.4.1.6- Autres pathologies impliquant une dégénérescence des photorécepteurs.....24

I.4.2- Dégénérescence débutant par les cônes.....24

I.5- Les mécanismes de mort cellulaire.....24

I.5.1- Apoptose dépendante de l'activation des caspases.....25

I.5.2- Apoptose indépendante de l'activation des caspases.....29

I.6- Les facteurs neurotrophiques.....29

I.6.1- La famille des neurotrophines.....30

I.6.1.1- Les récepteurs Trk et leur signalisation.....31

I.6.1.1.a- La voie Ras-MAPK.....31

I.6.1.1.b- La voie de la PhosphoLipase Cγ (PLCγ).....31

I.6.1.1.c- La voie PI3 kinase/Akt.....32

I.6.1.2- Le récepteur $p75^{NTR}$.....32

I.6.1.3- Rôle du BDNF.....33

I.6.2- La famille du facteur neurotrophique ciliaire (CNTF).....33
I.6.3- La famille du facteur de croissance des fibroblastes (FGFs).....34
I.6.4- Les protéines de la famille du TGF-β (*Transforming Growth Factor-β*).....35

I.7- La photodégénérescence de la rétine.....35
I.7.1- Lumière et processus dégénératifs réversibles.....35
I.7.1.1- La photostasie : Mécanismes d'adaptation suite à une exposition lumineuse.....35
I.7.1.2- Susceptibilité des photorécepteurs et historique lumineux ("light history").....36
I.7.2- Lumière et dommages lumineux irréversibles.....37
I.7.2.1- Description des dommages lumineux.....37
I.7.2.2- Classification des dommages lumineux.....41
I.7.2.3- Dégradation de l'épithélium pigmentaire.....42
I.7.2.4- Dommages photochimiques et modifications biochimiques.....42
I.7.2.5- Facteurs influençant la sévérité des dommages à la lumière.....44
I.7.2.5.a- Durée d'exposition et intensité lumineuse.....44
I.7.2.5.b- L'historique lumineux ("light history").....45
I.7.2.5.c- Rythme circadien.....45
I.7.2.5.d- Génétique.....45
I.7.2.5.e- Pigmentation.....45
I.7.2.5.f- Âge et sexe.....46
I.7.2.5.g- Température corporelle.....46
I.7.3- Les modèles animaux utilisés pour l'exposition à la lumière.....47
I.7.4- Protection des photorécepteurs après une exposition à la lumière.....48
I.7.4.1- Mécanismes de réparation naturels *in vivo*.....48
I.7.4..2- Utilisation des facteurs neurotrophiques.....48

I.8- Objectifs de la thèse.....49

CHAPITRE 2.....50

PREMIER ARTICLE: "STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CONSEQUENCES OF BRIGHT LIGHT EXPOSURE ON THE RETINA OF NEONATAL RATS".....51

II.1- Abstract.....52
II.2- Introduction.....53
II.3- Methods.....54
II.3.1- Animals.....54
II.3.2- Electroretinography.....55
II.3.3- Retinal histology.....56
II.3.4- Data analysis.....56
II.4- Results.....57
II.5- Discussion.....60
II.6- References.....66
II.7- Figures.....73

CHAPITRE 3.....83

DEUXIÈME ARTICLE: "LIGHT-INDUCED RETINOPATHY: COMPARISON BETWEEN ADULTS AND JUVENILE RATS".....84

III.1- Abstract.....85
III.2- Introduction.....86
III.3- Methods.....87
III.3.1- Animals.....87
III.3.2- Electroretinography.....88
III.3.3- Retinal histology.....89
III.3.4- Data analysis.....89
III.4- Results.....90
III.4.1- Effects of bright light exposure on the function of the adult and juvenile retina.....90
III.4.2- Effects of bright light exposure on the structure of the adult

and juvenile retina.....92

III.4.3- Maturation of the light damaged retina.....94

III.5- Discussion.....95

III.6- References.....99

III.7- Figures.....105

CHAPITRE 4.....121

TROISIÈME ARTICLE: "EVIDENCE SUGGESTING FGF-2 AND CNTF NEUROPROTECTION IN THE JUVENILE RAT MODEL OF LIGHT-INDUCED RETINOPATHY".....122

IV.1- Abstract.....123

IV.2- Introduction.....124

IV.3- Methods.....125

IV.3.1- Animals.....125

IV.3.2- Histological and photoreceptor cell death analysis.....126

IV.3.3- Western blot analysis.....127

IV.3.4- Immunohistochemistry.....128

IV.4- Results.....128

IV.5- Discussion.....131

IV.6- References.....135

IV.7- Figures.....141

CHAPITRE 5.....157

DISCUSSION GÉNÉRALE.....157

V.1- Résistance des photorécepteurs aux dommages lumineux.....158

V.2- Définition de la période critique.....159

V.3- Les facteurs neurotrophiques dans le mécanisme de résistance endogène...160

V.3.1- L'augmentation des facteurs neurotrophiques dans la blessure rétinienne.....160

V.3.2- Gliose des cellules de Müller.....161

V.4- Autres mécanismes de neuroprotection dans le système visuel immature....164

V.4.1- Modulation des voies apoptotiques par le DHA.....164

V.4.2- Action des enzymes anti-oxydantes et mécanismes de réparation...165

V.5- Rétinopathie induite par la lumière et rétinite pigmentaire.....166

V.6- Conclusion générale.....167

RÉFÉRENCES.....169

ANNEXE 1.....197

"BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR GENE DELIVERY TO MÜLLER GLIA PRESERVES STRUCTURE AND FUNCTION OF LIGHT-DAMAGED PHOTORECEPTORS".....198

ANNEXE 2.....231

CONTRIBUTIONS AUX ARTICLES

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1

Tableau 1- Caractéristiques de l'apoptose et de la nécrose dans la mort cellulaire.....25

CHAPITRE 2

Tableau 1.....82

CHAPITRE 3

Tableau 1.....120

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

Figure 1- Organisation générale de l'œil et de la rétine.....7

Figure 2- Mécanismes de phototransduction et enregistrement de l'activité électrique des cellules rétiniennes.....12

Figure 3- Cascade apoptotique.....27

Figure 4- Mécanisme de dégénérescence des photorécepteurs par la lumière.....39

CHAPITRE 2

Figure 1.....78

Figure 2.....79

Figure 3.....80

Figure 4.....81

CHAPITRE 3

Figure 1.....113

Figure 2.....114

Figure 3.....115

Figure 4.....116

Figure 5.....117

Figure 6.....118

Figure 7.....119

CHAPITRE 4

Figure 1.....149

Figure 2.....150

Figure 3.....151

Figure 4.....152

Figure 5.....153

Figure 6.....154

Figure 7.....155

Figure 8.....156

CHAPITRE 5

Figure 5- Modèle hypothétique de résistance de la rétine juvénile aux dommages lumineux.....163

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC	ATP Binding Cassette
ACL	Amaurose Congénitale de Leber
Ad	Adénovirus
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AIF	Apoptosis Inducing Factor
AMPA	(S) alpha-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolPropionic Acid
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AP-1	Activator Protein-1
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor-1
APB	acide 2-Amino-4-PhosphonoButyrique
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messager
ARPE	human Retinal Pigment Epithelium cells
ATP	Adénosine TrisPhosphate
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
Ca^{2+}	Calcium
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domain
CCG	Couche des Cellules Ganglionnaires
CNE	Couche Nucléaire Externe
CNI	Couche Nucléaire Interne
CNTF	Ciliary NeuroTrophic Factor
CNTFR	Ciliary NeuroTrophic Factor Receptor
Co^{2+}	Cobalt
COX-2	CycloOXygenase-2
CPE	Couche Plexiforme Externe
cpfl1	cone photoreceptor function loss 1
CPI	Couche Plexiforme Interne
CRALBP	Cellular RetinALdehyde Binding Protein
CREB	cAMP Response Element Binding protein
CSNB	Congenital Stationnary Night Blindness
DAG	DiAcylGlycérol
DHA	DocosaHexaenoic Acid

DMLA	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge
EP	Épithélium Pigmentaire
ERG	ÉlectroRétinoGramme
ERK	Extracellular signal Regulated Kinase
FADD	Fas-Associated Death Domain protein
FGF-2	Fibroblast Growth Factor-2
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
GABA	γ-AminoButyric Acid
GDNF	Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor
GDP	Guanosine-5'-DiPhosphate
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GTP	Guanosine-5'-TriPhosphate
GTPase	Guanosine-5'-TriPhosphatase
GMP	Guanosine MonoPhosphate
GMPc	Guanosine MonoPhosphate Cyclique
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
IGF-II	Insulin-like Growth Factor-II
IL-6	Interleukine-6
IL-1β	Interleukine-1β
IP_3	Inositol trisPhosphate
Jak	Janus kinase
K^+	Potassium
LEDGF	Lens Epithelium-Derived Growth Factor
LIF	Leukemia-Inhibitory Factor
LIFR	Leukemia-Inhibitory Factor Receptor
LIFRβ	Leukemia-Inhibitory Factor Receptor β
NFκB	Nuclear Factor κ B
NPD1	NeuroProtectine D1
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCP-3	Monocyte Chemoattractant Protein-3
MEK	MAPK-Erk Kinase
Mg^{2+}	Magnésium

mGluR6	metabotropic Glutamate Receptor 6
Na^+	Sodium
NGF	Nerve Growth Factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate
Nrl	Neural retina leucine zipper
NT	NeuroTrophin
O_2	Oxygène
PARP-1	Poly-ADP-Ribose Polymérase-1
PDE	PhosphoDiEstérase
PEDF	Pigment Epithelium-Derived Factor
PKC	Protéine Kinase C
PI3K	PhosphatidylInositol 3-Kinase
PLA2	PhosphoLipase A2
PLC	PhosphoLipase C
PO	Potentiels Oscillatoires
PPSE	Potentiel PostSynaptique Excitateur
PPSI	Potentiel PostSynaptique Inhibiteur
RCS	Royal College of Surgeons
rd	retinal degeneration
rds	retinal degeneration slow
RdCVF	Rod-derived Cone Viability Factor
RDP	Rétinopathie Du Prématuré
rho	rhodopsine
RGS	Regulators of G protein Signaling
RIO	Rétinopathie Induite par l'Oxygène
RP	Rétinite Pigmentaire
RPad	Rétinite Pigmentaire autosomale dominante
RPar	Rétinite Pigmentaire autosomale récessive
RPE65	Retinal Pigment Epithelium 65
SEP	Segments Externes des Photorécepteurs
Shc	Src homologous and collagen-like
SOD	SuperOxide Dismutase
Sos	Son of sevenless
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription

TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TNFR-1	Tumor Necrosis Factor Receptor-1
TRAF	Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor
Trk	Tropomyosin-related kinase
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP Nick End Labeling
VAA	Virus Adéno-Associé
ZMC	Zone Marginale Circonférentielle

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Pierre Lachapelle, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire alors que je n'étais qu'une "nobody" en électrophysiologie. Les discussions que nous avons partagées sur les résultats de mon projet et sur les articles qui en découlent ont grandement enrichies ma formation doctorale. Sa grande ouverture d'esprit m'a permis de mener mon projet vers des voies plus moléculaires et mécanistiques et je lui en suis très reconnaissante. Je remercie également le Dre Hakima Moukhles pour m'avoir prise dans son laboratoire au début de mon doctorat.

Merci à toutes les personnes qui ont partagé quotidiennement ma vie au laboratoire : Julie R., Allison, Julie L., Catherine, Marianne, Hadi et sans oublier la petite dernière, Nawal. Sans vous, mon doctorat n'aurait jamais été aussi ....pimenté! Merci également à tous les membres passés (Mike, Laure) et présents du laboratoire du Dre Di Polo pour m'avoir considérée comme étudiante à part entière du laboratoire. Un grand merci à Philippe Bourgeois pour son support technique qui fût très apprécié.

J'aimerais également remercier le Dr Michel Anctil et le Dre Thérèse Cabana pour m'avoir permis de travailler librement dans leur laboratoire à un moment difficile de mon doctorat. Je tiens aussi à remercier le Dre Adriana Di Polo pour ses conseils. Merci également à Louise Pelletier, ma fournisseuse officielle de couteaux de verre, pour m'avoir appris quelques secrets de l'histologie et de la microscopie électronique, pour sa patience et sa gentillesse.

J'aimerais aussi remercier Abdel, Malorie, Laure, Stéphanie et Louise Cloutier pour les conversations que nous avons eues et pour leur soutien tout au long de ces années. Merci au personnel du secrétariat du Département de Sciences Biologiques pour nous aider à surmonter les méandres administratifs et pour nous simplifier grandement la vie !

Merci au Réseau Vision du FRSQ pour le support financier lors des congrès scientifiques comme celui de l'Association for Research in Vision and Ophthalmology et pour l'organisation de congrès locaux annuels si dynamiques.

Un merci tout particulier à Vincent qui m'a toujours soutenue tout au long de cette étape, qui a partagé avec moi les hauts et les bas, les moments de joie et de doute. Merci pour m'avoir guidée dans la bonne voie ! Notre relation personnelle et scientifique a encore de belles années devant elle....

J'aimerais finalement remercier ma famille pour leur soutien et leur compréhension : je suis partie à 5 000 kms de chez moi mais je pense sincèrement que cela en valait la peine !

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

I.1- La rétine.

I.1.1- Organisation générale de la rétine.

L'œil est composé de 3 couches; la sclérotique est la couche la plus externe, la choroïde richement vascularisée se situe au milieu puis, la rétine plus interne est au contact de l'humeur vitrée ((Kolb, 2003); Figure 1A).

La rétine est une feuille de tissu neural d'environ 0,4 mm d'épaisseur tapissant la cavité interne de l'œil. Sa structure laminaire se divise en 5 couches: trois couches nucléaires composées de neurones et deux couches plexiformes riches en connexions synaptiques. Les corps cellulaires des photorécepteurs sont localisés dans la couche nucléaire externe (CNE) de la rétine et sont les principales cellules sensibles à la stimulation lumineuse. Leurs segments externes sont directement accolés à l'épithélium pigmentaire (EP, couche non-neurale contenant des granules de mélanine) qui participe aux besoins métaboliques des photorécepteurs et agit comme une barrière face aux ions et à la plupart des molécules. La couche plexiforme externe (CPE) contient les axones et les dendrites des cellules horizontales et bipolaires, ainsi que les terminaisons synaptiques des photorécepteurs. La couche nucléaire interne (CNI) contient les corps cellulaires des cellules bipolaires, horizontales et amacrines alors que la couche plexiforme interne (CPI) est constituée des axones et dendrites des cellules bipolaires, amacrines et ganglionnaires. La couche la plus interne de la rétine est la couche des cellules ganglionnaires dont les axones projetant au cerveau forment le nerf optique (Kolb, 1994, 2003).

Les photons composant la lumière traversent l'épaisseur de la rétine, des cellules ganglionnaires aux segments externes des photorécepteurs (SEP) où ils sont capturés. L'énergie lumineuse est transformée, ou "transduite", en potentiels électriques dans les photorécepteurs qui sont ensuite transmis vers les cellules ganglionnaires (Kolb, 2003).

I.1.2- Développement de la rétine chez le rat nouveau-né.

I.1.2.1- Genèse des cellules rétiniennes.

Des injections de traceurs radioactifs comme la thymidine tritiée ont permis de préciser les périodes de genèse des différentes cellules rétiniennes (Rapaport et al., 2004). Chez le rat, la genèse des cellules de la rétine commence aux alentours du jour embryonnaire 10 (E10), 50% des cellules sont nées vers le 1er jour postnatal (P1) alors qu'à P6, 95% des cellules ont été générées. La rétinogenèse est complète aux environs de P12. Tous les types de cellules de la rétine sont générés à partir d'un progéniteur

cellulaire unique (Turner and Cepko, 1987). En premier les différents types de neurones rétiniens colonisent la rétine centrale et ensuite envahissent la rétine périphérique (Rapaport et al., 2004). La formation des cellules de la rétine se produit en 2 phases : une phase précoce, où vont être générées les cellules ganglionnaires, les cellules horizontales et les cônes et une phase plus tardive, où sont élaborés les bâtonnets, les cellules bipolaires et les cellules de Müller. Les cellules amacrines sont produites entre les deux phases (Rapaport et al., 2004). Ces deux phases ont des caractéristiques et des cinétiques bien différentes permettant de les différencier : la phase 1 se déroule selon une cinétique constante et se termine par un plateau ("*steady-state kinetic*"). Elle donne lieu à la formation rapide (de E10 à E16) et constante de cellules rétiniennes (10,6% des cellules). La phase 2, quant à elle, voit la naissance d'un plus grand nombre de cellules (vu le nombre de bâtonnets générés) avec une augmentation exponentielle dans la production cellulaire. Chez la souris, les cellules rétiniennes suivent le même patron de formation que ce qui a été décrit chez le rat (Cepko et al., 1996; Rapaport et al., 2004). Chez le primate, l'ordre de formation des cellules est exactement le même que chez le rat mais la rétinogenèse s'étend sur plus de 100 jours (La Vail et al., 1991; Rapaport et al., 2004).

I.1.2.2- Différenciation des couches cellulaires de la rétine chez le rat.

Les cellules ganglionnaires sont les premières cellules qui se différencient au 17ème jour de gestation (E17) et forment une monocouche distincte dans le rétine la plus interne vers E20 (Braekevelt and Hollenberg, 1970; Cepko et al., 1996). Le nerf optique est formé dès E17 par les prolongements centraux des cellules ganglionnaires (Braekevelt and Hollenberg, 1970). À la naissance, la rétine de rat est constituée de deux couches cellulaires: une couche interne constituée d'une rangée de cellules ganglionnaires bien différenciées et une couche externe composée de nombreuses cellules neuroblastiques (Weidman and Kuwabara, 1968). Pendant les 4 jours suivant la naissance, de nombreuses mitoses ont lieu à la bordure externe de la rétine neurale ce qui augmente considérablement l'épaisseur de la couche neuroblastique (Braekevelt and Hollenberg, 1970). Le développement des segments externes des photorécepteurs commence aussi à cette époque et leur maturation se termine environ deux semaines plus tard (Detwiler, 1932; Webster and Rowe, 1991; Cepko et al., 1996; Fulton et al., 1998; Stone et al., 1999). Le développement des segments externes se fait en étroite association avec l'épithélium pigmentaire. La CPE commence à se former vers P5/P6

par des extensions latérales des cellules horizontales (Weidman and Kuwabara, 1968; Webster and Rowe, 1991). Le développement de la CPE est presque complet à P10 (Webster and Rowe, 1991). La CNI apparaît lors du développement des cellules horizontales à P4 et elle débute en formant 3 couches sous-laminaires (Webster and Rowe, 1991). La couche la plus interne donne naissance aux cellules amacrines qui sont les premières à se différencier. La couche intermédiaire fournit les cellules bipolaires tandis que la couche la plus externe, constituée de cellules en migration, disparaît totalement (Webster and Rowe, 1991). La CPI devient plus compacte avec le développement des cellules de Müller et elle semble être mature à P12. L'ARNm de l'opsine est détecté dès P2 (Treisman et al., 1988) alors que la rhodopsine est présente à P7 (Bonting et al., 1961). La fonction rétinienne reflétée par les enregistrements électrorétinographiques commence vers P12 (Bonting et al., 1961; Weidman and Kuwabara, 1968). Cette réponse nécessite la présence des membranes des photorécepteurs et de synapses fonctionnelles (Weidman and Kuwabara, 1968). Cependant, la maturation rétinienne continue pendant deux autres semaines durant lesquelles la différenciation des cellules individuelles et la formation des vaisseaux sanguins se poursuivent (Weidman and Kuwabara, 1968). À la naissance, l'œil de raton apparaît relativement immature et son développement correspond à celui d'un fœtus humain de 4 à 5 mois (Weidman and Kuwabara, 1968).

I.1.3- Prolifération et régénération : Comparaison entre une rétine juvénile et une rétine adulte.

La rétine possède, dans sa partie la plus périphérique, une zone proliférative qui génère des cellules souches. Cette zone est appelée zone progénitrice ou zone marginale circonférentielle (ZMC), adjacente aux corps ciliaires qui représentent eux-mêmes une zone riche en cellules souches (Fischer and Reh, 2003b; Moshiri et al., 2004). Ces cellules souches renouvellent continuellement le stock de cellules situé au niveau de la ZMC (Hitchcock et al., 2004). Une étude comparative entre plusieurs espèces animales a récemment montré que la ZMC a graduellement diminué au cours de l'évolution et reflèterait leur capacité à régénérer après une blessure (Kubota et al., 2002).

I.1.3.1- Poissons, Amphibiens et Oiseaux.

Chez la plupart des poissons et des amphibiens, de nouvelles cellules rétiniennes sont produites dans la ZMC tout au long de la vie (Hitchcock et al., 2004). Une zone

similaire de progéniteurs rétiniens a récemment été découverte chez les oiseaux (Hitchcock et al., 2004). Chez le poulet, on peut observer une dédifférenciation et une prolifération des cellules de Müller en réponse à des dommages (injection de NMDA ou traitement avec la colchicine) ou à des facteurs de croissance (injections intraoculaires d'insuline et de FGF-2). En réponse à ces facteurs, les cellules gliales se mettent à exprimer des facteurs de transcription normalement présents chez les progéniteurs embyonnaires de la rétine et elles peuvent se différencier en différents types de neurones rétiniens (Fischer and Reh, 2001, , 2003a; Vihtelic et al., 2006). Il s'agit d'un phénomène de neurogenèse régénératrice qui remplace les neurones rétiniens perdus après une blessure chez ces espèces animales (Hitchcock et al., 2004). Chez le poisson zébré (*Danio rerio*), la régénération des photorécepteurs est possible après un stress lumineux (Vihtelic and Hyde, 2000; Vihtelic et al., 2006). Alors que tous les neurones rétiniens peuvent être régénérés chez les amphibiens et les poissons, ce phénomène est limité aux cellules amacrines et bipolaires chez les oiseaux (Hitchcock et al., 2004).

I.1.3.2- Rats et Souris.

Chez la souris, la ZMC est très réduite voire absente (Kubota et al., 2002). Des études chez le rat pigmenté ont montré que la rétine postnatale possède des cellules progénitrices capables de se différencier en cellules neuronales et gliales. Cependant, ce potentiel de prolifération serait transitoire et la compétence à générer de nouveaux neurones diminuerait pendant la période postnatale (Engelhardt et al., 2004). Néanmoins, des études récentes ont montré l'existence d'une population de cellules souches dans les corps ciliaires, *in vivo* dans l'œil de souris adultes (Tropepe et al., 2000) et *in vitro* dans l'œil de rats adultes (Ahmad et al., 2000).

I.1.4- Description des différents neurones rétiniens.

I.1.4.1- La voie directe de transmission du signal (Figure 1B).

I.1.4.1.a- Les photorécepteurs.

Situés dans la partie la plus externe de la rétine, les photorécepteurs sont les cellules neuronales les plus abondantes avec environ 115 millions de bâtonnets et 6,5 millions de cônes dans la rétine humaine. Les bâtonnets (longueur: 100-120 µm) sont sensibles aux faibles intensités lumineuses et sont donc impliqués dans la vision nocturne alors que les cônes (longueur: 60-75 µm) activés à plus forte luminosité

permettent la distinction détaillée des objets et la perception des couleurs (Forrester et al., 2002).

Contrairement à la rétine de rongeur, la rétine humaine comporte une région centrale uniquement peuplée de cônes qui est appelée la *fovea centralis* (environ 150 000 cônes/mm^2 au centre de la fovée). Cette région est responsable de la perception fine des formes et des couleurs dans la vision. La densité de cônes chute à ~7 000 cônes/mm^2 si l'on se place à 3 mm du centre de la fovée (fovéola). Les bâtonnets se concentrent principalement dans la rétine périphérique (160 000 bâtonnets/mm^2). Chez les primates, il existe un seul type de bâtonnets mais trois types de cônes différents participent à la vision des couleurs (vision trichromatique). Les cônes S, dits "bleus", présents dans 10% de la rétine et totalement absents du centre de la fovée, sont activés par une lumière de faible longueur d'onde (environ 430 nm). Les cônes M dits "verts", moins abondants, sont sensibles aux lumières de longueurs d'onde moyenne (environ 530 nm) alors que les cônes L dits "rouges", très abondants dans la rétine, sont sensibles aux grandes longueurs d'onde (environ 560 nm) (Rodieck, 1998; Kolb, 2003).

Les deux types de photorécepteurs possèdent une ultrastructure similaire (Figure 2, (2)). Leurs segments externes sont constitués d'un empilement de sacs membranaires ou saccules porteurs du pigment visuel (rhodopsine pour les bâtonnets et opsine pour les cônes) dont la disposition optimise la détection des photons. Dans les bâtonnets, les disques, en renouvellement constant (Young, 1967, 1976), sont séparés de la membrane plasmique alors qu'ils y restent fusionnés dans les cônes. Le segment interne, connecté au segment externe par un cil, est constitué de différentes organelles cellulaires classiques (mitochondries, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique lisse, microtubules) qui assurent une grande activité métabolique. Les noyaux des bâtonnets et des cônes sont regroupés dans la CNE alors que leurs terminaisons synaptiques sont situées dans la CPE. Les terminaisons synaptiques des bâtonnets appelées sphérules sont des invaginations uniques de la membrane cellulaire, contrairement aux terminaisons synaptiques des cônes appelées pédicèles qui sont constituées d'un grand nombre d'invaginations. Ces invaginations peuvent contenir les extensions de deux cellules horizontales et d'au moins deux cellules bipolaires ainsi que le ruban synaptique (Kolb, 1994; Ahnelt and Kolb, 2000; Forrester et al., 2002).

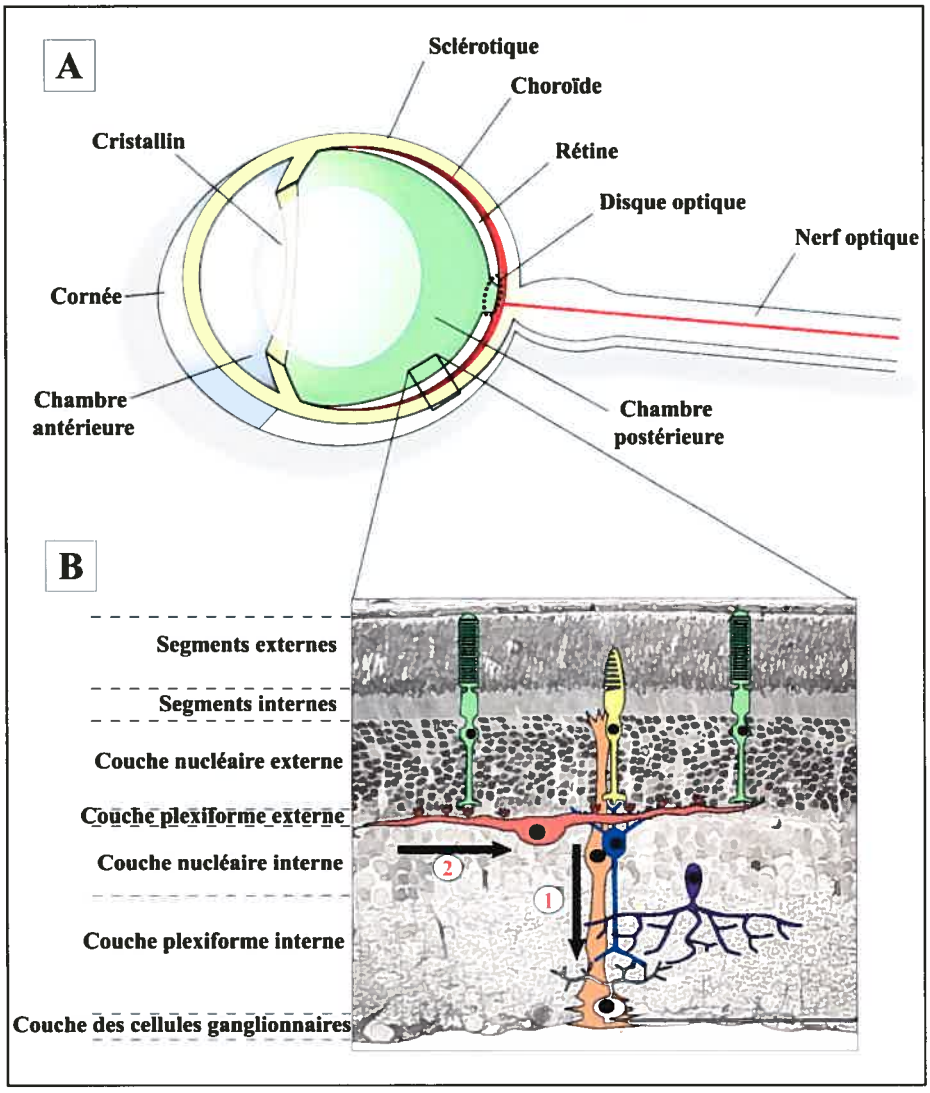


Figure 1- Organisation générale de l'œil et de la rétine.
(**A**) L'œil est constitué principalement de 3 couches : la sclérotique (jaune), la choroïde (rouge) et la rétine (blanc). La rétine est la couche la plus interne de l'œil, elle se trouve en contact à la fois avec l'humeur vitrée (vert) de la chambre postérieure et avec la choroïde richement vascularisée. (**B**) La rétine est un tissu neuronal laminaire composé de 3 couches nucléaires et de 2 couches plexiformes riches en connexions synaptiques. Il existe 2 voies principales de neurotransmission. (**1**) Par la voie directe, le signal passe par les photorécepteurs, cônes (jaune) ou bâtonnets (vert) puis par les cellules bipolaires (bleu) et arrive aux cellules ganglionnaires (rose clair) qui transmettent le signal visuel sous forme de potentiels d'action le long du nerf optique vers le cerveau. (**2**) Le signal peut également emprunter une voie latérale indirecte et transiter par les interneurones tels que les cellules horizontales (rose foncé) ou les cellules amacrines (violet). Les cellules de Müller (orange) sont les principales cellules gliales de la rétine dont les prolongements radiaires s'étendent de la membrane limitante externe à la membrane limitante interne. © Vincent Pernet.

I.1.4.1.b- Les cellules bipolaires.

La rétine humaine contient environ 36 millions de cellules bipolaires avec différents sous-types fonctionnels et morphologiques (Forrester et al., 2002). Cependant, toutes les cellules bipolaires ont leurs dendrites situés dans la CPE, leurs noyaux dans la CNI et leurs terminaisons axonales dans la CPI. Les cellules bipolaires reçoivent des messages des photorécepteurs et des cellules horizontales et stimulent les cellules ganglionnaires en aval. La division des cellules bipolaires en différents sous-types est basée sur le type de photorécepteur concerné (cône ou bâtonnet), le nombre de photorécepteur connectés, le type de cône impliqué (S, M ou L) ou le type de contact effectué (ON-, OFF-).

Il existe deux voies bien distinctes de transmission du signal rétinien: les bâtonnets font spécifiquement synapses avec des cellules bipolaires de bâtonnets à centre-ON, alors que les cônes font synapses avec des cellules bipolaires de cônes à centre-ON ou -OFF (Kolb, 2003). La différence majeure entre ces 2 voies est que, dans la voie des bâtonnets, les cellules amacrines (AII : glycinergiques ou A17 : GABA-ergiques) servent de relais entre les cellules bipolaires-ON et les cellules ganglionnaires-ON alors que, dans la voie passant par les cônes, le signal passe directement des cellules bipolaires-ON ou -OFF de cônes aux cellules ganglionnaires-ON ou -OFF sans intermédiaire (Kolb, 2003). En fait, l'appellation -ON ou -OFF des cellules bipolaires fait référence au type de contact synaptique établi entre la cellule bipolaire et la terminaison du photorécepteur (sphérule ou pédicèle). La plupart des cellules bipolaires de cônes et toutes les cellules bipolaires de bâtonnets dépolarisent (centre-ON) en présence de lumière et sont stimulées via des récepteurs métabotropes au glutamate, essentiellement le récepteur mGluR6, couplée à une protéine G. Par contre, la signalisation des cellules bipolaires de cônes qui s'hyperpolarisent en présence de lumière (centre-OFF) fait intervenir des récepteurs ionotropes avec des canaux spécifiques AMPA-kainate-glutamate dans leur synapse avec les photorécepteurs (Kolb, 1994, 2003).

I.1.4.1.c- Les cellules ganglionnaires.

Les corps cellulaires des cellules ganglionnaires sont situés dans la couche la plus interne de la rétine. Ce sont les seules cellules de la rétine capables de générer un potentiel d'action; elles envoient les informations visuelles au cerveau le long de longs faisceaux d'axones qui constituent le nerf optique. Les cellules ganglionnaires reçoivent

des signaux électriques opposés (PPSE ou PPSI) de la part des cellules bipolaires et des cellules amacrines, concourant à établir un antagonisme centre-périphérie de leur champ récepteur. Deux types principaux de cellules ganglionnaires ont été identifiés chez les primates: les cellules de type-M (ou "magno") possèdent un gros corps somatique et contribuent à environ 10% de la population ganglionnaire totale. Le reste est constitué des cellules de type-P (ou "parvo") de plus petit diamètre. Les cellules de type M sont impliquées dans la perception des mouvements et sont sensibles aux faibles contrastes alors que les cellules de type P perçoivent mieux les formes et sont sensibles aux changements de couleurs (Isenmann et al., 2003).

De façon tout à fait surprenante, certaines cellules ganglionnaires sont directement excitables par la lumière grâce à la synthèse d'un photopigment particulier appelé la mélanopsine. Seul 1 à 3 % des cellules ganglionnaires de la rétine contiendrait de la mélanopsine. Elles auraient un rôle dans l'entretien et la synchronisation du rythme circadien (Hattar et al., 2002; Berson, 2003).

I.1.4.2- La voie latérale de transmission du signal par les interneurones (Figure 1B).

I.1.4.2.a- Les cellules horizontales.

Il existe deux types de cellules horizontales: les cellules HI (type B) et les cellules HII (type A). Leurs axones et dendrites sont situés dans la CPE tandis que les corps cellulaires se trouvent dans la CNI. Les cellules HI entrent en contact avec les cônes et les bâtonnets alors que les cellules HII ne rentrent en contact qu'avec les cônes. Les cellules horizontales connectées avec deux photorécepteurs voisins sont responsables du phénomène d'inhibition latérale dont les potentiels post-synaptiques s'opposent à la décharge des photorécepteurs. Le premier type d'inhibition latérale implique les cellules HI (avec un petit arbre télodendritique), les cônes L et M et les cellules bipolaires des cônes; l'effet est obtenu grâce aux jonctions lacunaires (gap junction des synapses électriques) entre les cellules HI. Le deuxième type d'inhibition latérale met en jeu l'arborisation télodendritique des HI avec les bâtonnets et les cellules bipolaires des bâtonnets; l'effet provient de la grande taille des arborisations dendritiques qui se chevauchent. Un troisième type d'inhibition latérale implique les cellules HII et les cellules bipolaires de cônes S (les cônes S sont exclusivement connectés aux cellules HII); l'effet est principalement dû aux connexions des cellules HI et HII entre elles par des jonctions lacunaires (Dacey, 1999). Les cellules horizontales ont pour rôle de moduler le signal des photorécepteurs (Kolb, 2003).

I.1.4.2.b- Les cellules amacrines.

Il existe environ 40 types de cellules amacrines réparties dans la CNI et dans la couche des cellules ganglionnaires. Elles reçoivent les stimulations des cellules bipolaires et d'autres cellules amacrines, et en retour, modulent le taux de décharge des cellules ganglionnaires (Dacey, 1999). Elles participent activement à la transmission du signal dans la voie des bâtonnets, entre les cellules bipolaires-ON et les cellules ganglionnaires (Kolb, 2003).

I.1.4.3- Les cellules gliales de Müller (Figure 1B).

Analogues aux astrocytes, ce sont les principales cellules gliales de la rétine. Leurs corps cellulaires se trouvent dans la CNI et ce sont les seules cellules gliales radiaires de la rétine : leurs prolongements s'étendent de la membrane limitante externe, près des segments internes des bâtonnets, à la membrane limitante interne située à proximité des cellules ganglionnaires et de l'humeur vitrée. En enveloppant les vaisseaux sanguins, les corps cellulaires et les extensions neuronales, les cellules de Müller assurent un rôle de nutrition et de maintien structurel pour la rétine externe qui manque d'un apport sanguin direct (la rétine interne étant irriguée par la circulation rétinienne). Les cellules de Müller maintiennent l'équilibre ionique extracellulaire et recyclent les neurotransmetteurs toxiques tels que le glutamate (Newman and Reichenbach, 1996; Forrester et al., 2002). Récemment, des études ont démontré que certains facteurs neurotrophiques, comme le FGF-2 ou le CNTF, étaient produits par les cellules de Müller en réponse à des blessures mécaniques (Kostyk et al., 1994; Wen et al., 1995; Cao et al., 2001a), suite à un stress lumineux (Walsh et al., 2001; Valter et al., 2005) ou après injection de NMDA (Honjo et al., 2000).

I.1.4.4- Les deux types de circulation sanguine dans la rétine.

La rétine est le tissu neural qui consomme le plus d'oxygène parmi tous les tissus du corps humain. Elle a donc une vascularisation adaptée à ses besoins. Elle possède un apport sanguin double: les deux tiers de la rétine interne sont irrigués par des vaisseaux de la circulation rétinienne (artères et veines ophtalmiques), alors que le tiers externe est nourri par la circulation choroïdienne. La circulation choroïdienne est composée d'un lit de capillaires fenestrés où la vitesse du flux sanguin est de 150 mm/seconde et où les échanges en oxygène sont faibles. Par contre, la circulation rétinienne permet des échanges très importants en oxygène mais la vitesse du flux

sanguin est plutôt réduite (25 mm/seconde). Lorsque l'artère ciliorétinienne reste présente près de la tête du nerf optique, elle établit une petite connexion anastomosée entre ces deux circulations qui sont généralement indépendantes l'une de l'autre (Forrester et al., 2002).

I.2- Cascade de phototransduction dans les photorécepteurs.

La phototransduction est un mécanisme qui permet de transformer l'énergie lumineuse en un signal neural électrique qui est envoyé et traité dans les aires visuelles du cerveau.

I.2.1- Le potentiel membranaire de repos atypique et le "courant d'obscurité".

Les membranes des SEP portent à leur surface des canaux sodiques dont l'ouverture est dépendante du GMPc. À l'obscurité, les canaux dépendant du GMPc s'ouvrent et laissent entrer les ions Na^+ (par le gradient électrochimique) dans le milieu intracellulaire. Ce courant est appelé le courant d'obscurité ou "dark current" (34 pA) qui donne un potentiel de membrane légèrement dépolarisé de -40 mV (Figure 2A). L'entrée de Na^+ et Ca^{2+} provoque la libération continue de molécules de glutamate contenu dans des vésicules synaptiques au niveau de la terminaison synaptique des photorécepteurs. La capture de photons par les SEP entraîne la fermeture des canaux sodiques qui réduit la libération synaptique de glutamate (Rodieck, 1998).

I.2.2- Cascade de phototransduction (Figure 2A).

Les photopigments des photorécepteurs sont composés d'une partie protéique transmembranaire, la rhodopsine et d'un chromophore dérivé de la vitamine A, le rétinal. L'arrivée de photons stimule la trans-isomérisation du 11-cis rétinal inactif en sa forme active, tout-trans rétinal. Le rétinal actif entraîne un changement conformationnel de la rhodopsine qui devient capable d'activer la protéine transducine (Gt) adjacente. En perdant son lien avec le GDP, la sous-unité α de la transducine se lie au GTP et stimule un effecteur enzymatique, la phosphodiestérase (PDE). La PDE transforme le GMPc en GMP, ce qui provoque la fermeture des canaux sodiques/calciques. Les membranes des photorécepteurs s'hyperpolarisent et moins de glutamate est libéré au niveau des synapses des photorécepteurs. La baisse de glutamate affecte différemment les canaux postsynaptiques des cellules bipolaires (potentiels postsynaptiques excitateurs, PPSE ou inhibiteurs, PPSI) et par la suite la décharge des cellules ganglionnaires (Molday, 1998; Kolb, 2003). Les cellules bipolaires-OFF possèdent des canaux sodiques dépendant du

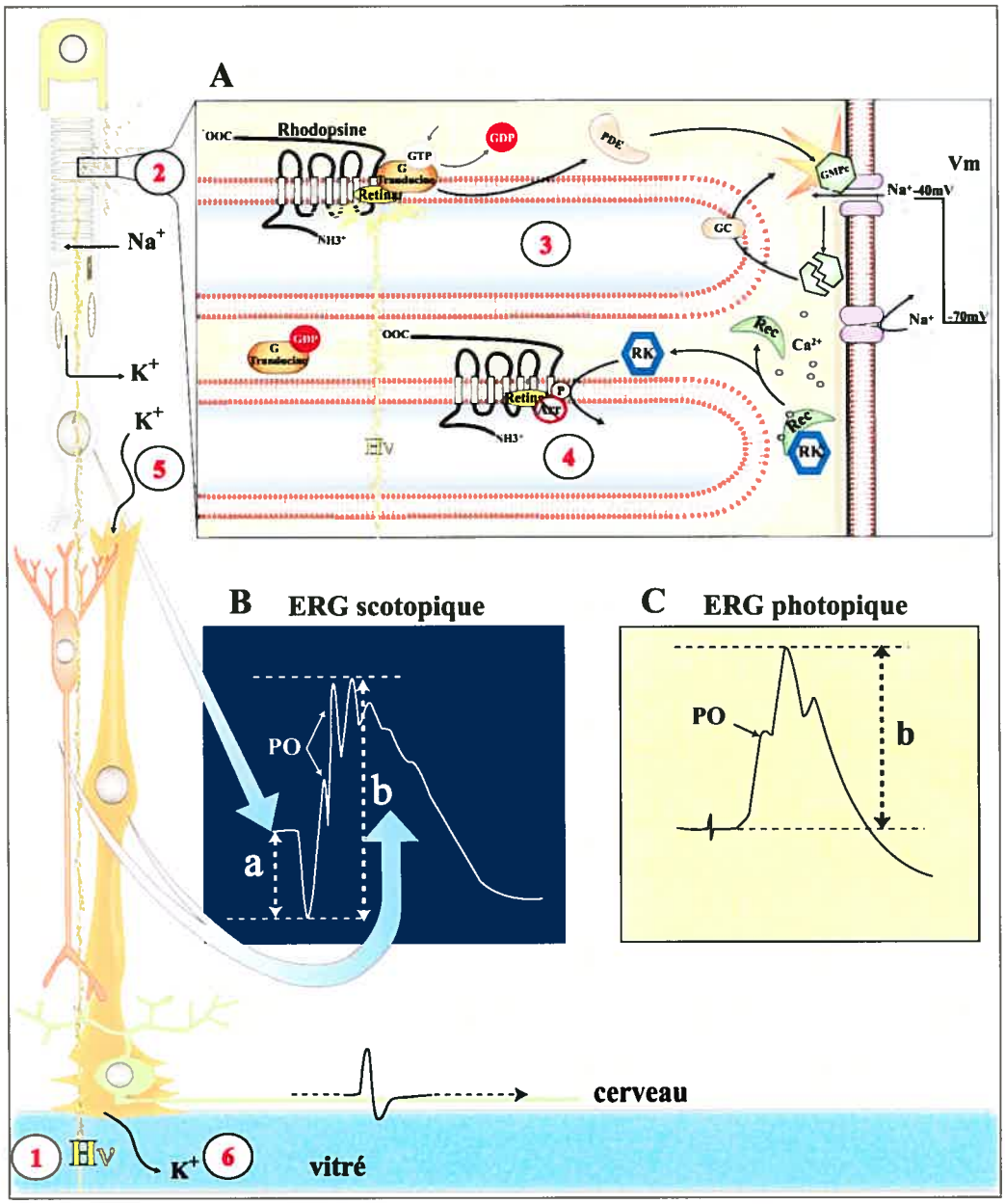


Figure 2- Mécanisme de phototransduction et enregistrement de l'activité électrique des cellules rétiniennes.

Le rayon lumineux traverse toutes les couches de la rétine (**1**) avant d'atteindre les segments externes des photorécepteurs (**2**). (**A**) Le rétinal est excité par les photons et entraîne le changement conformationnel de la rhodopsine (**3**). La rhodopsine activée stimule la protéine G transducine qui est associé et induit la libération de GDP. La sous-unité-α de la transducine se lie au GTP et stimule l'activation de la phosphodiestérase (PDE) qui transforme le GMPc en GMP. Ce clivage de GMPc en GMP provoque la fermeture des canaux sodiques qui hyperpolarise les photorécepteurs. La libération de neurotransmetteur glutamate diminue dans la fente synaptique. Après la diminution de Ca^{2+}, la recoverine (Rec) libère la kinase de la rhodopsine (RK) qui phosphoryle la rhodopsine et permet la liaison de cette dernière à l'arrestine. La sous-unité-α de la

transducine reprend une conformation inactive en hydrolysant le GTP en GDP grâce à l'action d'une protéine RGS (*Regulator of G protein Signaling*). Les échanges ioniques qui ont lieu pendant la cascade de phototransduction ont des répercussions sur l'activité électrique des cellules rétiniennes (**B**, **C**). Dans des conditions d'enregistrement à la noirceur (scotopique) (**B**), les photorécepteurs s'hyperpolarisent en réponse au flash lumineux et à l'entrée de Na^+, induisant une déflexion du tracé électrophysiologique vers le bas (onde-a notée "a"). Le signal est ensuite transmis aux cellules bipolaires (rose) qui contribuent, avec les cellules gliales de Müller (orange), à la formation de l'onde-b ("b") de l'ERG. En conditions d'enregistrement avec une lumière de fond (photopique) (**C**), l'ERG est uniquement constitué de l'onde-b (notée "b"). Des vaguelettes sur la phase ascendante de l'onde-b sont appelées potentiels oscillatoires (PO). Suite au flash lumineux, l'entrée de Na^+ dans les photorécepteurs entraîne une sortie de K^+ qui est aussitôt recapturé par les cellules de Müller (orange) (**5**). Le K^+, toxique pour l'environnement cellulaire, est éliminé dans l'humeur vitrée par les cellules de Müller (**6**). © Vincent Pernet.

glutamate qui déchargent des PPSE. Les cellules bipolaires-ON dépolarisent par l'ouverture de canaux K^+ et la fermeture de canaux sodiques dépendant du GMPc (Tessier-Lavigne, 2000). La cascade de phototransduction prend fin avec l'inactivation de 3 intermédiaires: la métarhodopsine II, la forme photolysée active de la rhodopsine ; la sous-unité α de la transducine couplée au GTP et la forme active de la PDE (Jindrova, 1998). La rhodopsine est phosphorylée par la kinase de la rhodopsine ce qui permet à la protéine inhibitrice arrestine de s'y lier (Figure 2A). L'hydrolyse du GTP en GDP par la RGS (*Regulators of G protein Signaling*) libère la sous-unité-α de la transducine et permet le retour de la PDE à son état inactif (Figure 2A). Les sous-unités-βγ de la transducine se réassocient avec la sous-unité-α pour former un hétérotrimère inactif de la transducine (Molday, 1998).

La cascade biochimique de phototransduction amplifie le signal obtenu de sorte que l'œil peut détecter un seul photon. Une molécule de rhodopsine (10^9 molécules de rhodopsine/bâtonnet) peut activer des centaines de molécules de transducine qui peuvent elles-mêmes activer des centaines de molécules de PDE. Chaque molécule de PDE peut briser 1 000 molécules de GMPc par seconde. De plus, l'empilement des saccules plus petit dans les cônes est à l'origine de leur plus faible sensibilité à la lumière par rapport aux bâtonnets. En effet, une réponse de cônes nécessite 40 fois plus de photons que pour obtenir la même réponse avec des bâtonnets (Tessier-Lavigne, 2000).

I.3- L'électrorétinogramme.

I.3.1- Historique.

L'électrorétinographie est une technique électrophysiologique qui permet d'enregistrer des potentiels électriques des cellules de la rétine en réponse à une stimulation lumineuse. Ces potentiels reflètent l'activité électrique des différentes populations cellulaires de la rétine. Les premiers potentiels évoqués par la lumière au niveau de l'œil ont été enregistrés dans le milieu du 19e siècle; les chercheurs avaient déjà identifié ces potentiels comme étant originaires de la rétine. Ils avaient même établi une relation entre l'amplitude de la réponse et l'intensité du stimulus lumineux. En 1924, Kahn et Lövenstein ont réalisé le premier ERG humain. Depuis cette époque, les ERGs ont été très étudiés de manière à déterminer leurs composantes et à comprendre les relations entre la structure de la rétine et son activité électrique. Plus important

encore, l'électrorétinogramme (ERG) est devenu un outil précieux de diagnostic dans les pathologies de la rétine et permet de suivre les altérations fonctionnelles.

Le travail de Granit (1933-1947) posa les bases de l'analyse des ERGs. Il postula l'existence de 3 composantes appelées PI, PII et PIII en fonction de leur ordre de disparition sous une anesthésie à l'éther. PI ou onde-c possède un long temps de latence et une polarité positive par rapport à la cornée. PII ou onde-b possède un temps de latence moyen et une polarité positive alors que la composante PIII, possédant un court temps de latence et une polarité négative, est responsable de l'onde-a et -d sur l'ERG (de Rouck, 1991).

I.3.2- Origines cellulaires des ondes de l'ERG.

L'orientation des cellules joue un grand rôle dans la composition de l'ERG: à part les cellules ganglionnaires, toutes les cellules de la rétine participent aux ondes électriques de l'ERG après une stimulation lumineuse. Néanmoins, les cellules orientées horizontalement ou celles qui ont une répartition irrégulière (cellules horizontales, amacrines, interplexiformes) contribuent plus faiblement à la genèse de l'ERG. L'intensité du flash utilisé pour la stimulation lumineuse, le rapport cônes/bâtonnets sont autant de facteurs qui peuvent moduler les réponses cellulaires à l'ERG chez les différentes espèces (Karwoski, 1991).

I.3.2.1- Onde-a.

En condition scotopique (les sujets ont été préalablement adaptés à la noirceur et l'enregistrement se fait dans le noir) et avec un flash de stimulation de forte intensité ($\geq$ 2,4 log cd.sec.m^{-2}), la réponse électrique est dite mixte et les bâtonnets et les cônes participent à la formation de l'onde-a (Figure 2B). Avec un flash de stimulation de faible intensité ($<$ 2,4 log cd.sec.m^{-2}), le recrutement des bâtonnets se fait de manière asynchrone et non-coordonnée, si bien que l'onde-a n'apparaît pas sur le tracé électrophysiologique. L'intensité minimale de stimulation requise pour générer une onde-a est appelée "Rod Vmax" et permet de mesurer spécifiquement la réponse des bâtonnets. Lorsque l'enregistrement de l'ERG est effectué en condition photopique (c'est-à-dire en condition lumineuse), l'onde obtenue provient d'une réponse pure de cônes (Figure 2C). Contrairement à ce que l'on observe chez les Cochons d'Inde, les souris ou l'humain (Racine et al., 2005), l'ERG photopique de rat albinos ne montre pas d'onde-a enregistrable (Rosolen et al., 2004; Fonteille et al., 2005). En fonction des

conditions photopique et scotopique, l'ERG permet de distinguer l'activité électrique des cônes et des bâtonnets.

I.3.2.2- Onde-b.

L'onde-b reflète l'activité électrique des cellules de Müller et des cellules bipolaires (Figures 2B et 2C). L'utilisation de bloqueurs sélectifs de la transmission synaptique (comme Mg^{2+}, Co^{2+} ou l'aspartate), entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires, a permis de confirmer l'origine de l'onde-b en aval des photorécepteurs (composante PII de Granit). Ces bloqueurs abolissent totalement l'onde-b tout en laissant l'onde-a des photorécepteurs intacte (Furukawa and Hanawa, 1955; Dowling and Ripps, 1972; Shimazaki et al., 1984). À l'aide de microélectrodes intrarétiniennes placées à différentes profondeurs, le pic électrique de l'onde-b se produit autour de la CNI qui contient les cellules bipolaires et les cellules de Müller. Il a donc été proposé que ces deux types de cellules radiales forment un dipôle électrique générant l'onde-b (Tomita, 1950; Tomita and Funaishi, 1952; Brown and Wiesel, 1961; Arden and Brown, 1965). Un analogue du glutamate, l'APB (acide 2-amino-4-phosphonobutyrique), bloque sélectivement les réponses des cellules bipolaires-ON (Slaughter and Miller, 1981) et abolit l'onde-b (Massey et al., 1983; Knapp and Schiller, 1984; Stockton and Slaughter, 1989). Néanmoins, Newman (Newman, 1979, 1980) démontra que l'onde-b était générée principalement par deux courants localisés près des couches plexiformes interne et externe et par une large source de courant située à la membrane limitante interne. Par cette expérience, il démontra donc le rôle clé des cellules de Müller, seules cellules de la rétine s'étendant de la membrane limitante interne à la membrane limitante externe. D'autres expériences utilisant des traitements avec l'acide α-aminoadipique (analogue du glutamate utilisé pour éliminer les cellules de Müller) suggèrent que les cellules de Müller participent activement à la genèse de l'onde-b (Bonaventure et al., 1985; Reichenbach and Eberhardt, 1988). Les études ont montré que l'onde-b était produite par des variations de concentrations extracellulaires de K^+ après une stimulation lumineuse (Faber, 1969; Miller and Dowling, 1970; Miller, 1973). En condition d'illumination, les photorécepteurs libèrent du K^+ qui se retrouve en quantité élevée dans les couches plexiformes interne et externe. Cet excès d'ion K^+ est capturé par les cellules de Müller et rejeté dans l'humeur vitrée. C'est ce flux d'ions K^+ qui génère l'onde-b (Figure 2D).

I.3.2.3- Onde-c.

L'onde-c, ou composante PI de Granit, est une onde de polarité positive par rapport à la cornée qui suit la venue de l'onde-b. Elle est constituée de deux composantes: un potentiel négatif par rapport à la cornée généré par la rétine neurale et aussi appelé "composante PIII lente", et une composante de potentiel positif par rapport à la cornée provenant de l'épithélium pigmentaire (Rodieck, 1972). Le fonctionnement des cellules de l'EP est asymétrique : la membrane des cellules de l'EP proche de la choroïde est moins perméable aux ions K^+ que celle proche de la rétine. Il en résulte une différence de potentiel constante entre la choroïde et la rétine. Cependant, chaque modification dans la concentration de K^+ d'un côté ou de l'autre entraîne un déséquilibre du potentiel passant par l'épithélium. L'onde-c traduit donc les variations des concentrations de K^+ qui ont lieu entre l'épithélium pigmentaire et la rétine (Noell, 1954).

I.3.2.4- Les potentiels oscillatoires (Figures 2B et 2C).

Identifiés pour la première fois par Cobb and Morton (Cobb and Morton, 1954), les potentiels oscillatoires (PO) sont des potentiels très nombreux, de haute fréquence qui se superposent à la phase ascendante de l'onde-b. Étant des composantes rapides de l'ERG, leur enregistrement nécessite l'utilisation d'une technique filtrante spéciale (bande passante utilisée : 100-1 000Hz ; amplification : ×50 000) de manière à augmenter leur amplitude et à diminuer la contribution des composantes lentes de l'ERG (onde-a et -b ; bande passante utilisée : 1-1 000Hz ; amplification : ×10 000) (Lachapelle and Benoit, 1994; Marmor and Zrenner, 1998; Wachtmeister, 1998).

L'origine des PO est encore très controversée mais certains suggèrent que les générateurs des PO se situeraient post-synaptiquement aux photorécepteurs (Wachtmeister and Dowling, 1978). Chaque PO a une origine rétinienne différente et les générateurs les plus probables sont les cellules bipolaires, les cellules amacrines glycinergiques et les cellules interplexiformes (Wachtmeister, 1998). Les PO sont différemment sensibles aux agents pharmacologiques (Lachapelle, sous presse). Les PO précoces, à courte latence sont plus sensibles aux antagonistes du GABA (acide α-aminobutyrique) (Wachtmeister, 1998), à un bloqueur de la dopamine, l'halopéridol (Wachtmeister, 1998), à l'APB (Guité and Lachapelle, 1990), à la β-alanine. Les PO tardifs de longue latence sont plus sensibles à l'éthanol (Wachtmeister, 1998), aux

antagonistes glycinergiques comme la strychnine (Wachtmeister, 1998) et à l'acide iodoacétique (bloqueur de la glycolyse) (Lachapelle et al., 1990).

Il existe 3 écoles de pensée principales concernant les PO. La première est que les PO à courte latence sont générés par la voie des cônes alors que les PO à longue latence sont générés par la voie des bâtonnets (King-Smith et al., 1986; Rousseau and Lachapelle, 1999). Ici, les cônes et les bâtonnets contribuent tous les deux à la genèse des PO mais les PO engendrés par les bâtonnets sont généralement retardés par rapport à ceux produits par les cônes. La deuxième hypothèse est que les PO à courte latence sont liés à la réponse des cellules-ON, alors que les PO à longue latence sont reliés aux réponses des cellules de la voie-OFF (Kojima and Zrenner, 1978). Ces résultats, en accord avec de précédentes recherches (Nelson et al., 1978; Wachtmeister and Dowling, 1978), suggèrent que les PO tardifs sont générés par des cellules-OFF de la rétine distale alors que les PO précoces sont issus des cellules-ON localisées dans la rétine plus proximale. La troisième théorie est que les PO à courte latence seraient générés par des cellules situées au centre de la rétine (c'est-à-dire près de la macula), alors que les PO à longue latence sont générés par des cellules localisées dans la rétine périphérique (Lachapelle, 1994; Lachapelle et al., 1996).

Malgré la controverse, les PO peuvent être utilisés dans le dépistage clinique et l'identification de certaines pathologies (Lachapelle, sous presse). Par exemple, la dystrophie des cônes peut se traduire par une abolition complète du PO_3, alors que la rétinite pigmentaire liée au chromosome X entraîne une diminution significative dans l'amplitude et retarde l'apparition des PO_2, PO_3 et PO_4. Dans la CSNB (*Congenital Stationnary Night Blindness*, pathologie qui affecte la vision de nuit), ce sont les PO_2 et PO_3 qui disparaissent alors que le PO_4 est relativement bien préservé. Même pour des maladies pédiatriques comme la rétinopathie du prématuré, l'étude des PO peut se révéler un outil précieux (Francois and De Rouck, 1983). Une diminution dans l'amplitude des PO_2, PO_3 et PO_4 peut suggérer l'existence de formes légères de rétinopathie du prématuré chez un patient (Fulton and Hansen, 1996).

I.4- Les dégénérescences rétiniennes.

Les dégénérescences de la rétine constituent la première cause de cécité dans les pays occidentaux. Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à ces pathologies, il existe de nombreux modèles animaux possédant des mutations spontanées ou génétiquement induites (Li, 2001; Pierce, 2001; Chang et al., 2002; Fauser et al., 2002;

Dejneka et al., 2003; Dalke and Graw, 2005). Les stratégies de protection des cellules rétiniennes sont de plus en plus basées sur la thérapie génique qui permet de réintroduire la forme normale d'un gène déficient véhiculé par un vecteur viral ou de stimuler les mécanismes de survie en exprimant un facteur neurotrophique ou un facteur anti-apoptotique (Bennett and Maguire, 2000; Besch and Zrenner, 2003; Dejneka et al., 2003; Delyfer et al., 2004; Rolling, 2004). De nombreuses autres approches consistent à limiter le développement des dommages avec, par exemple, des antioxydants (vitamine A) ou des bloqueurs des canaux calciques ; à rétablir la fonction des cellules perdues par des transplantations d'EP ou de rétines, des prothèses rétiniennes ou encore l'utilisation de cellules souches (Besch and Zrenner, 2003; Delyfer et al., 2004).

I.4.1- Dégénérescence débutant par les bâtonnets.

I.4.1.1- Amaurose Congénitale de Leber (ACL).

Il s'agit d'une dégénérescence rétinienne précoce et progressive résultant en une héméralopie (cécité nocturne) complète dès la naissance ou la petite enfance et qui aboutit à la cécité complète à l'adolescence (Pierce, 2001; Dejneka et al., 2003). La pathologie induit un ERG de bâtonnet presque complètement plat et une réponse modifiée voire absente des cônes (Pang et al., 2005a).

Des mutations indépendantes dans au moins 6 gènes ont été identifiées, notamment dans le gène RPE65 localisé dans l'épithélium pigmentaire de la rétine (Dejneka et al., 2003). Plusieurs modèles animaux avec des déficiences au niveau du gène RPE65 existent actuellement comme le chien Briard suédois, la souris knock out pour le gène RPE65 ($RPE65^{-/-}$) (Pierce, 2001; Dalke and Graw, 2005) ou la souris *rd12* (Pang et al., 2005a). Dans tous les cas, les animaux souffrent d'une dégénérescence progressive de la rétine avec des déficiences visuelles très sévères caractérisées par un manque de rhodopsine, une accumulation d'esters tout-trans rétinal et de gouttelettes lipidiques dans l'épithélium pigmentaire. Des études de thérapie génique faites chez le chien (Acland et al., 2001; Narfstrom et al., 2003) ou la souris (Dejneka et al., 2004; Pang et al., 2005b) ont déjà montré une récupération fonctionnelle après traitement avec un virus adéno-associé (VAA) contenant l'ADN du gène RPE65 fonctionnel. Pour palier à la déficience d'une enzyme intervenant dans l'ACL, des composés dérivés des rétinoïdes ont été récemment administrés par voie orale et représentent les premiers essais pharmacologiques dans un modèle murin d'ACL (Batten et al., 2005). Les premiers essais de thérapie génique chez l'humain sont actuellement en cours.

I.4.1.2- Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge (DMLA).

Principale cause de cécité chez les personnes âgées de plus de 65 ans, la DMLA est une altération maculaire acquise, non-héréditaire et non-inflammatoire qui conduit à une baisse progressive de la vision, aboutissant à une perte de la vision centrale. Les patients gardent une certaine autonomie avec leur vision périphérique mais ne pourront plus utiliser la vision maculaire et fine servant à lire, conduire ou regarder la télévision.

Les premières manifestations de la DMLA résultent en un épaississement et une perte de l'architecture de la membrane de Bruch (localisée entre la choroïde et l'épithélium pigmentaire), une accumulation de lipofuscine et la formation de drusen dans l'épithélium pigmentaire (Rakoczy et al., 2006). Les drusen sont en fait des dépôts extracellulaires qui s'attachent entre la membrane basale de l'EP et la zone interne, riche en collagène, de la membrane de Bruch. Il existe actuellement 2 formes de DMLA : la DMLA sèche s'accompagne d'une accumulation de dépôts et de débris dans la rétine externe, menant à des changements dystrophiques dans l'épithélium pigmentaire, essentiellement au niveau de la rétine centrale. D'un autre côté, la DMLA humide est un processus pathologique conduisant à des changements néovasculaires (Rakoczy et al., 2006). Dans les 2 cas, la perte de la vision est obtenue suite à la destruction de la rétine.

Les traitements actuels se limitent à la photocoagulation au laser des vaisseaux choroïdiens anormaux et ne permettent qu'un ralentissement temporaire de la progression de la pathologie. De nombreux modèles transgéniques murins présentent une ou plusieurs caractéristiques de la DMLA (dépôts de lipofuscine, développement de drusen mous, atrophie de l'EP et des photorécepteurs, néovascularisation) mais peu de modèles aboutissent à la forme finale de la DMLA sèche ou humide (Dalke and Graw, 2005; Wenzel et al., 2005; Rakoczy et al., 2006). De plus, les modèles murins ne possèdent pas de macula.

I.4.1.3- Rétinopathie diabétique.

C'est aussi une des principales causes de cécité chez les personnes âgées de plus de 65 ans. La rétinopathie diabétique proliférative est une pathologie progressive qui implique la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de la circulation rétinienne. La croissance de ces vaisseaux sanguins au niveau de l'humeur vitrée peut conduire à des hémorragies, à un détachement rétinien et donc à une perte de la vision (Dejneka et al.,

2003; Frank, 2004). Les modèles animaux sont les mêmes que ceux utilisés pour la rétinopathie du prématuré (RDP) (voir section suivante).

I.4.1.4- Rétinopathie Du Prématuré (RDP).

La rétinopathie du prématuré est la principale cause de cécité chez l'enfant (Dejneka et al., 2003). Cette pathologie fut décrite pour la première fois en 1942 sous le nom de fibroplasie rétrolentale (Terry, 1942). La RDP est avant tout une maladie vasculaire rétinienne (Ben Sira et al., 1988; Wheatley et al., 2002). Les enfants nés prématurément ont une rétine incomplètement vascularisée. De plus, la formation incomplète des poumons des prématurés requiert un placement en conditions hyperoxiques (généralement 80% O_2) pour assurer une oxygénation normale des tissus. Cependant, dans les premières minutes qui suivent la surexposition à l'oxygène, le calibre des vaisseaux sanguins est réduit de moitié par rapport à leur taille initiale, aussitôt suivi par un retour à la normale. Si l'exposition à l'oxygène persiste plus longtemps (de 4 à 6 heures sous 80-90% O_2), la fermeture graduelle des vaisseaux se poursuit jusqu'à atteindre 80% de vasoconstriction. La vasoconstriction est encore réversible à ce stade. Cependant, après 10 à 15 heures d'exposition, la plupart des vaisseaux rétiniens les plus immatures s'obstruent de manière permanente et les cellules endothéliales sont fortement endommagées (Palmer et al., 1998). Lorsque le nouveau-né est replacé en conditions normoxiques (21% O_2), il s'ensuit une prolifération très marquée des cellules endothéliales, provenant de complexes vasculaires résiduels, qui vont former de nouveaux vaisseaux et croître à la surface de la rétine. Les vaisseaux oblitérés de manière non permanente peuvent fusionner mais le remodelage vasculaire progressif, ayant lieu de manière désordonnée, s'accompagne de nombreuses anomalies conduisant à des hémorragies rétiniennes, à des détachements rétiniens et, dans les cas les plus extrêmes, à la cécité complète (Patz, 1969; Palmer et al., 1998).

Les traitements chirurgicaux actuels sont limités à la cryogénie, cryothérapie et à l'ablation au laser de la rétine avasculaire. Des traitements à la vitamine E (antioxydants) diminueraient la sévérité de la maladie sans en diminuer la fréquence (Ben Sira et al., 1988; Phelps, 1992; Palmer et al., 1998).

Des modèles de rétinopathie induite par l'oxygène (RIO) (Madan and Penn, 2003) ont été développés en utilisant des animaux dont le système visuel est relativement immature à la naissance par rapport au primate, comme la souris (Smith et al., 1994), le rat (Penn et al., 1994), le chien (McLeod et al., 1996a; McLeod et al., 1996b), le porc

(Sisson et al., 1984) ou le chat (Chan-Ling et al., 1992). Les travaux de Dembinska et ses collaborateurs (Dembinska et al., 2001; Dembinska et al., 2002) ont montré que le degré de maturité de la rétine au moment de l'exposition jouait un rôle très important dans la sévérité des dommages. Ainsi, la rétine devient sensible pendant la deuxième semaine de développement postnatal. Par exemple, une exposition à 80% d'O_2 pendant cette période entraînait un amincissement de ~80% de l'épaisseur de la CPE, une diminution de plus de 80% du nombre des cellules horizontales et une réduction de l'amplitude de l'onde-b de l'ERG de ~50% par rapport à la normale.

I.4.1.5- Rétinite Pigmentaire (RP).

C'est une maladie héréditaire autosomale récessive ou autosomale dominante qui touche 1/3 000 individus dans le monde (Dejneka et al., 2003). Elle se caractérise par une cécité nocturne complète, une perte graduelle de la vision périphérique suivie, éventuellement, par une perte de la vision centrale d'où la sensation décrite par les patients de se trouver dans un tunnel (Berson, 1993; Pierce, 2001; Dejneka et al., 2003; Kennan et al., 2005). Ces symptômes reflètent en fait la perte précoce des bâtonnets (responsables de la vision de nuit) suivie par la dégénérescence lente des cônes (d'où une perte de la vision de jour) (Pierce, 2001).

I.4.1.5.a- RP autosomale récessive (RPar).

Elle résulte de mutations par perte de fonction dans des gènes qui jouent un rôle dans la cascade de phototransduction (Figure 2A) (PDE, rhodopsine) et dans l'entretien du segment externe (CRALBP, RPE65 entre autres) (Pierce, 2001).

De nombreux modèles animaux avec des dégénérescences rétiniennes spontanées sont utilisés comme la souris *rd,* le Setter irlandais, le rat RCS (Royal College of Surgeons), la souris *rds* (Pierce, 2001; Dejneka et al., 2003) et la souris $Rho^{-/-}$ (Jaissle et al., 2001). La souris *rd* et le Setter Irlandais possèdent tous deux une mutation spontanée dans le gène codant pour la sous-unité-β de la phosphodiestérase (Figure 2A) (Pittler and Baehr, 1991; Farber et al., 1992; Suber et al., 1993). Le rat RCS possède une mutation dans le gène responsable du récepteur tyrosine kinase Mertk (D'Cruz et al., 2000). Chez ces animaux, la protéine RPE65 de l'épithélium pigmentaire n'assure plus son rôle dans la phagocytose des segments externes des photorécepteurs et il en résulte une accumulation des débris dans l'espace sous-rétinien et une perte progressive des cônes et bâtonnets (D'Cruz et al., 2000; Cuenca et al., 2005; Wang et

al., 2005). La souris *rds* possède une mutation par perte de fonction dans le gène Prph2 (rds/périphérine) (Connell et al., 1991).

Les principales approches thérapeutiques utilisées pour pallier la dégénérescence des photorécepteurs ont nécessité l'introduction d'une version fonctionnelle du gène inactivé. De même, l'utilisation des facteurs neurotrophiques peut ralentir le processus de dégénérescence. Ainsi, l'injection intravitréale de FGF-2 entraîne une sauvegarde des photorécepteurs chez le rat RCS (Faktorovich et al., 1990). Chez la souris *rds* (Cayouette et al., 1998; Liang et al., 2001a) et knock out Rho $^{-/-}$ (Liang et al., 2001b), un traitement avec VAA-CNTF a montré un ralentissement de la mort des photorécepteurs. Une protection transitoire dans la structure des photorécepteurs a été obtenue avec l'injection intravitréale de PEDF chez des souris *rd* et *rds* (Cayouette et al., 1999). Par thérapie génique, l'utilisation de gènes anti-apoptotiques s'est avérée efficace pour empêcher la mort des photorécepteurs (Chang et al., 1993). L'injection sous-rétinienne d'adénovirus (Ad) contenant le gène bcl-2 (Ad-bcl-2) protège les photorécepteurs dans le modèle de souris *rd* (Bennett et al., 1998). Récemment, une étude a montré que la transplantation de bâtonnets dans une souris *rd*, dépourvue de bâtonnets, retardait la perte des cônes (Mohand-Said et al., 2000).

I.4.1.5.b- RP autosomale dominante (RPad).

Cette pathologie peut être causée par un grand nombre de mutations par gain de fonction dans des gènes spécifiques du photorécepteur, comme par exemple la rhodopsine (Dryja et al., 1990; Fauser et al., 2002) ou la périphérine/rds (Kedzierski et al., 1997; Kedzierski et al., 2001).

Récemment, une mutation dans le gène Nrl (*Neural retina leucine zipper*), exprimé dans les bâtonnets des photorécepteurs, a été associée à la RPad (Bessant et al., 1999). Il a récemment été montré que l'injection de VAA-GDNF retardait la perte des photorécepteurs chez des rats transgéniques (McGee Sanftner et al., 2001). Une autre stratégie thérapeutique consiste à inhiber l'expression du gène responsable des effets délétères (Delyfer et al., 2004). Pour ce faire, des ribozymes ont été introduits par un vecteur viral chez le rat transgénique P23H (LaVail et al., 2000).

I.4.1.6- Autres pathologies impliquant une dégénérescence des photorécepteurs.

- La maladie de Stargardt est une dystrophie maculaire induisant un début de perte de la vision très tôt à l'âge adulte. Un modèle murin de cette pathologie a été généré par mutation du gène ABCR/RIM, ancré dans la membrane du saccule du photorécepteur (Molday, 1998; Pierce, 2001).

- L'héméralopie congénitale stationnaire (CSNB) se traduit par une perte précoce de la vision de nuit. Des mutations au niveau de la transducine, de la PDE, de la kinase de la rhodopsine, de l'arrestine et de la rhodopsine peuvent être responsables de cette pathologie (Pierce, 2001). Les souris knock out de la kinase de la rhodopsine (Chen et al., 1999a), knock out de l'arrestine ou de la transducine (Chen et al., 1999b; Fain and Lisman, 1999; Calvert et al., 2000; Lyubarsky et al., 2002) constituent de bons modèles animaux du CSNB ou de sa forme atténuée, la maladie d'Oguchi.

I.4.2- Dégénérescence débutant par les cônes.

Les pathologies décrites jusqu'à maintenant débutaient par une perte des bâtonnets suivie, à plus ou moins long terme, par la perte des cônes. Il existe aussi des dystrophies de cônes, où les cônes vont dégénérer tout en laissant les bâtonnets intacts (Li, 2001). La souris *cpfl1* (*cone photoreceptor function loss* ; Chang et al., 2002) représente un excellent modèle animal où on observe une perte progressive du nombre de cônes. Elle ne présente pas d'ERG de cônes alors que la réponse médiée par les bâtonnets est normale de 3 semaines à 15 mois d'âge (Chang et al., 2002).

I.5- Les mécanismes de mort cellulaire.

Les dégénérescences rétiniennes conduisent à la mort des photorécepteurs et les études basées sur les modèles animaux ont identifié l'apoptose comme mécanisme principal de dégénérescence (Chang et al., 1993; Portera-Cailliau et al., 1994; Tso et al., 1994; Remé et al., 1998a). L'apoptose est en fait un mécanisme de mort cellulaire programmée avec des caractéristiques très précises permettant la différenciation d'avec la nécrose. (Tableau 1)

APOPTOSE	NÉCROSE
- Activation du programme génétique	- Pas d'activation du prog. génétique
- Rétrécissement de la taille de la cellule	- Gonflement de la cellule
- Condensation de la chromatine	- Dommages tissulaires + vacuoles
- Organelles cytoplasmiques intactes	- Lyse cellulaire rapide
- Fragmentation de l'ADN (180-200 pb)	- Coupure aléatoire de l'ADN ("smear")
- Absence d'inflammation	- Inflammation
- Phagocytose des corps apoptotiques	- Libération du contenu cellulaire
- Peu d'atteinte des cellules voisines	- Mort des cellules voisines

Tableau 1. Caractéristiques de l'apoptose et de la nécrose dans la mort cellulaire.

L'apoptose est avant tout un mécanisme qui a lieu normalement pendant le développement pour réguler la taille des populations cellulaires. Plus de la moitié des neurones du système nerveux en développement chez les vertébrés disparaît après la naissance (Vecino et al., 2004). Actuellement, on ignore encore la relation qui existe entre la mutation des gènes intervenant lors des dégénérescences rétiniennes et le déclenchement de l'apoptose menant à la mort cellulaire. Cependant, on sait qu'il existe deux grands mécanismes d'activation de l'apoptose : l'apoptose dépendante de l'activation des caspases ou indépendante de l'activation des caspases (Wenzel et al., 2005).

I.5.1- Apoptose dépendante de l'activation des caspases (Figure 3).

L'activation des voies apoptotiques principales a lieu lors de la dégénérescence des photorécepteurs chez la souris *rd*, modèle animal de rétinite pigmentaire (Jomary et al., 2001). Les caspases font parties d'une famille de protéases avec un domaine cystéine. Ces protéines sont présentes de manière ubiquitaire et sont synthétisées sous forme de pro-enzymes inactives (ou zymogènes). Leur activation requiert le clivage de résidus apartate par d'autres caspases (Aejaz Syeed et al., 2001; Abraham and Shaham, 2004). D'une manière générale, le mécanisme apoptotique peut être divisé en 4 phases principales (Remé et al., 2000) : 1) l'induction, engendrée par une multitude de facteurs toxiques comme la lumière, les agents pro-oxydants et les neurotoxines, les agents chimiothérapeutiques, l'ischémie et les infections virales ; 2) l'initiation causée par la

protéolyse des caspases initiatrices (-2, -8, -9 et -10) et 3) la phase d'exécution, déclenchée par la protéolyse des caspases effectrices telles que les caspases -3, -6 et -7 qui terminent le programme de mort cellulaire ; 4) la phagocytose des corps apoptotiques par les cellules avoisinantes.

L'activation d'un récepteur de mort de la superfamille des récepteurs de mort comme Fas, CD95 ou TNFR-1 (*Tumor Necrosis Factor Receptor 1*) initie le processus d'apoptose. Le ligand se lie alors à son récepteur spécifique et forme un complexe trimérique récepteur-ligand (Figure 3). Plusieurs molécules de procaspase-8 sont recrutées par le complexe via la molécule adaptatrice FADD (*Fas-Associated Death Domain protein*). La procaspase-8 est clivée en caspase-8 active, qui déclenche l'activité protéolytique de la procaspase-3. La caspase-3 active qui en résulte active la caspase-6 et -7 (par clivage protéolytique de la procaspase-6, -7). Ces activations successives entraînent la fragmentation de l'ADN, des cassures dans le cytosquelette d'actine (Mashima et al., 1997; Coleman and Olson, 2002) et la mort cellulaire. Cette cascade moléculaire représente la voie la plus directe pour déclencher l'apoptose sans passer par la voie mitochondriale (Figure 3) (Hengartner, 2000; Kaufmann and Hengartner, 2001; Krantic et al., 2005).

D'autre part, la caspase-8 active peut cliver la protéine Bid, un membre pro-apoptotique de la famille de Bcl-2. La protéine Bid tronquée conduit à la libération de cytochrome-c par la mitochondrie. Ce relargage de cytochrome-c peut être inhibé par Bcl-x_L, un membre anti-apoptotique de la famille de Bcl-2. Le cytochrome-c se lie à la molécule Apaf-1 (*Apoptotic protease-activating factor-1*) qui, en présence d'ATP, subit une modification conformationnelle entraînant son oligomérisation lui permettant de se lier au domaine CARD (*Caspase Activation and Recruitment Domain*) de la procaspase-9. La liaison entre Apaf-1, la procaspase-9 et le cytochrome-c entraîne la formation d'un complexe moléculaire appelé apoptosome qui active la caspase-9. La caspase-9 entraîne l'activation de la caspase-3, -6 et -7 et aboutit à la mort cellulaire. L'activation de la procaspase-3 en caspase-3 peut être bloquée par la molécule IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*). La libération de la molécule Smac/DIABLO par la mitochondrie peut lever l'inhibition d'IAP sur la procaspase-3 et déclencher l'apoptose (Figure 3).

Une autre voie parallèle à celle-ci implique l'activation d'une MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) pro-apoptotique, la p38. En conditions oxydatives, p38 conduit à l'activation de Bid, qui à son tour déclenche la cascade apoptotique que nous venons de décrire (Zhuang et al., 2000; Jomary et al., 2001).

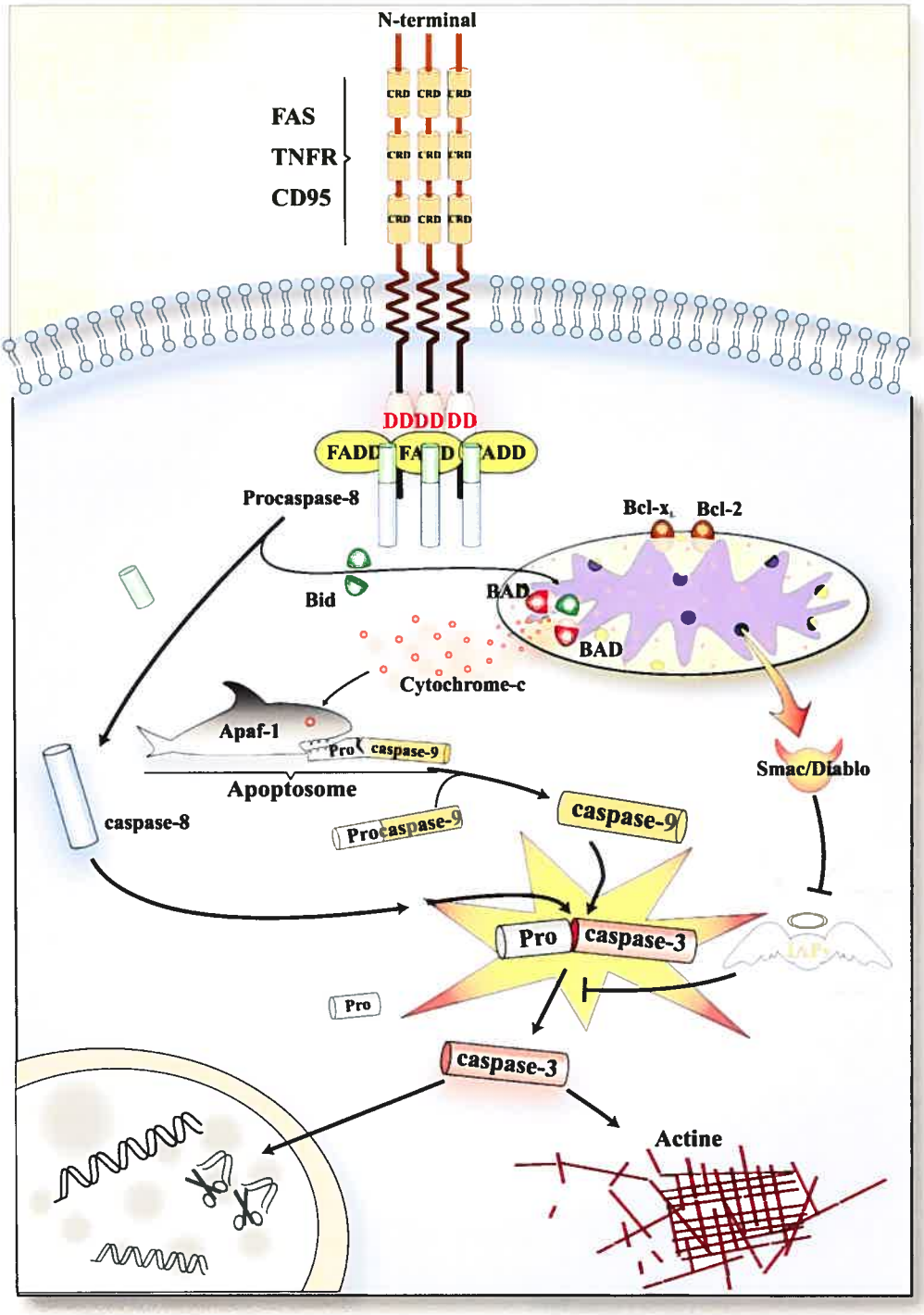


Figure 3- Cascade apoptotique.
L'activation d'un récepteur de mort entraîne la formation d'un complexe trimérique qui recrute plusieurs Procaspase-8 par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice FADD (*Fas-Associated Death Domain Receptor*) associée au domaine de mort (*Death Domain*, DD). La protéolyse de la Procaspase-8 en caspase-8 stimule l'activation de la procaspase-3 en caspase-3. La caspase-3 déclenche la fragmentation de l'ADN nucléaire et brise plusieurs substrats constitutifs comme les microfilaments d'actine du

cytosquelette qui aboutissent à la dégradation cellulaire. Une autre voie possible est le clivage, par la caspase-8 active, d'une molécule pro-apoptotique de la famille de Bcl-2 appelée Bid. En se liant à une autre protéine pro-apoptotique, Bad, enchâssée dans la membrane de la mitochondrie, Bid provoque la libération massive de cytochrome-c. Le complexe formé par l'assemblage du cytochrome-c, Apaf-1 (*Apoptotic protease-activating factor-1*) et procaspase-9 est appelé apoptosome. Cet oligomère déclenche l'activation de la caspase-9 qui, à son tour, active la caspase-3 et induit des dommages irréversibles du cytosquelette et de l'ADN nucléaire. L'étape de transformation de la procaspase-3 en caspase-3 peut être inhibée par la molécule IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) résultant en un blocage de la cascade apoptotique. La libération de la molécule Smac/DIABLO par la mitochondrie peut lever l'inhibition d'IAP sur la procaspase-3 et permettre l'apoptose. © Vincent Pernet.

Une autre cascade possible est l'activation de la protéine p53 suite à des lésions à l'ADN. L'activation de p53 déclenche à son tour l'activation de Bax, protéine pro-apototique de la famille de Bcl-2, provoquant l'activation de la voie de dégradation mitochondriale. Bcl-2 possède une activité anti-apoptotique qui protège contre la mort des cellules (Remé et al., 1998a; Hengartner, 2000; Abraham and Shaham, 2004; Wenzel et al., 2005).

I.5.2- Apoptose indépendante de l'activation des caspases.

L'activation des caspases n'est pas obligatoire pour induire l'apoptose et la fragmentation subséquente de l'ADN (Krantic et al., 2005; Wenzel et al., 2005). Cette forme de mort cellulaire a été démontrée dans certains modèles animaux de rétinite pigmentaire (Doonan et al., 2003).

L'AIF (*Apotosis Inducing Factor*), libéré par la mitochondrie, peut induire la mort cellulaire en condensant la chromatine et en clivant l'ADN en fragments de 50 kb ou plus (Susin et al., 1999). Bcl-2 peut inhiber la libération mitochondriale d'AIF mais n'a aucun effet cytoprotecteur quand AIF est présent dans le cytosol de la cellule (Susin et al., 1999). Comme l'AIF n'a pas la propriété intrinsèque de cliver l'ADN, certaines endonucléases devraient être recrutées ou activées par l'AIF (Ye et al., 2002). Un autre candidat potentiel pour l'induction de l'apoptose sans activation des caspases est l'endonucléase-G (van Loo et al., 2001). La PARP-1 (*Poly-ADP-Ribose Polymerase-1*) peut aussi être impliquée dans le déclenchement de la mort cellulaire indépendante des caspases. Des dommages oxydatifs excessifs sur l'ADN peuvent stimuler à outrance la PARP-1, normalement utilisée pour la réparation de l'ADN, et induire la mort cellulaire par épuisement énergétique de la cellule (Wenzel et al., 2005). La mort cellulaire peut aussi avoir lieu par autophagie où interviennent les vacuoles autophagiques. Ce sont alors les enzymes lysosomales, notamment les cathepsines, qui déclenchent la destruction finale de la cellule cible par engloutissement du matériel cytoplasmique (Krantic et al., 2005; Wenzel et al., 2005).

I.6- Les facteurs neurotrophiques.

Les facteurs neurotrophiques sont des protéines endogènes qui jouent un rôle dans le développement, le maintien, la survie et la différenciation des neurones (Ip and Yancopoulos, 1996). Pendant le développement, ils peuvent stimuler la prolifération et

la différenciation des neuroblastes, alors qu'ils contribuent au phénomène de plasticité adaptative dans le système nerveux mature.

Dans tous les cas, les facteurs de croissance agissent en se liant à des récepteurs tyrosine kinases spécifiques, déclenchant toute une cascade d'évènements intracellulaires menant, ultimement, à l'activation de facteurs de transcription (Segal and Greenberg, 1996). Il existe plusieurs familles de facteurs neurotrophiques : la famille des neurotrophines avec le NGF (*Nerve Growth Factor*), le BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), la NT-3 (*Neurotrophin-3*) et la NT-4/5 (*Neurotrophin-4/5*), la famille du facteur neurotrophique ciliaire (CNTF ; *Ciliary Neurotrophic Factor*) et autres cytokines (de type interleukine-6), la famille des facteurs de croissance des fibroblastes (FGF ; *Fibroblast Growth Factor*), les protéines de la famille du TGF-β (*Transforming Growth Factor-β*).

I.6.1- La famille des neurotrophines.

Les réponses biologiques déclenchées par les neurotrophines sont multiples : prolifération, différenciation et survie des neuroblastes et des neurones matures, stimulation de la croissance neuritique, changement des propriétés électrophysiologiques des neurones et altération du déterminisme cellulaire (Ip and Yancopoulos, 1996; Huang and Reichardt, 2001).

Le premier facteur neurotrophique à avoir été identifié et caractérisé est le facteur de croissance des nerfs (NGF ; *Nerve Growth Factor*). Son rôle dans la survie et le développement des neurones sympathiques a été découvert grâce aux expériences de Levi-Montalcini et Hamburger (Levi-Montalcini and Hamburger, 1951). NGF fait parti de la famille des neurotrophines avec le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF ; *Brain-Derived Neurotrophic Factor*), la neurotrophine-3 (NT-3) et la neurotrophine-4/5 (NT-4/5) (Huang and Reichardt, 2001). Les neurotrophines se lient et activent des récepteurs spécifiques à tyrosine kinases de la famille des Trk (*Tropomyosin related kinase*). NGF se lie à TrkA alors que le BDNF et NT-4/5 se lient à TrkB et la NT-3 se lie à TrkC (Bothwell, 1995; Ip and Yancopoulos, 1996). Toutes ces neurotrophines peuvent se lier au récepteur de la famille des TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*) appelé $p75^{NTR}$.

I.6.1.1- Les récepteurs Trk et leur signalisation.

La liaison du facteur neurotrophique (ex : NGF) à son récepteur TrkA entraîne une dimérisation du récepteur et stimule son activité tyrosine kinase du côté intracellulaire (Segal and Greenberg, 1996). Après autophosphorylation des tyrosines présentes sur le récepteur, les protéines adaptatrices comme Shc (*Src homologous and collagen-like*) sont recrutées et initient 2 voies importantes impliquées dans la différenciation et la survie cellulaire : la voie Ras-MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) et la voie PI3 kinase/Akt (Ip and Yancopoulos, 1996; Segal and Greenberg, 1996; Kaplan and Miller, 2000; Huang and Reichardt, 2001).

I.6.1.1.a- La voie Ras-MAPK.

La liaison consécutive des protéines adaptatrices Shc, Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) et Sos (*Son of sevenless*) au récepteur Trk entraîne l'activation de Ras, protéine associée à la surface interne de la membrane plasmique par une queue lipidique. Ceci entraîne l'activation (par phosphorylation) d'une sérine-thréonine kinase, Raf qui, à son tour, phosphoryle et active MEK (*MAPK/Erk kinase*) puis MAPK/ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*). La translocation de MAPK au noyau conduit à la régulation de nombreux facteurs de transcription. En régulant ainsi l'expression de gènes précoces tel le proto-oncogène c-fos, ou de gènes à la réponse plus tardive comme CREB (*cAMP Response Element Binding protein*), les fonctions essentielles de la voie de signalisation Ras-MAPK sont l'induction de la différenciation et de la survie neuronale (Segal and Greenberg, 1996; Kaplan and Miller, 2000). La voie MAPK est également essentielle pour la genèse neuritique (Airaksinen and Saarma, 2002).

I.6.1.1.b- La voie de la PhosphoLipase Cγ (PLCγ).

Il existe une voie indépendante de l'activation de Ras, il s'agit de l'induction de la PLCγ. La liaison entre le récepteur TrkA et la PLCγ mène à la phosphorylation de la PLCγ et à son activation. Par clivage du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, la PLCγ active conduit à la libération de deux nouvelles molécules de signalisation, une molécule lipidique de signalisation, le diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate (IP_3). Le DAG entraîne la stimulation de la protéine kinase C (PKC) alors que l'IP_3, en se liant à son récepteur localisé sur la membrane du réticulum endoplasmique,

déclenche le relargage cytoplasmique de calcium dans le cytoplasme de la cellule (Segal and Greenberg, 1996).

I.6.1.1.c- La voie PI3 kinase/Akt.

L'activation de la voie PI3 kinase/Akt (Akt est aussi connu comme étant la protéine kinase B) résulte en un mécanisme de survie cellulaire (Kaplan and Miller, 2000; Chaum, 2003). Cette voie de signalisation est activée par de nombreux facteurs de croissance (Segal and Greenberg, 1996). Par exemple, le CNTF protège les photorécepteurs suite à un stress lumineux via l'activation de la voie PI3 kinase (Ikeda et al., 2004). La voie de signalisation PI3K/Akt est aussi activée en réponse à une ischémie rétinienne de manière à protéger les cellules ganglionnaires de la rétine (Nakazawa et al., 2003). Le 17-β estradiol, connu pour avoir des effets neuroprotecteurs sur la rétine (Cao et al., 2003), inhibe l'apoptose des photorécepteurs, après exposition à un stress lumineux, en activant spécifiquement la voie PI3 kinase/Akt (Yu et al., 2004).

Des études ont démontré qu'il existait une régulation développementale de la protéine Akt. Dans le développement d'une souris normale, Akt est fortement exprimé dans les photorécepteurs à P9 puis diminue à P11. Par contre, chez les souris *rd1* (modèle de RP), l'expression d'Akt se prolonge après P11 dans les photorécepteurs et serait une tentative d'inhibition de la mort induite par la mutation chez les transgéniques (Johnson et al., 2005).

I.6.1.2- Le récepteur $p75^{NTR}$.

En plus de la liaison à leurs récepteurs spécifiques Trk, chaque neurotrophine peut se lier à un récepteur commun de plus faible affinité, p75 (Huang and Reichardt, 2001). P75 peut agir seul ou associé aux Trks. Par exemple, la liaison de p75 à TrkA augmente l'affinité de NGF pour TrkA et diminue l'attraction de TrkA pour d'autres co-récepteurs comme NT-3 (Nykjaer et al., 2005). Lorsqu'il agit seul, p75 est un récepteur ambivalent qui peut conduire à la mort mais aussi à la survie cellulaire selon les voies de signalisation activées. Quand p75 active la cascade de signalisation passant par Rac/Jun kinase/Bad/cytochrome-c/caspase-3, la mort de la cellule est provoquée alors que p75 active la survie cellulaire par la voie TRAF/NFκB (*Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor/ Nuclear Factor κB*) (Kaplan and Miller, 2000; Roux and Barker, 2002; Nykjaer et al., 2005).

I.6.1.3- Rôle du BDNF.

Le BDNF est exprimé principalement dans la couche des cellules ganglionnaires et dans la couche nucléaire interne (Seki et al., 2003). La concentration du BDNF augmente dans la rétine après l'ouverture des paupières et semble régulée par l'expérience visuelle (Pollock et al., 2001; Seki et al., 2003). Le récepteur du BDNF, TrkB, est exprimé par les cellules de la rétine interne et seulement par les cônes bleus (Di Polo et al., 2000). Le BDNF permet la croissance neuritique des cellules ganglionnaires de la rétine adulte et embryonnaire (Goldberg et al., 2002; Bonnet et al., 2004), et supporte également la survie des cellules ganglionnaires de rat blessé (Johnson et al., 1986; Mey and Thanos, 1993; Mansour-Robaey et al., 1994). Après une exposition lumineuse constante, la dégénérescence des photorécepteurs est réduite grâce à l'injection vitréenne de BDNF (LaVail et al., 1992).

I.6.2- La famille du facteur neurotrophique ciliaire (CNTF).

Le CNTF entraîne la différenciation et la survie de nombreux neurones (neurones du ganglion ciliaire, motoneurones, neurones sympatiques et sensoriels, neurones du septum, thalamus et hippocampe) et de la glie (Ip and Yancopoulos, 1996; Segal and Greenberg, 1996; Kirsch et al., 1997).

Dans une rétine de rat adulte intacte, le CNTF semble être synthétisé dans les cellules de Müller (Kirsch et al., 1997) même si le niveau endogène d'ARNm du CNTF semble très faible (Wen et al., 1998). Par contre, après une blessure l'expression de CNTF est fortement activée dans la couche nucléaire interne de la rétine (Wen et al., 1998). L'expression du récepteur du CNTF, CNTFRα, a été localisée dans la couche plexiforme externe et dans toutes les couches internes d'une rétine de rat adulte intacte (Beltran et al., 2005). Certaines études ont également montré que les segments externes des photorécepteurs exprimaient le CNTFRα (Valter et al., 2003). La production de CNTF par les cellules de Müller a donc le potentiel de stimuler les différents types de neurones rétiniens qui portent le récepteur CNTFRα.

Dans la même famille que le CNTF se trouvent d'autres cytokines telles que LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) ou l'interleukine-6 (IL-6). De par la structure très similaire de leurs récepteurs, CNTF et LIF ont des effets biologiques analogues dans le système nerveux central (Segal and Greenberg, 1996). Leur récepteur est constitué de sous-unités transmembranaires sans domaine tyrosine kinase: gp130, LIFRβ et une

sous-unité α. Le récepteur de LIFR est uniquement composé par les deux sous-unités gp130 et LIFRβ. La présence de la sous-unité α confère la spécificité de la liaison du récepteur avec le CNTF (Ip and Yancopoulos, 1996). La liaison du facteur à son récepteur entraîne la dimérisation des deux sous-unités et mène à l'activation de Jak 1/2 (*Janus kinase*) qui, à leur tour, phosphorylent et activent deux membres de la famille des facteurs de transcription STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*), STAT1 et/ou STAT3. Ces protéines phosphorylées sont alors rapidement transportées au noyau où elles régulent la transcription de certains gènes (Ip and Yancopoulos, 1996; Segal and Greenberg, 1996; Wang et al., 2002). CNTF module également la voie PI3 kinase pour protéger les photorécepteurs *in vitro* et *in vivo* (Ikeda et al., 2004).

Des études montrent des effets contraires du CNTF sur la différenciation des progéniteurs cellulaires. En effet, CNTF a un effet positif sur la différenciation des bâtonnets dans la rétine de poulet (Fuhrmann et al., 1995; Kirsch et al., 1996), alors que c'est un régulateur négatif sur la différenciation des bâtonnets dans la rétine de rongeurs, *in vitro* (Ezzeddine et al., 1997; Kirsch et al., 1998; Schulz-Key et al., 2002). Cet effet inhibiteur de la différenciation des bâtonnets a aussi été démontré avec le facteur LIF (Cepko et al., 1996; Neophytou et al., 1997). L'activation de STAT3, suite à un traitement avec le CNTF, supprime la différenciation cellulaire en bâtonnets (Zhang et al., 2004b). Récemment, il a été montré que, chez la souris, CNTF induisait la différenciation des cellules progénitrices en cellules exprimant des marqueurs des cellules bipolaires et gliales (Zahir et al., 2005).

I.6.3- La famille des facteurs de croissance des fibroblastes (FGFs).

Une vingtaine de molécules FGFs ainsi que 4 récepteurs (FGFR) ont actuellement été identifiés (Hicks, 1998). La liaison du FGF à son récepteur nécessite la présence de l'héparan-sulfate protéoglycane. Les FGF interviennent, pendant le développement, dans la régulation de la prolifération des cellules du mésoderme et du neuroectoderme ainsi que dans la différenciation des neurones de l'hippocampe, du cervelet et du ganglion ciliaire. Ils jouent également un rôle sur la survie des neurones de la rétine et des motoneurones.

Dans la rétine de rat adulte, les cellules de la couche nucléaire interne et externe et la couche des cellules ganglionnaires expriment le FGF-2 (Sapieha et al., 2003). Son récepteur spécifique, FGFR-1 (*Fibroblast Growth Factor Receptor-1*), a été principalement détecté dans la couche des cellules ganglionnaires et dans la couche

nucléaire externe de la rétine adulte (Sapieha et al., 2003). L'injection intravitréenne de FGF-2 dans une rétine de rat adulte avant l'exposition à la lumière entraîne une protection des photorécepteurs mais s'accompagne d'une forte réaction immunitaire (LaVail et al., 1992).

I.6.4- Les protéines de la famille du TGF-β (*Transforming Growth Factor-β*).

Quatre protéines appartiennent à la famille du TGF-β : le GDNF (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*) , la neurturine, l'artémine et la perséphine. Leurs récepteurs sont constitués de 2 parties : un récepteur transmembranaire appelé c-ret, commun aux 4 protéines, et une sous-unité liée à la membrane et spécifique pour chaque ligand : GFRα1 pour GDNF, GFRα2 pour la neurturine, GFRα3 pour l'artémine et GFRα4 pour la perséphine (Baloh et al., 2000; pour revue, voir Airaksinen and Saarma, 2002). Suite à la liaison du ligand avec son récepteur spécifique, les 2 voies principales de signalisation impliquées dans la survie neuronale, MAPK et PI3K/Akt, peuvent être activées (Kaplan and Miller, 2000; Airaksinen and Saarma, 2002).

Chez le poulet, le GDNF est présent dans toutes les couches cellulaires de la rétine, les cellules amacrines et horizontales expriment le GFRα1 alors que les photorécepteurs, les cellules ganglionnaires et les cellules amacrines expriment le GFRα2 (Karlsson et al., 2002). Pendant le développement rétinien, des études *in vitro* ont démontré, chez le poulet, que le GDNF est un facteur mitogénique pour les bâtonnets à des stades précoces du développement, qu'il influence le début de leur différenciation et soutient la survie des photorécepteurs à des stades plus tardifs (Rothermel and Layer, 2003). Lors du développement, la survie des motoneurones et des neurones du système nerveux périphérique est dépendante du GDNF (Baloh et al., 2000).

I.7- La photodégénérescence de la rétine.

I.7.1- Lumière et processus dégénératifs réversibles.

I.7.1.1- La photostasie: Mécanismes d'adaptation suite à une exposition lumineuse.

La photostasie est un mécanisme adaptatif de la rétine qui entraîne des changements graduels dans la structure rétinienne de telle sorte que la sensibilité de la rétine est lentement modifiée pour permettre l'absorption d'un nombre constant de

photons par jour, quelque soit l'intensité lumineuse de l'environnement (Penn and Williams, 1986; Fulton et al., 1998; Penn, 1998; Williams, 1998).

À des doses lumineuses n'excédant pas ~1 000 lux (Remé et al., 1998b), les segments externes des photorécepteurs (SEP) s'adaptent pour éviter les dommages cellulaires. Dans un environnement lumineux intense, la longueur des bâtonnets et la concentration de rhodopsine dans chacun des disques des segments externes sont réduites pour compenser l'augmentation du flux photonique (Williams, 1998). Ainsi, la quantité de photons absorbés par œil et par jour (10^{16} photons) et la quantité de photons absorbés par bâtonnets par seconde (~13 000 photons) restent les mêmes dans des environnements lumineux d'intensité variable (Penn, 1998; Williams, 1998). Par exemple, l'intensité lumineuse influence le processus de renouvellement des disques externes pour réguler la longueur des segments externes. En temps normal, le phénomène de renouvellement des segments externes décrit par Young (Young, 1967) contrôle la longueur des segments externes de bâtonnets et les concentrations en rhodopsine dans leurs disques. L'équilibre entre l'élimination ("disk shedding") et le remplacement des disques permet de maintenir une longueur constante des segments externes de bâtonnets. Il faut une dizaine de jours pour renouveler complètement un segment externe chez le rat. Les disques sont synthétisés du côté basal des segments et sont progressivement déplacés par l'ajout de nouveaux disques vers les cellules de l'épithélium pigmentaire qui phagocytent les disques du côté apical (Young, 1967, 1976). La dynamique de renouvellement des segments externes peut donc s'adapter à l'intensité lumineuse.

I.7.1.2- Susceptibilité des photorécepteurs et historique lumineux ("light history").

La susceptibilité des photorécepteurs est profondément influencée par les changements d'illumination dans l'environnement pendant la période expérimentale qui est aussi appelé "historique lumineux". Des animaux élevés en lumière cyclique faible ou à l'obscurité présentent plus de susceptibilité aux dommages rétiniens lors d'une exposition lumineuse intense. Au contraire, les rétines de rongeurs élevés dans des conditions lumineuses cycliques fortes s'adaptent et deviennent moins susceptibles lorsqu'elles sont exposées dans un environnement lumineux intense (Penn et al., 1987; Li et al., 2001; Kaldi et al., 2003). Par exemple, une exposition préalable de la rétine à une intensité de 800 lux protège les photorécepteurs des dommages lumineux induits ultérieurement par une seconde exposition à 1 500 lux (Penn et al., 1987; Li et al.,

2001). Cette adaptation a lieu à plusieurs niveaux : diminution de la longueur des SEP (Penn and Anderson, 1987; Penn et al., 1989; Penn et al., 1992; Penn, 1998) ainsi que des niveaux d'acides gras polyinsaturés, tel que le DHA (Acide DocosaHexènoïque) (Penn and Anderson, 1987; Penn et al., 1989; Penn, 1998) et augmentation des capacités antioxydantes, notamment augmentation des concentrations de glutathione peroxydase et des vitamines E et C (Penn et al., 1987). La concentration en rhodopsine est aussi fortement influencée par l'environnement lumineux (Battelle and LaVail, 1978; Penn et al., 1989; Fulton et al., 1998; Organisciak et al., 1998; Penn, 1998). Les photorécepteurs sont donc capables d'une certaine plasticité en fonction de l'environnement lumineux dans lequel l'animal est élevé (Penn et al., 1989).

Lorsque la quantité de photons captés par les photorécepteurs est trop grande et que les dommages engendrés aux bâtonnets ne sont plus réparables, les photorécepteurs dégénèrent et meurent par apoptose (Noell et al., 1966; Remé et al., 1998b; Grimm et al., 2000a). Une exposition lumineuse d'intensité comprise entre 200 et 1 000 lux conduit à des processus dégénératifs réversibles, alors qu'une exposition à des intensités >1 000 lux déclenche l'apoptose du photorécepteur (Remé et al., 1998b).

I.7.2- Lumière et dommages lumineux irréversibles.

La rétine peut être victime de photodégénérescence après exposition à un environnement lumineux intense (>1 000 lux). En 1966, Noell a démontré que l'étendue des dommages lumineux semblait correspondre au spectre d'absorption de la rhodopsine (Noell et al., 1966). Les premières études traitant des effets néfastes de la lumière sur la rétine ont rapporté des altérations électrophysiologiques (Gorn and Kuwabara, 1967) et des modifications ultrastructurelles observables en microscopie électronique (Kuwabara and Gorn, 1968). L'abondance naturelle d'acides gras poly-insaturés dans les membranes des SEP et l'apport important d'oxygène par la circulation choroïdienne exposent particulièrement les photorécepteurs au phénomène de peroxydation lipidique et au stress oxydatif tel que celui induit par la lumière (Organisciak and Winkler, 1994; Hanna et al., 1997; Boulton et al., 2001; Demontis et al., 2002).

I.7.2.1- Description des dommages lumineux (Figure 4).

Les effets délétères d'une exposition lumineuse intense sur la rétine ont été particulièrement bien étudiés chez des animaux adultes (Noell et al., 1966; O'Steen et

al., 1974; Penn and Thum, 1987; Organisciak et al., 1989; Penn et al., 1989; Organisciak and Winkler, 1994; Li et al., 2001; Marc et al., 2003; Organisciak et al., 2003; Wenzel et al., 2005). Quatre facteurs conditionnent la sévérité des dommages rétiniens : la durée de l'exposition, l'intensité et la longueur d'onde de la lumière utilisée ainsi que le mode d'exposition (constante ou cyclique). Bien que les rétinopathies à la lumière soient générées par différentes méthodes d'exposition, la dégénérescence cellulaire qui en résulte suit toujours le même patron (Wenzel et al., 2005). Les dommages lumineux passent par l'excitation de la rhodopsine au niveau des segments externes des photorécepteurs, lieu naturel de transduction du signal lumineux (Noell et al., 1966). Les premiers signes de dégénérescence sont visibles en microscopie électronique dès la première heure d'exposition (Kuwabara and Gorn, 1968; Grignolo et al., 1969; O'Steen et al., 1972). La désorganisation de la structure lamellaire des saccules survient à l'extrémité la plus distale du segment externe, les disques fusionnent et forment des vacuoles et des tubules (Figure 4, (2, 3)). Les segments externes deviennent ronds et les segments internes s'atrophient et présentent des vacuoles autophagiques pour les expositions les plus fortes (Figure 4, (4)) (Remé et al., 1999; Remé, 2005). Dans la CNE, les noyaux des photorécepteurs deviennent pyknotiques par la condensation de la chromatine (Figure 4, (2 à 4)). Ces modifications nucléaires coïncident avec l'apparition d'anomalies dans l'EP telles qu'une augmentation du nombre de lysosomes. Dans les cas les plus sévères, les photorécepteurs disparaissent complètement (Figure 4, (5)), alors que les couches internes, CNI, CPI, CCG, ne semblent pas affectées (Kuwabara and Gorn, 1968; O'Steen et al., 1972; Rapp, 1995; Zhang et al., 2004a; Wenzel et al., 2005). Ces modifications structurelles s'accompagnent d'altérations fonctionnelles : chez des rats âgés de 8 semaines, un jour d'exposition lumineuse à 1 700 lux résulte en une abolition complète de l'ERG et une diminution d'~40% de l'épaisseur de la CNE (Penn et al., 1987; Penn et al., 1989; Li et al., 2001, , 2003). L'étendue des dommages est très étroitement liée à la dose de lumière reçue (Hafezi et al., 1997).

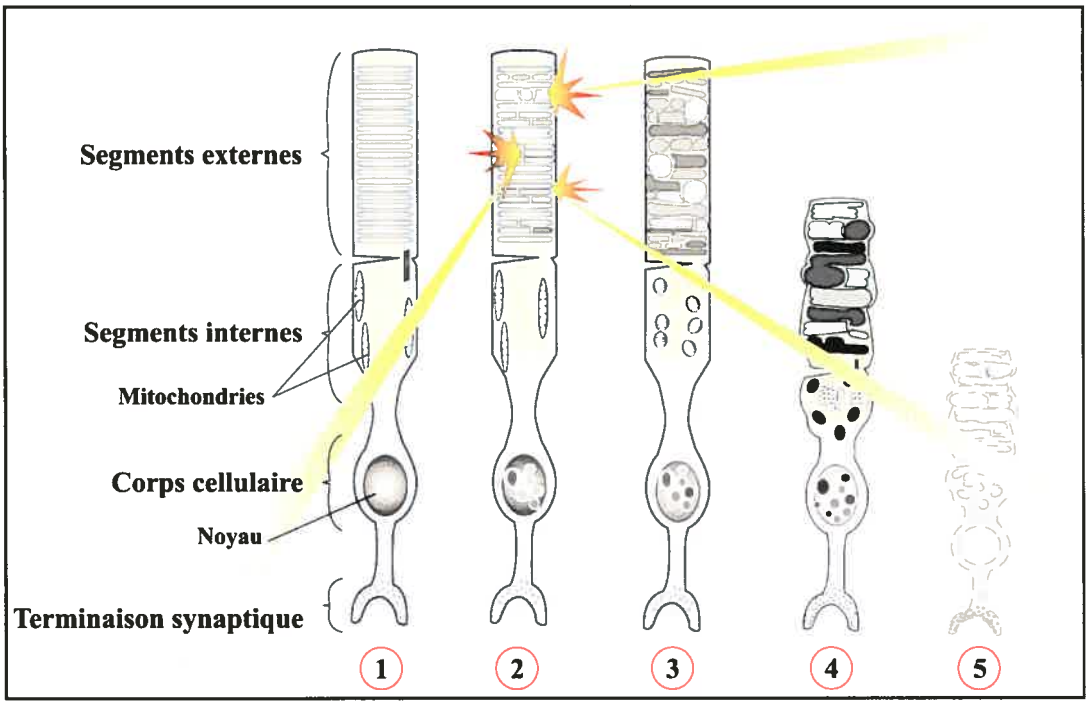


Figure 4- Mécanismes de dégénérescence des photorécepteurs par la lumière.
(**1**) Dans une rétine de rat adulte intacte, les photorécepteurs sont constitués d'un segment externe allongé contenant un empilement de saccules remplis de pigment visuel appelé rhodopsine, et d'un segment interne plus court et riche en mitochondries qui est responsable de l'activité métabolique du photorécepteur. Ces deux compartiments sont séparés par un cil de connexion. (**2**) Suite à une exposition à la lumière, la structure lamellaire des disques les plus distaux du segment externe se désorganise et les saccules fusionnent entre eux. Dans le corps cellulaire, le noyau présente par endroits des signes de condensation de la chromatine. (**3**) La dégénérescence se poursuit par l'augmentation du nombre de vacuoles et de tubules dans le segment externe. Des signes de dégénérescence sont également visibles dans le segment interne où les mitochondries s'arrondissent et deviennent plus petites et nombreuses. (**4**) La taille du photorécepteur est fortement réduite par atrophie des segments externe et interne. Les mitochondries se transforment en corps apoptotiques (noir) et en vacuoles autophagiques (blanc) dans le segment interne. Le corps cellulaire devient pyknotique. (**5**) Dans les cas les plus sévères de dégénérescence, les photorécepteurs disparaissent par apoptose et seules les couches internes de la rétine subsistent. © Vincent Pernet.

Néanmoins, très peu d'études ont examiné les processus pathophysiologiques des dommages rétiniens induits chez les nouveau-nés. Ceux qui s'y sont intéressés ont rapporté des altérations rétiniennes mineures après l'exposition lumineuse (O'Steen et al., 1974; Kuwabara and Funahashi, 1976; Malik et al., 1986). Selon les travaux de Malik, les ratons exposés à une lumière intense avant l'âge postnatal de 20 jours (P20) présentent une réponse électrophysiologique normale alors que cette réponse est significativement diminuée, voire même abolie, lorsque l'exposition lumineuse a lieu après P20. De même, les travaux de Kuwabara démontrent des changements ultrastructuraux subtils sur des rétines de ratons exposés à une lumière constante entre P7 et P21 (Kuwabara and Funahashi, 1976). Ces données suggèrent que l'animal postnatal est moins sensible aux dommages lumineux que l'animal adulte. Cependant, ces études antérieures ont utilisé des intensités relativement faibles pour provoquer des dommages avant l'ouverture des paupières et ont permis la réparation de certains dommages par un conditionnement en milieu obscur après l'exposition lumineuse. Par conséquent, les dommages lumineux chez l'animal juvénile demeurent mal connus et requièrent d'autres investigations électrophysiologiques et histologiques pour définir une hypothétique période de résistance postnatale.

La compréhension du développement des dommages rétiniens grâce aux modèles animaux pourrait permettre de mieux appréhender le rôle de la lumière dans le développement de la rétinopathie du prématuré. En effet, dans les unités de néonatalogie les prématurés sont régulièrement soumis à différentes sources lumineuses comme avec la photothérapie (une unité de photothérapie consiste en 8 à 10 tubes fluorescents, placés au-dessus de l'incubateur, qui délivrent ~3 000 à 4 000 lux de lumière). Ils peuvent être exposés sous des lampes chauffantes (~3 000 lux) pour maintenir leur température corporelle constante, ou exposés à un ophtalmoscope indirect pour des examens visuels quotidiens (exposition répétée de 2 minutes à ~20 000 lux pendant 3 heures). Dans ces circonstances, des précautions sont prises en cachant les yeux des prématurés mais les protections mises peuvent se révéler inadéquates (Glass, 1988, 1990). Des études ont montré que la lumière ambiante pouvait jouer un rôle dans l'induction de la pathologie puisqu'une diminution de l'intensité lumineuse entraînait une diminution dans l'incidence de la RDP, spécialement chez les enfants pesant moins de 1 000 g à la naissance (Glass, 1988, 1990). Chez le prématuré, la lumière ne serait pas nécessaire au développement de la RDP, mais elle pourrait exacerber les effets de

l'oxygène et augmenter l'incidence de la pathologie. De plus, la formation de radicaux libres et les lésions tissulaires seraient fortement augmentées lorsqu'il existe une combinaison oxygène/lumière (Glass, 1990). Dans les modèles animaux, la lumière n'est pas un facteur essentiel au développement de la RDP chez le chaton (Kremer et al., 1992). Cependant, chez le raton, des formes plus sévères de rétinopathie avec des hémorragies, des atteintes vasculaires plus importantes et des dommages sévères aux photorécepteurs ont été induites en combinant hyperoxie et conditions lumineuses intenses (Ricci et al., 1990).

Plusieurs méthodes d'analyse permettent de connaître l'étendue des dommages après une exposition à la lumière dans un modèle animal (Organisciak and Winkler, 1994). La morphologie de la rétine et les analyses morphométriques (principalement des mesures de l'épaisseur de la CNE) sont les premiers indicateurs de l'existence de dommages induits par la lumière. L'étude électrorétinographique est un des meilleurs moyens de quantifier l'étendue des dommages. En effet, l'amplitude de l'onde-a dépend principalement du nombre de photorécepteurs stimulés par la lumière et de l'intégrité des segments externes et internes des photorécepteurs, alors que l'onde-b reflète l'efficacité de la transmission synaptique entre les cellules visuelles (photorécepteurs) et les neurones de second ordre dans la CPE (Organisciak and Winkler, 1994). On peut également évaluer la sévérité des dommages lumineux en effectuant des dosages biochimiques de la rhodopsine (Organisciak and Winkler, 1994).

I.7.2.2- Classification des dommages lumineux.

Noell (Noell, 1980b, 1980a) classifia les dommages rétiniens lumineux en fonction des manifestations primaires et secondaires des lésions. Les lésions primaires résultent de l'action directe de la lumière sur les molécules photosensibles des cellules endommagées. Les lésions secondaires, subséquentes aux primaires, conduisent à des dommages dans les mêmes cellules ou dans d'autres cellules comme celles de l'EP.

- Les dommages de type I sont caractérisés par une perte massive des cellules visuelles et une perte des cellules adjacentes de l'EP suite à une activation excessive (ou "bleaching") de la rhodopsine sur une courte période de temps. Ce type de lésion est aggravé par l'hyperthermie, le conditionnement des animaux à l'obscurité et par des expositions lumineuses intermittentes.

- Les dommages de type II sont caractérisés par une très grande perte des cellules visuelles avec peu ou pas de dommages dans l'EP. Ces lésions se rencontrent chez les rats normaux jeunes et les rats adultes élevés dans des conditions lumineuses cycliques faibles. De longues expositions et des intensités faibles de lumière conduisent aux dommages de type II.

I.7.2.3- Dégradation de l'épithélium pigmentaire.

Plusieurs études arrivent à des conclusions contradictoires quant à savoir quelles cellules meurent en premier entre les photorécepteurs et les cellules de l'EP. Pour certains, les photorécepteurs sont les premières victimes de l'apoptose induite par la lumière, suivies des cellules de l'EP. Ce processus peut s'expliquer par le fait que les cellules de l'EP sont structurellement et fonctionnellement connectées aux photorécepteurs. Si les photorécepteurs disparaissent, la perte de signalisation cellule-cellule entraîne une mort des cellules de l'EP. L'exposition lumineuse augmente le détachement des disques des SEP, ce qui entraîne l'accumulation de phagosomes dans l'EP et déclenche des signaux cellulaires pro-apoptotiques de l'EP (Hafezi et al., 1997). La présence de l'EP semble être absolument nécessaire au maintien des photorécepteurs (Kuwabara, 1970). Pour d'autres, ce sont les cellules de l'EP qui disparaissent en premier dans les dommages de type I (Noell, 1980b, 1980a). Une étude électrophysiologique faite chez des rats pigmentés montre que l'EP est plus susceptible aux dommages par une lumière infrarouge de longueur d'onde équivalente à 300-500 nm que la rétine neurale (Masuda and Watanabe, 2000).

I.7.2.4- Dommages photochimiques et modifications biochimiques.

En plus des modifications fonctionnelles (diminution ou abolition de l'ERG) et structurelles (diminution de l'épaisseur de la CNE), des perturbations métaboliques interviennent puisque les niveaux de certains acides aminés et de leurs dérivés (GABA, glutamate, glycine, aspartate et glutamine) augmentent ou diminuent (taurine) (Oraedu et al., 1980).

Les lipides membranaires des bâtonnets sont affectés par la lumière intense qui cause une réponse oxydative (Organisciak et al., 1989; De La Paz and Anderson, 1992; Demontis et al., 2002). Chez le rat, les membranes des segments externes des photorécepteurs sont extrêmement riches en acides gras polyinsaturés qui représentent plus de 63% des acides gras totaux (Stone et al., 1979). L'acide gras le plus abondant

est l'acide docosahexaènoïque (DHA, 22:6ω3), suivi de l'acide stéarique (18:0) et de l'acide palmitique (16:0), représentant respectivement 46,2%, 22,5% et 8,2% des acides gras totaux (Stone et al., 1979). Les niveaux de certains acides gras contenus dans les membranes des SEP sont particulièrement affectés par l'exposition lumineuse, tel que le DHA. Une exposition lumineuse constante de 3 jours à 800 lux suffit à réduire de plus de 50% le taux de DHA rétinien chez des rats albinos adultes (Li et al., 2001).

Les photorécepteurs n'ont pas tous une susceptibilité équivalente face aux dommages lumineux et des études ont précédemment démontré que les bâtonnets étaient plus sensibles que les cônes (Cicerone, 1976; LaVail, 1976; Birch and Jacobs, 1980; Lee et al., 1990). Cette résistance des cônes par rapport aux bâtonnets a été expliquée par des différences métaboliques intrinsèques. La surface membranaire des bâtonnets est plus grande que celle des cônes, engendrant une plus grande quantité de lipides et donc une peroxydation lipidique plus sévère après exposition à la lumière. D'autre part, les dommages lumineux sont médiés par la rhodopsine contenue dans les bâtonnets (Noell et al., 1966). Ceci permettrait donc d'expliquer la plus grande susceptibilité des bâtonnets par rapport aux cônes lors d'un stress lumineux. Après une exposition à la lumière intense, la dégénérescence secondaire des cônes pourrait être induite par un relargage massif de neurotransmetteurs et/ou d'ions potentiellement toxiques produits par les bâtonnets qui meurent en premier (Farber et al., 1994). Au début de l'exposition lumineuse, des facteurs neurotrophiques sécrétés par les bâtonnets pourraient permettre la survie des cônes (Raff, 1992; Farber et al., 1994). Par exemple, le facteur de viabilité des cônes dérivé des bâtonnets, RdCVF (Rod-derived Cone Viability Factor) a été identifié dans un modèle murin de rétinite pigmentaire (Mohand-Said et al., 1998; Leveillard et al., 2004).

D'autre part, il existe des différences régionales dans la susceptibilité de la rétine face au stress lumineux (Noell et al., 1966; Kuwabara and Gorn, 1968; Rapp and Williams, 1980; Rapp et al., 1985; LaVail et al., 1997; Gordon et al., 2002). La rétine supérieure est la plus endommagée dans la région s'étendant entre 0,5 et 2 mm à partir de la tête du nerf optique (Rapp and Williams, 1980; Rapp et al., 1985; Vaughan et al., 2002). Rapp et Williams (1980) ont rapporté une diminution de 40% dans l'épaisseur de la CNE dans la partie supérieure de rétines d'animaux albinos exposés à des lumières de fortes intensités. Des différences morphologiques et biochimiques permettraient d'expliquer ce phénomène. Dans la rétine supérieure, les photorécepteurs sont plus

longs, leur contenu en rhodopsine (47% de plus) et en taurine (18% de plus) est plus élevé que dans la rétine inférieure (Rapp et al., 1985). De plus, la densité des cônes est plus faible dans l'hémisphère supérieur que dans l'hémisphère inférieur (Szél et al., 1992). Comme les cônes sont plus résistants que les bâtonnets aux dommages lumineux, la densité relativement plus faible des cônes dans la rétine supérieure permettrait d'expliquer pourquoi cet hémisphère est le plus atteint.

I.7.2.5- Facteurs influençant la sévérité des dommages à la lumière.

L'étendue et la sévérité des dommages lumineux dépendent principalement de la durée d'exposition (lumière constante ou cyclique et durée) et de l'intensité de la lumière utilisée. Mais les dommages obtenus lors d'expositions lumineuses peuvent être modulés par de nombreux facteurs comme les antécédents lumineux de l'animal (ou "light history"), le maintien ou non du rythme circadien, la génétique, la pigmentation, l'âge et le sexe, la température.

I.7.2.5.a- Durée d'exposition et intensité lumineuse.

La sévérité des dommages engendrés dépend de la durée d'exposition et de l'intensité de la source lumineuse (Noell et al., 1966). L'exposition de rats albinos adultes à une lumière fluorescente verte intense entraîne deux types de dommages rétiniens en fonction de la durée d'exposition : une exposition intermittente engendre des dommages modérés où l'EP reste intact et la CPE devient plus fine que chez les animaux non-exposés, alors que des dommages plus sévères (apparition de profils nécrotiques dans l'EP et perte des noyaux plus importante dans la CPE) apparaissent suite à une exposition continue. De plus, pour des expositions lumineuses cycliques, la durée de la photopériode joue un rôle sur la sévérité des lésions rétiniennes. Ainsi, plus la durée de la photopériode est longue et plus les dommages rétiniens sont sévères. (Bons et al., 1977). La longueur d'onde de la lumière joue également un rôle dans la sévérité des lésions. De manière générale, le spectre d'action de la lumière induisant la mort des photorécepteurs correspond au spectre d'absorption de la rhodopsine (Noell et al., 1966; Gorn and Kuwabara, 1967; Williams and Howell, 1983). Par exemple, une exposition avec une lumière dont le spectre d'absorption se situe dans les longueurs d'onde courtes de forte énergie (UV, entre 380 et 430 nm) induit des dommages au niveau des photorécepteurs avec pyknocytose des noyaux de la CNE, alors qu'une exposition avec une lumière dont le spectre d'absorption se situe dans le bleu-vert (470-

550 nm) entraîne des dommages aussi bien dans l'épithélium pigmentaire que dans les photorécepteurs (Rapp and Smith, 1992; Organisciak and Winkler, 1994; Gorgels and van Norren, 1995). Néanmoins, il a été montré que, chez des rats albinos, l'exposition à une lumière bleue (spectre d'absorption d'~400 nm) entraînait des cassures dans les brins d'ADN des photorécepteurs, mais la lumière verte (spectre d'absorption d'~550 nm) n'induisait aucun dommage dans les photorécepteurs (Grimm et al., 2001).

I.7.2.5.b- L'historique lumineux ("Light history").

Les dommages rétiniens sont fortement influencés par l'environnement lumineux dans lequel l'animal a grandi. Cette partie a été précédemment développée (voir paragraphe VII.1.2).

I.7.2.5.c- Rythme circadien.

La sévérité des dommages à la lumière est influencée par le rythme circadien. Par exemple, une exposition brève sous lumière verte intense est plus dommageable pour les photorécepteurs lorsqu'elle se produit à 1h00 du matin (période d'activité pour les rongeurs) que lorsqu'elle a lieu pendant la journée. Une des explications à ce phénomène pourrait résider dans les cycles de sécrétion de certaines hormones, comme la corticostérone, qui est abondamment libérée en fin de journée. Les rétines de rats semblent moins susceptibles aux dommages lumineux quand les niveaux plasmatiques de corticostérone sont élevés (Vaughan et al., 2002).

I.7.2.5.d- Génétique.

Les facteurs génétiques peuvent être considérés comme un déterminant important dans la sévérité des dommages lumineux. Les souris issues d'un croisement entre un parent très résistant aux dommages lumineux et un autre parent très sensible aux dommages lumineux présentent un phénotype hétérozygote dont la sensibilité est intermédiaire (LaVail et al., 1987).

I.7.2.5.e- Pigmentation.

La pigmentation oculaire est connue pour avoir des effets bénéfiques sur la rétine : la mélanine pourrait protéger la rétine des dommages lumineux en absorbant la lumière et en capturant les radicaux libres et oxygénés (McGinness and Proctor, 1973; Sarna, 1992), ainsi qu'en dissipant l'énergie lumineuse emmagasinée en chaleur

(LaVail, 1980; Boulton et al., 2001). Cependant, le rôle protecteur de la mélanine est controversé puisqu'elle pourrait également agir comme un chromophore et créer des radicaux libres (Sarna, 1992; Wiechmann and O'Steen, 1992). Mais, il semblerait que cet effet toxique ne se manifeste que pour des intensités lumineuses élevées (Proctor et al., 1974; Sarna, 1992).

Différentes études montrent que la pigmentation des yeux offre une protection aux photorécepteurs suite à des expositions lumineuses constantes d'intensités faibles ou modérées. La présence de mélanosomes (vésicules de mélanine) dans l'EP et la choroïde semblerait ralentir la destruction des photorécepteurs (LaVail, 1980). Il faudrait ~8 fois plus de temps pour engendrer chez des animaux pigmentés des dommages similaires aux albinos (Reuter and Hobbelen, 1977; LaVail, 1980). Fulton et ses collaborateurs ont démontré que l'exposition de rats à une intensité lumineuse de 200 lux ne diminue pas la concentration en rhodopsine chez les animaux pigmentés adultes, alors que cette concentration est réduite de 39% quand l'exposition a lieu chez un rat albinos adulte (Fulton et al., 1998). Néanmoins, même si la rétine de rats pigmentés exposés à la lumière présente peu d'atteintes morphologiques, certaines altérations biochimiques des acides aminés semblables à celles observées dans les rétines de rats albinos apparaissent (Wasowicz et al., 2002).

I.7.2.5.f- Âge et sexe.

La sévérité des dommages lumineux est également influencée par l'âge des animaux au moment de l'exposition, puisque les dommages sont plus sévères chez des animaux plus vieux. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la rétine des animaux âgés a atteint un stade où les ajustements biochimiques ne sont plus possibles pour protéger les cellules des dommages lumineux (Semple-Rowland and Dawson, 1987).
Le sexe ne semble pas jouer de rôle déterminant (O'Steen et al., 1974; Organisciak and Winkler, 1994; Organisciak et al., 1998).

I.7.2.5.g- Température corporelle.

La sévérité et la rapidité des dommages provoqués par la lumière sont accélérées par une élévation de température corporelle (Noell et al., 1966). En effet, l'hyperthermie pendant l'exposition lumineuse accélère de 18 à 24 fois l'apparition des lésions rétiniennes chez les animaux exposés (Organisciak et al., 1995).

I.7.3- Les modèles animaux utilisés pour l'exposition à la lumière.

Les rétines des animaux nocturnes, comme les rats et les souris, ont l'avantage d'être facilement endommagées après une exposition lumineuse. Les animaux peuvent être pigmentés ou albinos et de nombreux animaux transgéniques tels que les rats S334ter et P23H (Vaughan et al., 2003), les souris $rho^{-/-}$ et $Rpe65^{-/-}$(Grimm et al., 2000b), les souris $rho\ kinase^{-/-}$ (Chen et al., 1999a), les souris $arrestine^{-/-}$ (Xu et al., 1997; Roca et al., 2004) ou les souris $Nrl^{-/-}$ (Daniele et al., 2005) permettent de raffiner les études. Il faut toutefois faire attention aux conditions d'intensité lumineuse, pendant la période d'élevage, qui peuvent influencer la sévérité des dommages rétiniens (Organisciak et al., 2003).

Les animaux diurnes, comme les cochons, les oiseaux, les écureuils et les singes, sont généralement utilisés dans des modèles de lésions de rétines "pures-cônes" (écureuils) ou "pures-bâtonnets". Seuls quelques animaux transgéniques existent (Organisciak et al., 2003).

D'autres modèles animaux, tels que les poissons, amphibiens et insectes, existent mais les rétines sont parfois très différentes des rétines humaines ce qui rend les extrapolations compliquées. Un des modèles les plus étudiés actuellement est la rétine de poisson zébré (*Danio rerio*), chez qui les bâtonnets et les cônes sont répartis en deux couches bien distinctes (Vihtelic et al., 2006). Après exposition à la lumière constante, les rétines de poissons exposés à la lumière présentent une mort des photorécepteurs, suivie par la régénération de cônes et de bâtonnets à partir d'une population de cellules en migration provenant de la couche nucléaire interne (Vihtelic and Hyde, 2000).

Chez le nouveau-né humain, la paupière coupe 62% de l'intensité de la lumière blanche qui est transmise à la rétine (Robinson et al., 1991). Chez le rat albinos adulte, il a été montré que la paupière engendrait un effet filtre et diminuait d'~50% l'intensité de la lumière reçue par les photorécepteurs (Williams, Henrich & Reiser, 1998). Dans notre modèle expérimental, l'intensité de lumière que nous utilisons est de 10 000 lux, donc nous estimons à ~3 800-5 000 lux l'intensité lumineuse reçue par les photorécepteurs. Un environnement lumineux de 1 000 lux est suffisant pour causer des dommages rétiniens sévères chez des rats albinos adultes (Semple-Rowland and Dawson, 1987). Nous avons également choisi d'utiliser une exposition lumineuse cyclique (12 heures lumière: 12 heures obscurité) de manière à respecter le rythme

circadien normal des animaux (Ricci et al., 1990; Organisciak et al., 2000; Vaughan et al., 2002).

I.7.4- Protection des photorécepteurs après une exposition à la lumière.

I.7.4.1- Mécanismes de réparation naturels *in vivo*.

Après une exposition lumineuse intense, l'ADN polymérase-β est surexprimée dans les photorécepteurs pour tenter de réparer les dommages de l'ADN nucléaire. L'activation de l'ADN polymérase-β coïncide avec un premier pic apoptotique. Si l'exposition se poursuit, l'expression d'une enzyme endonucléase, (fragmentant l'ADN) survient et amène à son terme une deuxième vague d'apoptose (Gordon et al., 2002; Cortina et al., 2003).

Des études du même groupe démontrent que la lumière induit une surexpression des enzymes réparatrices de l'ADN mitochondrial, telle que l'ADN polymérase-γ ou l'ADN glycosylase-8-oxoguanine (Cortina et al., 2005). Ce mécanisme de réparation de l'ADN est dépendant de l'âge puisque, chez des rats âgés de 10 mois, la capacité de sur-réguler les 2 enzymes mitochondriales diminue de moitié (Cortina et al., 2005).

I.7.4.2- Utilisation des facteurs neurotrophiques.

Grâce à leur pouvoir neuroprotecteur, les facteurs neurotrophiques sont largement utilisés pour la sauvegarde des cellules rétiniennes (Chaum, 2003).

La mort des cellules photoréceptrices peut être ralentie par des injections intravitréennes de BDNF (LaVail et al., 1998; Okoye et al., 2003), CNTF (Cayouette et al., 1998; LaVail et al., 1998), FGF-2 (Faktorovich et al., 1990; Gao and Hollyfield, 1996; LaVail et al., 1998) ou GDNF (McGee Sanftner et al., 2001) dans des modèles animaux de dégénérescence rétinienne. Les effets protecteurs d'un traitement avec BDNF ont aussi été rapportés dans un modèle de détachement rétinien chez le chat (Lewis et al., 1999).

Dans les cas de dégénérescence induite par la lumière, la sauvegarde des photorécepteurs peut être assurée par des injections préalables de BDNF (LaVail et al., 1992; Ikeda et al., 2003). De la même manière, des injections intravitréennes de PEDF (Cao et al., 2001b; Imai et al., 2005), FGF-2 (Faktorovich et al., 1992; LaVail et al., 1992; Masuda et al., 1995; Cao et al., 2001a; Lau and Flannery, 2003) ou LEDGF (Machida et al., 2001) préservent les photorécepteurs d'une exposition lumineuse.

Chez les animaux adultes, les niveaux de FGF-2 ou CNTF sont sur-régulés dans la dégénérescence des photorécepteurs par la lumière (Gao and Hollyfield, 1996; Wen et al., 1998; Walsh et al., 2001). L'expression des facteurs neurotrophiques est susceptible d'être modifiée par une blessure préalable de la rétine. Différentes études montrent qu'une blessure locale (Faktorovich et al., 1992) ou une section du nerf optique (Gargini et al., 2004; Valter et al., 2005) protègent les photorécepteurs des dommages lumineux. Par exemple, l'expression du FGF-2 est normalement localisée dans les couches internes de la rétine (CNI et CCG) (Sapieha et al., 2003) et s'étend à la couche des photorécepteurs après une blessure du nerf optique (Kostyk et al., 1994). Donc la synthèse de FGF-2 dans la couche nucléaire externe assurerait une source de facteurs de survie pour les photorécepteurs illuminés (Bush and Williams, 1991; Gargini et al., 2004; Valter et al., 2005).

I.8- Objectif de la thèse.

Alors que la photodégénérescence rétinienne et ses mécanismes ont été étudiés en détail chez l'animal albinos adulte, les conséquences d'une exposition lumineuse intense sur la rétine du raton albinos en développement restent méconnues. Aucune étude n'a encore décrit les conséquences fonctionnelles et morphologiques d'une exposition lumineuse intense dans la rétine postnatale. Le but de cette thèse a été de documenter par électrorétinographie et histologie les effets délétères d'une exposition lumineuse intense sur des rétines de rats albinos pendant le premier mois postnatal de développement, avant et après l'ouverture des paupières.

CHAPITRE 2

ARTICLE 1

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CONSEQUENCES OF BRIGHT LIGHT EXPOSURE ON THE RETINA OF NEONATAL RATS

En préparation pour Visual Neuroscience

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CONSEQUENCES OF BRIGHT LIGHT EXPOSURE ON THE RETINA OF NEONATAL RATS

Sandrine Joly,[1] Allison Lindsay Dorfman,[2] Sylvain Chemtob,[2] Hakima Moukhles,[1,3] and Pierre Lachapelle[1,4,*].

[1]Department of Biological Sciences, University of Montreal, Montreal, QC, Canada; [2]Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, QC, Canada; [3]Department of Cellular and Physiological Sciences, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada; [4]Department of Ophthalmology, McGill University-Montreal Children's Hospital Research Institute, Montreal, QC, Canada.

Number of figures: 4 Number of tables: 1

Grant information: This study was supported by a research grant (MOP-13383 and -14639) from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), from the FRSQ-Réseau Vision as well as from the McGill University-Montreal Children's Hospital Research Institute.

Corresponding Author:
Pierre Lachapelle, Ph.D.
Department of Ophthalmology (D-164)
McGill University- Montreal Children's Hospital Research Institute
2300 Tupper Street,
Montreal, Quebec, Canada. H3H 1P3
Phone: (514) 412-4400 ext.23890
Fax: (514) 412-4331
[redacted]

II.1- Abstract

Newborn rats were raised in a bright luminous environment from birth to postnatal day 14 (P14: eye opening) to determine if this stress hampered retinal maturation. Electroretinograms (ERG) were obtained at P30 and P60 at which time the retinas were harvested for histology. In adults (the mothers) 6 days of exposure sufficed to nearly completely abolish the ERG and destroy the photoreceptors and outer nuclear layer (ONL). At P30, newborns showed minimal effect while at P60, significant functional anomalies were detected along with marked reduction in ONL nuclei density and deterioration of photoreceptor outer segments. Thus, in spite of closed eyelids, postnatal exposure to the bright environment did trigger a slow retinal degenerative process.

Keywords: electroretinogram (ERG); retina; light; photoreceptor; development.

II.2- Introduction

Numerous studies conducted in adult animals have already documented the deleterious effects that light could have on the retinal photoreceptors (Noell, Walker, Kang & Berman, 1966; O'Steen, Anderson & Shear, 1974; Organisciak, Darrow & Barsalou, 2003; Organisciak, Jiang, Wang, Pickford & Blanks, 1989; Organisciak & Winkler, 1994; Wenzel, Grimm, Samardzija & Reme, 2005). For example, as little as one hour of light exposure is sufficient to yield ultrastructural changes at the photoreceptors as documented with electron microscopy (Kuwabara & Gorn, 1968; O'Steen, Shear & Anderson, 1972). Extending the exposure to 24 hours will cause severe and irreversible functional and structural (histological) damages to the retina of adult rats such as a complete extinction of the ERG as well as a concomitant marked reduction in the thickness of the ONL (Li, Cao & Anderson, 2001; Li, Cao & Anderson, 2003; Penn, Naash & Anderson, 1987; Penn, Thum & Naash, 1989). Hafezi and his collaborators (Hafezi, Marti, Munz & Reme, 1997) also showed, in adult animals, a significant correlation between the amount of light received by the photoreceptors and the extent of apoptotic cell death.

However, while most studies, such as those reported above, examined the pathophysiological processes of retinal light damage in the adult animal model, few have examined it in neonates. Studies performed in newborn animals (Kuwabara & Funahashi, 1976; Malik, Cohen, Meyer & Perlman, 1986; O'Steen et al., 1974) reported that the magnitude of light damage was less than that observed in adults. Malik and his collaborators observed that if rats were exposed to an intense source of light prior to age 20 days old, they retained a normal ERG response while it became significantly decreased in amplitude and, in some cases, abolished when light exposure occurred after 20 days of age (Malik et al., 1986). Similarly, Kuwabara and Funahashi (1976) reported weak subcellular changes in retina submitted to continuous light between the 7th and the 21st day of life. They suggested that during retinal development, recovery from light damage was possible since the addition of outer segment components, a process that normally occurs during retinal maturation, was enhanced following the insults caused by light exposure.

The apparent resistance of the young developing retinas to light damage, as suggested above, remains to be explained. Could it be due to the incomplete development

of the photoreceptors before eyelid opening? In rodents, rod and cone photoreceptors are generated during the embryonic life (Cepko, Austin, Yang, Alexiades & Ezzeddine, 1996; Rapaport, Wong, Wood, Yasumura & LaVail, 2004). The development of rod outer segments starts at approximately P5 to reach about half of the adult size by P13 (Detwiler, 1932; Fulton, Hansen, Dodge & Williams, 1998; Rapaport et al., 2004; Stone, Maslim, Valter-Kocsi, Mervin, Bowers, Chu, Barnett, Provis, Lewis, Fisher, Bisti, Gargini, Cervetto, Merin & Peer, 1999). Detectable levels of opsin RNA have been measured as early as postnatal day 2 (P2) (Treisman, Morabito & Barnstable, 1988) whereas rhodopsin is first detected at P7 (Bonting, Caravaggio & Gouras, 1961). Attesting to the functional maturation of the retina of the developing rat, an ERG is first recorded at approximately P12 (Bonting et al., 1961; Weidman & Kuwabara, 1968). Consequently, the photoreceptor structure and function needed to capture and transduce light, and consequently possibly be damaged by an excess of it, are already well in place before eyelid opening.

So why is it that previous studies have failed to report convincing evidence of a light-induced retinopathy (LIR) in the developing newborn rats? The above is reminiscent of the findings of Dembinska et al. (Dembinska, Rojas, Chemtob & Lachapelle, 2002; Dembinska, Rojas, Varma, Chemtob & Lachapelle, 2001) who also evidenced, in newborn rats, a period of relative immunity of the retinal tissue to a hyperoxic insult. They showed that neonatal rats exposed to a hyperoxic regimen (to mimic the human Retinopathy of Prematurity: ROP) during the first week of life did not develop as severe a retinopathy compared to neonates exposed to the same oxidative stress during the second week of life.

In view of the above, the purpose of our study was therefore to further investigate the alleged resistance of the developing rat retina to light-induced retinopathy (LIR). To do so, we examined the effect of a bright light exposure on the retina of newborn rats prior to eye opening (P14) and compared our findings with those obtained from adult rats exposed to the same light regimen.

II.3- **Methods**.

II.3.1- Animals

Experiments were approved by the McGill University- Montreal Children's Hospital Animal Care Committee and conducted in accordance with the Canadian council on animal

care. Adult female Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories, St-Constant, Que.) were ordered at 15 days of gestation and kept under a cyclic luminous environment of 80 lux (12D: 12L). Immediately after birth, pups and their mothers were placed in clear plexiglass cages and exposed to bright cyclic light of 10 000 lux (measured at cage bottom level with a IL 1700 Research light meter, International Light, Newburyport, MA, USA). The set-up consisted of 12 neon lights (cool-white fluorescent lamps of 34 watts each) oriented in groups of 4 parallel to one another above and on both sides of the cages. Rats were exposed immediately after birth (P0) until P14 (P0-P14; N=16). Aged-matched control rats (N=20) were simultaneously raised in the normal animal care facility, in a cyclic (12h: 12h) 80-lux luminous environment. Following exposure, the rats were removed from the bright light environment and maintained in the normal animal facility lighting conditions until P60.

II.3.2- Electroretinography

ERGs were obtained at P30 and P60 according to a protocol previously reported (Dembinska et al., 2002; Dembinska et al., 2001). Briefly, after a period of dark adaptation of 12 hours and under a dim-red light illumination, the rats were anaesthetized with an intramuscular injection of ketamine (85 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg) and the pupils were dilated with drops of 1% cyclopentolate hydrochloride. The rats were then placed, lying on their sides, in a modified recording chamber of our design (Lachapelle & Blain, 1990) in which the top part housed the rod desensitizing background light and the photostimulator (model PS 22, Grass Instruments, Quincy, MA). A DTL fibre electrode (27/7 *X-Static*® silver coated conductive nylon yarn: Sauquoit Industries, Scranton, PA, USA) was used as the active electrode. It was maintained on the cornea with 2% methylcellulose, which was also used to prevent corneal desiccation. An electrode inserted in the tail (Grass E2 subdermal electrode) and in the mouth (Grass E5 disc electrode, Grass Instruments, Quincy, MA, USA) served as ground and reference respectively. Broadband electroretinograms (bandwidth: 1-1 000 Hz; 10 000 X; 6 db of attenuation; Grass P-511 amplifiers) were recorded using the AcqKnowledge data acquisition system (Biopac MP 100 WS, BIOPAC System Inc., Goleta, CA, USA). Five flashes of white light (Grass PS 22 photostimulator; flash duration: 20 µsec; inter-stimulus interval: 10 sec) were used to generate the scotopic (rod-dominated) ERGs. The intensity of the flash stimulus was

increased in steps of 0.3 log unit over a 6-log unit range (maximum intensity: 0.6 log cd.s.m^{-2}). Photopic (cone-mediated) ERGs were recorded after the scotopic ERGs. The recordings were obtained under a photopic background light (30 cd.m^{-2}) and in response to flashes of 0.9 log cd.s.m^{-2} in intensity delivered at an inter-stimulus interval of 1 sec. The photopic responses were recorded 20 minutes after the opening of the background light in order to avoid the light adaptation effect (Lachapelle, 1987; Peachey, Goto, al-Ubaidi & Naash, 1993).

II.3.3- Retinal histology

At 60 days of age, the rats were sacrificed with an anaesthetic overdose and immediately perfused intracardiacally with a solution of 4 % paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). The eyes were enucleated, the cornea and lens were removed and the remainder of the eyes were immersed for 2 hours in 4 % PFA. The retinas were subsequently prepared according to a method previously described by us (Lachapelle, Dembinska, Rojas, Benoit, Almazan & Chemtob, 1999). Sections of the nasal, central and temporal retina were fixed in a solution of 1 % osmium tetroxide for 1 hour, sequentially dehydrated in 30, 50, 70, 90, 95 and 100 % ethanol and then embedded in epoxy resin (Epon 812; Mecalab, Montreal, Canada). Semi-thin sections of 0.7 µm thick were cut, mounted on glass slides and stained with 0.1 % toluidine blue. The images were examined and captured with a QImaging Retiga 1300 monochrome 10-bit CCD camera mounted on the Nikon Eclipse E-600 Microscope using Northern Eclipse image analysis software (Empix Imaging Inc., Canada). The number of nuclei in the outer nuclear layer (ONL) was determined using the Image-Pro Plus image analysis software. Measurements were performed on 7 different sections per retina (control: n=2 retinas; 0-14: n=3). On each section, the outer nuclear layer, encompassing photoreceptor nuclei, was delimited and the number of cells was automatically counted and normalized to the sampled surface. Electron microscopy was also obtained (ultra-thin sections of 150 nm, contrasted with 2 % uranyle acetate, and Reynold's lead citrate) using the JEOL JEM-100S Transmission Electron Microscope.

II.3.4- Data analysis.

Analysis of the ERG waveforms was performed according to the standard practice (Marmor & Zrenner, 1998) as previously reported by us (Dembinska et al., 2002; Dembinska et al.,

2001). The amplitude of the a-wave was measured from baseline to the most negative trough, whereas the amplitude of the b-wave was measured from the trough of the a-wave to the most positive peak of the retinal response. Peak times were measured from flash onset to peak. Scotopic luminance-response function curves were obtained by plotting the amplitude of the b-wave against the intensity of the flash used to evoke the response. In order to determine the rod V_{max} (e.g. maximum rod response without contribution of the cones: calculated Rod V_{max}), we determined as the upper limit of the luminance-response function, the ERG response where an a-wave occurred for the first time (recorded rod V_{max}) and *k* or retinal sensitivity, as the flash intensity needed to generate a b-wave half the amplitude of the (calculated) rod V_{max}. The intensity of stimulation needed to reach the (recorded) rod V_{max} varied between -2.7 and -2.4 log cd.sec.m^{-2}. The (mixed) rod-cone a-wave and (mixed) rod-cone b-wave refer to scotopic ERGs evoked to the highest flash intensity available (0.6 log cd.sec.m^{-2}). Finally, Maturation Indexes (ratios between ERG measurements obtained at 60 and 30 days) were calculated in order to compare maturation-induced ERG changes between normal and exposed rats. From these, we obtained the Retinal Maturation Index, which represents the average of all the Maturation indexes (see table 1). Statistical analysis was performed with the use of a Student's *t*-test to compare the effects of the light exposure between control and the light-exposed rat groups.

II.4- <u>Results.</u>

Figure 1 illustrates representative scotopic (A, B, C) and photopic (D, E, F) ERG responses obtained from normal adult rats raised either in a normal light environment (A, D) or in bright light conditions for 6 (B, E) or 14 (C, F) consecutive days. Close inspection of the waveforms reveals the near complete extinction of the scotopic responses (especially those evoked at dim flash intensities) following 6 and 14 days of bright light exposure. There is still, however, remnants of *b*-waves (as indicated with the arrows, Fig. 1B) in responses evoked to the brightest flashes. These residual scotopic *b*-waves are seen in responses recorded from rats exposed to the bright luminous environment following 6 but not 14 consecutive days (Fig. 1C). Similarly, the photopic ERGs are also markedly attenuated, although there are still residual responses recorded after 6 and even after 14 days of exposure (Figure 1E-F, tracing at 20 min, arrows). These findings are summarized at table

1 where group data is presented. Six days of exposure to the bright luminous environment completely abolished the scotopic ERG a-wave and rod V_{max} while the amplitude of the (scotopic) mixed rod-cone and (photopic) cone *b*-waves are reduced to 5.8 % ($P < 0.0001$) and 13.2 % ($P < 0.0001$) of normal amplitudes respectively.

The above results contrast with those obtained from newborn rats exposed to the same lighting regimens as shown in Figure 2. Here are compared three representative ERG responses [e.g. scotopic (mixed rod-cone) ERG, rod Vmax ERG and photopic (cone) ERG] taken at ages 30 (tracings 30 d.) and 60 (tracings 60 d.) days from a normal (control) rat (A), and from two rats exposed to the same bright luminous environment from P0-P14 (B-C). Unlike adults, the retinal function of neonatal rats appears to resist remarkably to a chronic exposure to the bright luminous environment. On first analysis, the amplitudes and morphologies of the waveforms obtained at P30 appear to be comparable to those of normal (control) rats. As exemplified at table 1, there are no significant differences between control and exposed rats for measurements (amplitude or peak time) taken at P30. However, a slightly different picture emerges when the data (ERG waves and measurements) taken at P60 are considered. As shown at figure 2 (control rat), there is a normal decrease in amplitude of the ERG signal (rod and cone mediated) as the rat ages. This age-defined amplitude reduction appears to be more pronounced when the data from the exposed rats are considered (especially rat #2). This is confirmed with the group data presented at table 1 where significantly smaller than normal rod a-waves and significantly slower than normal rod b-waves were measured in exposed rats. Similarly, although the amplitudes of the rod V_{max} as well as that of the mixed rod-cone- and cone b-waves obtained at P60 were smaller than normal following light exposure, the differences did not reach statistical significance. As a result of the above, the Maturation Indexes (e.g. P60/P30% rows) were smaller (but not significantly) than normal for the rod V_{max}, rod a-wave, mixed rod-cone b-wave and photopic (cone) b-wave amplitudes. As a result of the above the (overall) Retinal Maturation Index of exposed rats was also smaller (but not significantly) than normal. Finally, as shown at table 1, the decrease in scotopic ERG amplitudes measured at P60 did not result in a significant change in retinal sensitivity (*k*) value.

In order to determine if exposure to the bright luminous environment also caused significant structural damages to the retina, we performed histological analysis on the retinas of rats aged 60 days old. Typically, the outer nuclear layer (ONL) of a two month old rat retina is composed of densely packed photoreceptor nuclei as shown at Figure 3A. In comparison, retinas taken from exposed newborn rats (Figure 3B-C) disclosed a less densely packed ONL (non-significant 10% reduction in density as per table 1), as revealed with the marked spacing between neighbouring nuclei, while there was a complete destruction of the outer retina (e.g. photoreceptors and ONL) of adult rats exposed to the same luminous environment for 6 days (Figure 3D). No other evidence of light-induced damages could be observed in the other retinal layers of newborn or adult rats. Furthermore, previous studies have reported, in adult rats, a regional discrepancy in the distribution of the light-induced retinopathy, the superior retinal hemisphere showing significantly more pathology than the inferior one (Rapp, Naash, Wiegand, Joel, Nielson & Anderson, 1985; Rapp, Tolman, Koutz & Thum, 1990). This is best documented at Figure 3E, where representative examples of the superior and inferior retinas of an adult rat, exposed to the bright luminous environment for 3 days, are compared. While the inferior ONL is still composed of 3-4 rows of nuclei, the superior ONL only counts 1-2 rows. The latter contrasts with results obtained from newborn rats exposed from P0-P14 to the same luminous environment where, as exemplified at Figure 3F, the ONL of the two retinal hemispheres are comparable.

Results presented at Figure 3 suggested anomalies to the photoreceptors that were also confirmed with ultrastructural analysis at electron microscopy (Figure 4). In control rats (Figure 4A), the outer retina disclose a photoreceptor layer with outer and inner segments arranged parallel to each other, while that of the exposed rats (Figure 4B) revealed photoreceptors with a more rounded shape, with several of them showing degraded outer and inner segments. A higher magnification reveals, in light-exposed neonatal retinas (Figure 4D) a complete disruption (arrows) of the lamellar membrane along with the progressive (from the base to the tip of the outer segment) transformation of the discs in tubules and vesicles at the tips of the photoreceptor (arrowheads). These cytoarchitectural anomalies were never observed in normal retinas (Figure 4C).

II.5- Discussion.

Our data showed that, following as little as 6 days of chronic (cyclical) exposure to a bright luminous environment, the retina of adult rats suffered profound and irreversible structural and functional damages characterized with, 1- a complete abolition of the scotopic ERGs (figure 1 and table 1), 2- cone ERG responses reduced to near extinction (figure 1 and table 1) and, 3- a complete destruction of the photoreceptors and ONL (Fig. 2). Our results are thus in agreement with previous studies that showed a significant impairment in retinal structure (Noell et al., 1966; O'Steen et al., 1972) and function (Cao, Tombran-Tink, Elias, Sezate, Mrazek & McGinnis, 2001; Ikeda, Tanihara, Tatsuno, Noguchi & Nakayama, 2003; Sugawara, Sieving & Bush, 2000) following chronic light exposure. Persistence of a residual photopic b-wave (in responses evoked to the brightest stimuli) indicates that cones were more resistant than rods, a claim also previously advanced by others (Birch & Jacobs, 1980; Cicerone, 1976; LaVail, 1976).

Compared to adult rats, the retinas of newborn rats exposed to the same bright luminous environment and even for a longer period of time, showed subtle (but still significant) functional anomalies suggesting that the rat pups may have been protected from the deleterious effects of chronic exposure to a bright luminous environment of 10,000 lux. Furthermore, these functional anomalies could only be evidenced in recordings obtained at P60, while those obtained at P30 were all within the normal range, suggesting that postnatal exposure to a bright luminous environment triggered a slow and irreversible retinal degeneration. ERG recordings obtained from 60 days old light-exposed rats revealed significantly smaller for age rod a-wave and significantly delayed for age rod b-wave while the other ERG components, albeit smaller than aged-matched controls, never reached statistical significance. Our evidence of a significantly smaller rod a-wave along with our demonstration of a structural (Figure 3) and ultrastructural (Figure 4) impairment of the photoreceptors, suggest that the latter are the retinal structures, of adult or neonatal rats, that are initially (and most probably solely) impaired following chronic exposure to a bright luminous environment; the other ERG anomalies (reduced and delayed b-wave) most probably resulting from a domino effect. These functional anomalies are in line with previous reports that suggested that the light-induced retinal damages observed in adult rats were rhodopsin mediated (Noell et al., 1966).

Notwithstanding the above, our findings indicate that, compared to adults, the retina of newborn rats demonstrate a remarkable resistance to light-induced retinal degeneration, especially in measurements obtained prior to 30 days of age. These results are consistent with the findings of Malik et al. (Malik et al., 1986) who showed that the retina of newborn rats, aged 20 days or younger, was partially protected from light damage compared to older rats, who showed a complete abolition of the ERG following exposure to a bright light environment of equivalent intensity and duration. However, their failure to report a LIR in the neonatal rats may have resulted from the relatively weak luminous environment (about 2800 lux) that they used, an intensity that could have been easily blocked by the eyelids, which only open at P14. Although in our study we cannot rule out the possibility that the eyelids may have acted as a filter and consequently lowered the total amount of light reaching the retina, we believe that the intensity of the bright luminous environment we used should have been sufficient to generate a light-induced retinal degeneration in our newborn rat pups. Previous studies, conducted in adult albino rats, have shown that the eyelids cut approximately half the amount of light reaching the retina (Williams, Henrich & Reiser, 1998). Studies performed in adult albino cats and monkeys revealed that the maximum transmission of the eyelid was in the red spectrum while most of the blue light was stopped by the lids (Crawford & Marc, 1976). In humans, maximum transmission was also measured in the red portion of the light spectrum as a result of the filtering effect of the eyelids (Jaffe, Caruso, de Monasterio & Nussenblatt, 1987; Moseley, Bayliss & Fielder, 1988; Robinson, Bayliss & Fielder, 1991; Robinson & Fielder, 1992). In humans, this red filter property did not appear to vary with age (Robinson & Fielder, 1992) and in fact, in human neonates, 38 % of the white light was shown to be transmitted through the lids (Robinson et al., 1991). Based on the above estimate of the total amount of light transmitted through the closed eyelids (anywhere between 38 % and 50 %) and the use of an intense luminous environment (10,000 lux), we believe that there should have been enough light reaching the retina (3,800-5,000 lux) to cause significant damages to the retinal tissue. For example, albino rats exposed continuously to a luminous environment of 1,000 lux or more developed severe retinal damages (Semple-Rowland & Dawson, 1987). In addition, studies by Akula et al. (Akula, Lyubarsky & Naarendorp, 2003) and Jacobs et al. (Jacobs, Fenwick & Williams, 2001) have shown that rats are sensitive to red light

which is the most likely to pass the eyelids. Given the above data, we believe that the subtle (compared to adult) light-induced retinal degeneration we observed in the newborn rats cannot be attributed to an inappropriate experimental design. In fact, preliminary results obtained from juvenile rats (aged >P14 and thus with eyelids open) exposed to the same luminous environment for as long as 14 consecutive days still had retinal structures and functions significantly less impaired compared to adult rats subjected to the same luminous stress (Joly, Pernet, Dorfman, Di Polo, Chemtob, Moukhles & Lachapelle, 2004). Clearly the immature and mature retinas do not react similarly to this environmental stress. Previous studies have also reported that light-induced degeneration of the retinal photoreceptors was more pronounced in old rats than in young rats (O'Steen et al., 1974). In agreement with our results, Kuwabara and Funahashi (Kuwabara & Funahashi, 1976) also reported weak subcellular changes in retinas submitted to continuous light (about 5400 lux) between the 7th and the 21st day of life. The higher rate of photoreceptor outer segment renewal in postnatal rats has been proposed to explain the apparent lack of light-induced retinal degeneration in young compared to old animals.

As shown at Figure 3, adult retinas subjected to an intense luminous environment developed an asymmetric retinopathy where the superior retinal hemisphere always presented with a more severe retinopathy compared to the inferior retinal hemisphere, the latter discrepancy being most obvious with the cellular count of the ONL. Although the exact mechanisms at the origin of this geographic discrepancy remains to be fully understood, there are some suggestions that it might reflect biochemical differences between the two retinal hemispheres (Rapp et al., 1985). It does not however appear to result from an uneven distribution of the light on the retina since, irrespective of how light is delivered, the superior retina is always the most susceptible. It is worth mentioning that similar regional differences were previously reported in other retinopathies, such as Retinitis Pigmentosa, for example (Schwartz, Boelle, D'Hermies, Ledanois & Virmont, 2003). The fact that we could not evidence a similar regional discrepancy, with the retinal sections taken from our neonatal rats (figure 3), further support our claim that the retina of newborn rats is relatively protected from the deleterious effect of exposure to a bright luminous environment. Clearly the enhanced susceptibility of the superior retina to the bright light stress is also a characteristic of the mature retina.

Notwithstanding the above, some could argue that our lack of a more convincing light-induced retinal degeneration (e.g. more compatible with adult findings) in newborn rats simply reflects the state of relative immaturity reached by the retina at the time of exposure. In other words, given that the developing retina contains less rhodopsin and shorter outer segments compared to the adult retina, and based on previous studies that reported that the LIR was rhodopsin mediated, it should not come to us as a surprise that the resulting retinopathy is significantly less severe in the neonatal rats. It is true that the retina was still in the process of maturing at the time it was exposed to our bright luminous environment. However, as pointed out in the introduction, all of what is needed to capture and transduce the light stimulus is present by P12 that is, when the ERG is reported to be first recorded. Consequently, if in adults we observed a complete destruction of the photoreceptor layer and completely abolished ERG with less than 24 hours of exposure, as previously reported by others (Li et al., 2003; Penn et al., 1987; Penn et al., 1989), in our newborn rats exposed for 14 consecutive days we should have expected at least the same fate, irrespective of the size of the outer segment or content in rhodopsin reached at time of exposure. The lack of such an effect should be, in our mind, interpreted as evidence that the developing retina is relatively preserved from the deleterious effect of environmental stressors, a claim previously advanced by us to explain the relative immunity of the retinal structure and function to oxidative stress taking place between P0 and P6 compared to more damaging effects for exposures between P6 and P14 (Dembinska et al., 2002; Dembinska et al., 2001).

Some behavioural strategies could also explain the attenuated retinopathy observed in exposed newborn rats. Ricci et al. (Ricci, Lepore, Iossa, Santo, D'Urso & Maggiano, 1990) suggested that newborn albino rats could have protected themselves from the deleterious effect of bright light by hiding underneath their mother during the light exposure, thus creating a physical barrier to the light stress. Combined with the above behavioural strategies, concomitant developmental events may have compensated for the eventual loss in retinal cells resulting from exposures occurring during the first 2 weeks of life and thus explain the lack of a measurable effect at P30. In rodents (rats and mice), two waves of rod production have been identified during postnatal development (Morrow, Belliveau & Cepko, 1998). An early phase where proliferating multipotent retinal

progenitors (PMRP) born before E19 become rhodopsin-positive at P5 and a later phase where PMRP born after E19 become rhodopsin-positive by P11-P12. The alternance of two successive waves of photoreceptor generation (Morrow et al., 1998) and the high capacity of the retina to produce an excess of retinal neurons (Alexiades & Cepko, 1996) may have compensated for the photoreceptor loss induced following exposure to a bright light environment over the first 14 days of life. Moreover, DNA repair mechanisms implying the upregulation of the DNA polymerase-β, a potent DNA repair enzyme, could also have prevented cell death or, at least, facilitated the recovery of the less injured photoreceptors (Cortina, Gordon, Lukiw & Bazan, 2003a; Cortina, Gordon, Lukiw & Bazan, 2003b; Gordon, Casey, Lukiw & Bazan, 2002). Finally it is also worth mentioning that the newborn rats remained with their mother throughout the exposure and until the first measurement at P30. One wonders if the nutriments provided to the suckling pups were not instrumental in protecting their retinas from the damaging effect of bright light exposure, since diet was previously shown to play a key role in this retinopathy. For example, it is well known that retinas devoid of the polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid (22:6 n-3; DHA) are protected from the deleterious effect of bright light exposure (Bush, Reme & Malnoe, 1991).

In summary, our results suggest that postnatal exposure to a bright luminous environment caused a slow retinal degenerative process (presumably initiated at the level of the outer segment of the rod photoreceptor as suggested from electron microscopy) that only yielded measurable structural and functional consequences in older animals. Should the latter pathophysiological process be confirmed, this model would offer a new investigative avenue to test therapeutic strategies for retinal degenerative disorders initiated at the photoreceptor (outer segment) level. This retinopathy was however significantly less severe, in structure and in function, to that observed in adult rats exposed for even shorter periods of time, suggesting that the retina of the developing rat may be partially protected from the deleterious effect of bright light exposure during the first two weeks of life. Interestingly, it was previously shown by us that the retina of the developing rat is also protected from the deleterious effect of hyperoxia if exposure occurs during the first week of life (Dembinska et al., 2001). Although light and oxygen are likely to exert their toxic

effects through different mechanisms, our results suggest that the postnatal retina possesses an endogenous resistance to exogenous stresses. It remains to be determined how such mechanisms operate as this may help to design promising therapeutic strategies aimed at protecting the retina from lethal environmental insults.

Acknowledgements

This study was supported by research grants (MOP-13383 and -14639) from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), from the FRSQ-Réseau Vision as well as from the McGill University-Montreal Children's Hospital Research Institute. We wish to thank Louise Pelletier, MSc, for her technical assistance with the histology.

II.6- References

Akula, J.D., Lyubarsky, A.L., & Naarendorp, F. (2003). The sensitivity and spectral identity of the cones driving the b-wave of the rat electroretinogram. *Vis Neurosci, 20* (2), 109-117.

Alexiades, M.R., & Cepko, C. (1996). Quantitative analysis of proliferation and cell cycle length during development of the rat retina. *Dev Dyn, 205* (3), 293-307.

Birch, D.G., & Jacobs, G.H. (1980). Light-induced damage to photopic and scotopic mechanisms in the rat depends on rearing conditions. *Exp Neurol, 68* (2), 269-283.

Bonting, S.L., Caravaggio, L.L., & Gouras, P. (1961). The rhodopsin cycle in the developing vertebrate retina. I. Relation of rhodopsin content, electroretinogram and rod structure in the rat. *Exp Eye Res, 1*, 14-24.

Bush, R.A., Reme, C.E., & Malnoe, A. (1991). Light damage in the rat retina: the effect of dietary deprivation of N-3 fatty acids on acute structural alterations. *Exp Eye Res, 53* (6), 741-752.

Cao, W., Tombran-Tink, J., Elias, R., Sezate, S., Mrazek, D., & McGinnis, J.F. (2001). In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci, 42* (7), 1646-1652.

Cepko, C.L., Austin, C.P., Yang, X., Alexiades, M., & Ezzeddine, D. (1996). Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A, 93* (2), 589-595.

Cicerone, C.M. (1976). Cones survive rods in the light-damaged eye of the albino rat. *Science, 194* (4270), 1183-1185.

Cortina, M.S., Gordon, W.C., Lukiw, W.J., & Bazan, N.G. (2003a). DNA repair in photoreceptor survival. *Mol Neurobiol, 28* (2), 111-122.

Cortina, M.S., Gordon, W.C., Lukiw, W.J., & Bazan, N.G. (2003b). Light-induced photoreceptor damage triggers DNA repair: differential fate of rods and cones. *Adv Exp Med Biol, 533*, 229-240.

Crawford, M.L., & Marc, R.E. (1976). Light transmission of cat and monkey eyelids. *Vision Res, 16* (3), 323-324.

Dembinska, O., Rojas, L.M., Chemtob, S., & Lachapelle, P. (2002). Evidence for a brief period of enhanced oxygen susceptibility in the rat model of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci, 43* (7), 2481-2490.

Dembinska, O., Rojas, L.M., Varma, D.R., Chemtob, S., & Lachapelle, P. (2001). Graded contribution of retinal maturation to the development of oxygen-induced retinopathy in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci, 42* (5), 1111-1118.

Detwiler, S.R. (1932). Experimental observations upon the developing rat retina. *Journal of Comparative Neurology, 55* (2), 473-492.

Fulton, A.B., Hansen, R.M., Dodge, J., & Williams, T.P. (1998). Photoreceptor development and photostasis. In: T.P. Williams, & A.B. Thistle (Eds.), *Photostasis and Related Phenomena* (New York: Plenum Press.

Gordon, W.C., Casey, D.M., Lukiw, W.J., & Bazan, N.G. (2002). DNA damage and repair in light-induced photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci, 43* (11), 3511-3521.

Hafezi, F., Marti, A., Munz, K., & Reme, C.E. (1997). Light-induced apoptosis: differential timing in the retina and pigment epithelium. *Exp Eye Res, 64* (6), 963-970.

Ikeda, K., Tanihara, H., Tatsuno, T., Noguchi, H., & Nakayama, C. (2003). Brain-derived neurotrophic factor shows a protective effect and improves recovery of the ERG b-wave response in light-damage. *J Neurochem, 87* (2), 290-296.

Jacobs, G.H., Fenwick, J.A., & Williams, G.A. (2001). Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights. *J Exp Biol, 204* (Pt 14), 2439-2446.

Jaffe, M.J., Caruso, R.C., de Monasterio, F.M., & Nussenblatt, R.B. (1987). Chronic eyelid closure and its effect upon the human cone and rod electroretinogram. *Am J Optom Physiol Opt, 64* (5), 373-376.

Joly, S., Pernet, V., Dorfman, A., Di Polo, A., Chemtob, S., Moukhles, H., & Lachapelle, P. (2004). Light-induced retinopathy: from the newborn to the adult rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci, 45*: E-Abstract 1356.

Kuwabara, T., & Funahashi, M. (1976). Light damage in the developing rat retina. *Arch Ophthalmol, 94* (8), 1369-1374.

Kuwabara, T., & Gorn, R.A. (1968). Retinal damage by visible light. An electron microscopic study. *Arch Ophthalmol, 79* (1), 69-78.

Lachapelle, P. (1987). Analysis of the photopic electroretinogram recorded before and after dark adaptation. *Can J Ophthalmol, 22* (7), 354-361.

Lachapelle, P., & Blain, L. (1990). A new speculum electrode for electroretinography. *J Neurosci Methods, 32* (3), 245-249.

Lachapelle, P., Dembinska, O., Rojas, L.M., Benoit, J., Almazan, G., & Chemtob, S. (1999). Persistent functional and structural retinal anomalies in newborn rats exposed to hyperoxia. *Can J Physiol Pharmacol, 77* (1), 48-55.

LaVail, M.M. (1976). Survival of some photoreceptor cells in albino rats following long-term exposure to continuous light. *Investigative Ophthalmology, 15* (1), 64-70.

Li, F., Cao, W., & Anderson, R.E. (2001). Protection of photoreceptor cells in adult rats from light-induced degeneration by adaptation to bright cyclic light. *Exp Eye Res, 73* (4), 569-577.

Li, F., Cao, W., & Anderson, R.E. (2003). Alleviation of constant-light-induced photoreceptor degeneration by adaptation of adult albino rat to bright cyclic light. *Invest Ophthalmol Vis Sci, 44* (11), 4968-4975.

Malik, S., Cohen, D., Meyer, E., & Perlman, I. (1986). Light damage in the developing retina of the albino rat: an electroretinographic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci, 27* (2), 164-167.

Marmor, M.F., & Zrenner, E. (1998). Standard for clinical electroretinography (1999 update). International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. *Doc Ophthalmol, 97* (2), 143-156.

Morrow, E.M., Belliveau, M.J., & Cepko, C.L. (1998). Two phases of rod photoreceptor differentiation during rat retinal development. *J Neurosci, 18* (10), 3738-3748.

Moseley, M.J., Bayliss, S.C., & Fielder, A.R. (1988). Light transmission through the human eyelid: in vivo measurement. *Ophthalmic Physiol Opt, 8* (2), 229-230.

Noell, W.K., Walker, V.S., Kang, B.S., & Berman, S. (1966). Retinal damage by light in rats. *Invest Ophthalmol, 5* (5), 450-473.

O'Steen, W.K., Anderson, K.V., & Shear, C.R. (1974). Photoreceptor degeneration in albino rats: dependency on age. *Invest Ophthalmol, 13* (5), 334-339.

O'Steen, W.K., Shear, C.R., & Anderson, K.V. (1972). Retinal damage after prolonged exposure to visible light. A light and electron microscopic study. *Am J Anat, 134* (1), 5-21.

Organisciak, D.T., Darrow, R.M., & Barsalou, L.S. (2003). Light-induced retinal degeneration. In: L.A. Levin, & A. Di Polo (Eds.), *Ocular neuroprotection* (pp. 85-107). New York Basel: Marcel Dekker, Inc.

Organisciak, D.T., Jiang, Y.L., Wang, H.M., Pickford, M., & Blanks, J.C. (1989). Retinal light damage in rats exposed to intermittent light. Comparison with continuous light exposure. *Invest Ophthalmol Vis Sci, 30* (5), 795-805.

Organisciak, D.T., & Winkler, B.S. (1994). Retinal light damage: Practical and theoretical considerations. *Progress in Retinal and Eye Research, 13* (1), 1-29.

Peachey, N.S., Goto, Y., al-Ubaidi, M.R., & Naash, M.I. (1993). Properties of the mouse cone-mediated electroretinogram during light adaptation. *Neurosci Lett, 162* (1-2), 9-11.

Penn, J.S., Naash, M.I., & Anderson, R.E. (1987). Effect of light history on retinal antioxidants and light damage susceptibility in the rat. *Exp Eye Res, 44* (6), 779-788.

Penn, J.S., Thum, L.A., & Naash, M.I. (1989). Photoreceptor physiology in the rat is governed by the light environment. *Exp Eye Res, 49* (2), 205-215.

Rapaport, D.H., Wong, L.L., Wood, E.D., Yasumura, D., & LaVail, M.M. (2004). Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol, 474* (2), 304-324.

Rapp, L.M., Naash, M.I., Wiegand, R.D., Joel, C.D., Nielson, J.C., & Anderson, R.E. (1985). Morphological and biochemical comparisons between retinal regions having differing susceptibility to photoreceptor degeneration. In: A.R. Liss (Ed.) *Retinal degeneration: Experimental and clinical studies* (pp. 421-437).

Rapp, L.M., Tolman, B.L., Koutz, C.A., & Thum, L.A. (1990). Predisposing factors to light-induced photoreceptor cell damage: retinal changes in maturing rats. *Exp Eye Res, 51* (2), 177-184.

Ricci, B., Lepore, D., Iossa, M., Santo, A., D'Urso, M., & Maggiano, N. (1990). Effect of light on oxygen-induced retinopathy in the rat model. Light and OIR in the rat. *Doc Ophthalmol, 74* (4), 287-301.

Robinson, J., Bayliss, S.C., & Fielder, A.R. (1991). Transmission of light across the adult and neonatal eyelid in vivo. *Vision Res, 31* (10), 1837-1840.

Robinson, J., & Fielder, A.R. (1992). Light and the immature visual system. *Eye, 6* (Pt 2), 166-172.

Schwartz, L., Boelle, P.Y., D'Hermies, F., Ledanois, G., & Virmont, J. (2003). Blue light dose distribution and retinitis pigmentosa visual field defects: an hypothesis. *Med Hypotheses, 60* (5), 644-649.

Semple-Rowland, S.L., & Dawson, W.W. (1987). Retinal cyclic light damage threshold for albino rats. *Lab Anim Sci, 37* (3), 289-298.

Stone, J., Maslim, J., Valter-Kocsi, K., Mervin, K., Bowers, F., Chu, Y., Barnett, N., Provis, J., Lewis, G., Fisher, S.K., Bisti, S., Gargini, C., Cervetto, L., Merin, S., & Peer, J. (1999). Mechanisms of photoreceptor death and survival in mammalian retina. *Prog Retin Eye Res, 18* (6), 689-735.

Sugawara, T., Sieving, P.A., & Bush, R.A. (2000). Quantitative relationship of the scotopic and photopic ERG to photoreceptor cell loss in light damaged rats. *Exp Eye Res, 70* (5), 693-705.

Treisman, J.E., Morabito, M.A., & Barnstable, C.J. (1988). Opsin expression in the rat retina is developmentally regulated by transcriptional activation. *Mol Cell Biol, 8* (4), 1570-1579.

Weidman, T.A., & Kuwabara, T. (1968). Postnatal development of the rat retina. An electron microscopic study. *Arch Ophthalmol, 79* (4), 470-484.

Wenzel, A., Grimm, C., Samardzija, M., & Reme, C.E. (2005). Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res, 24* (2), 275-306.

Williams, T.P., Henrich, S., & Reiser, M. (1998). Effect of eye closures and openings on photostasis in albino rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci, 39* (3), 603-609.

II.7- Figures.

Figure 1. The effect of bright light exposure on the scotopic and photopic ERGs of adult rats. Representative scotopic (A, B, C) and photopic (D, E, F) electroretinograms recorded from adult control (unexposed) rats (A, D) and rats exposed for 6 (B, E) or 14 (C, F) consecutive days to a bright luminous environment. Progressively brighter flash intensities ranging from (bottom to top) -6.3 to 0.6 log cd.sec.m^{-2} (as indicated at the left of the tracings in A) were used to generate the scotopic luminance-response function curves. Photopic ERGs were obtained at the onset of light adaptation (tracing 0 min.) and at 5 minute intervals for a total of 20 minutes as indicated at the left of the tracings shown in D. a=a-wave and b=b-wave. Small arrows point at residual b-waves. Horizontal and vertical calibrations: 20 msec and 500 µvolts (scotopic recordings) or 100 µvolts (photopic recordings), respectively. A 20-msec prestimulus baseline is included in all tracings. Vertical arrow: flash onset.

Figure 2. Representative scotopic [(mixed rod-cone ERGs and recorded rod Vmax)] and photopic (cone) ERGs recorded from control (unexposed) (A) and exposed rats (B-C). Recordings were obtained from the same rats at P30 (tracings identified 30 d.) and at P60 (tracings identified 60 d.). In several instances, the intensity of stimulation needed to reach the recorded rod Vmax varied between the 30 d. and 60 d. measurements. This is illustrated with the superposed tracings [control rat and exposed rat #1 (B)]. The dash line identifies the new rod Vmax (flash: -2.4 log cd.sec.m^{-2}) while the solid line illustrates the ERG waveform evoked to the flash intensity (-2.7 log cd.sec.m^{-2}) required to generate the rod Vmax at P30. Horizontal calibration: 20 msec. Vertical calibrations: 500 µvolts (mixed rod-cone ERGs), 200 µvolts (rod Vmax) and 100 µvolts (photopic ERGs). A 20-msec prestimulus baseline is included in all tracings. Vertical arrows: flash onset.

Figure 3. (TOP): Representative retinal sections obtained at P60 from a control (unexposed) rat (A) and from rats exposed from P0 to P14 (B-C). Results are compared to that obtained from an adult exposed for 6 consecutive days (D). (BOTTOM): Photomicrographs representative of inferior and superior retinal hemispheres taken from an adult exposed for 3 days (E) and from a neonatal exposed to the bright luminous environment from P0 to P14 (F). OS: outer segment; IS: inner segment; ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer; RPE: retinal pigment epithelium; PL: photoreceptor layer. Calibration bar: 50 µm.

Figure 4. Representative electron microscopy sections of the photoreceptor layer taken from a control (A, C) and a light-exposed (B, D) rat. Note in D, the discontinuous plasma membrane (arrows) and the disrupted staking of the disks (arrowheads) that characterize the outer segment of the exposed newborn rats. OS: outer segments; IS: inner segments; ONL: outer nuclear layer. Scale bar: 5 µm (A-B); 1 µm (C-D).

Table 1. Group data reporting the amplitudes (in µvolts) and the peak times (in msec) of the (calculated) rod Vmax, the scotopic a- and b-waves and the photopic b-wave. The ratio between ERG amplitudes measured at P60 compared to the same ERG component measured at P30 (i.e. P60/P30 %) was calculated to account for the amplitude changes due to retinal maturation. The retinal maturation index (%) represents the average of all the (P60/P30 %) for each ERG parameter [(calculated rod Vmax, rod a- and b-waves and cone b-wave)]. We also reported the retinal sensitivity (*k*) and the number of nuclei /mm2 in the outer nuclear layer obtained after quantification in controls and rats exposed from birth to P14. Abbreviations: NR: non-recordable; NA: non-applicable. All values are given as mean ± 1 S.D. Statistical analysis was performed by using the Student *t*-test.

* Statistical difference between P30 and P60 measurements for the same group (paired *t*-test).

† Statistical difference at P30 (or P60) between controls and rats exposed from birth to P14.

FIGURE 1

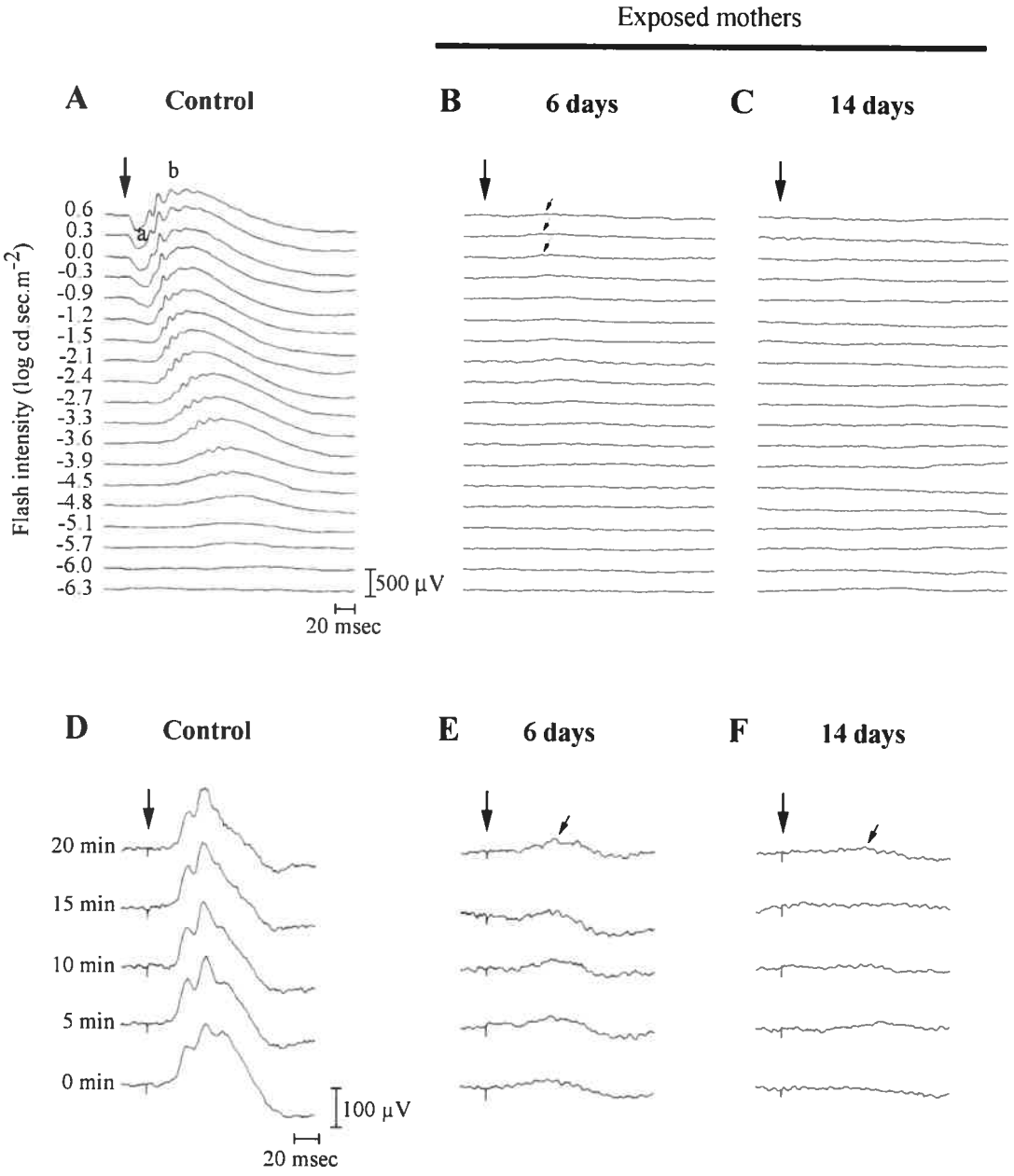

Exposed mothers
A
Control
B
6 days
C
14 days
b
a
0.6
0.3
0.0
-0.3
-0.9
-1.2
-1.5
-2.1
-2.4
-2.7
-3.3
-3.6
-3.9
-4.5
-4.8
-5.1
-5.7
-6.0
-6.3
Flash intensity (log cd sec.m-2)
500 µV
20 msec
D
Control
E
6 days
F
14 days
20 min
15 min
10 min
5 min
0 min
100 µV
20 msec

FIGURE 2

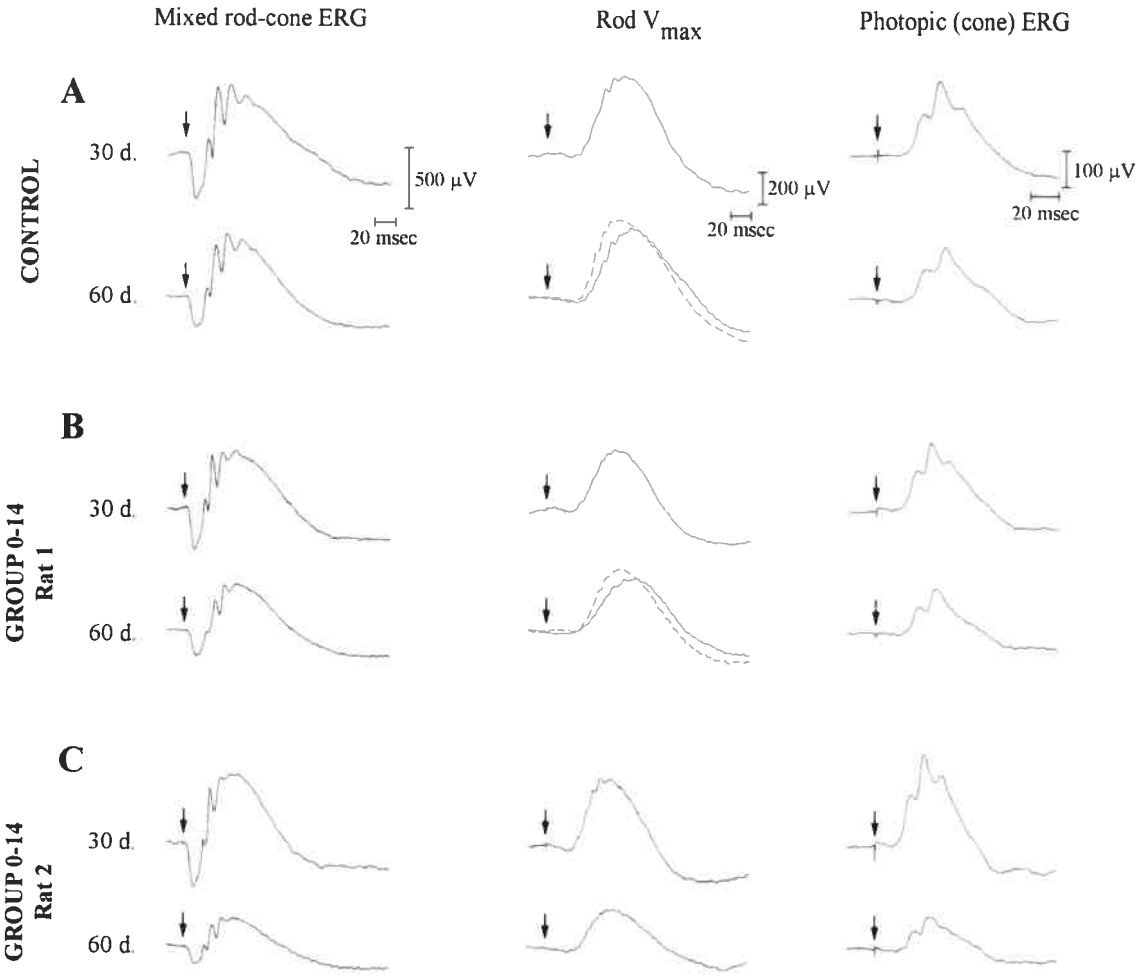

Mixed rod-cone ERG
Rod V_{max}
Photopic (cone) ERG
A
CONTROL
30 d.
60 d.
500 μV
20 msec
200 μV
20 msec
100 μV
20 msec
B
GROUP 0-14
Rat 1
30 d.
60 d.
C
GROUP 0-14
Rat 2
30 d.
60 d.

FIGURE 3

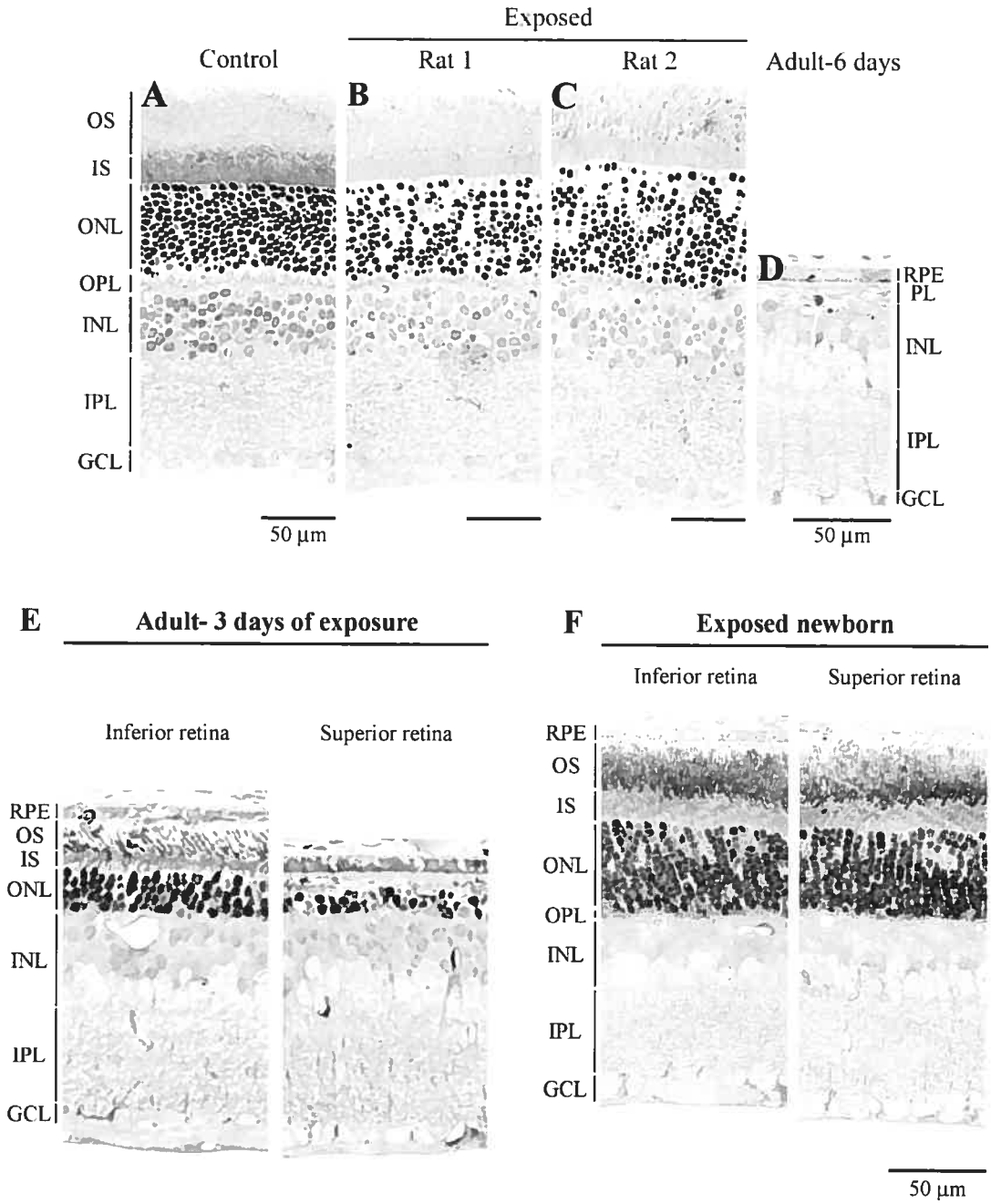
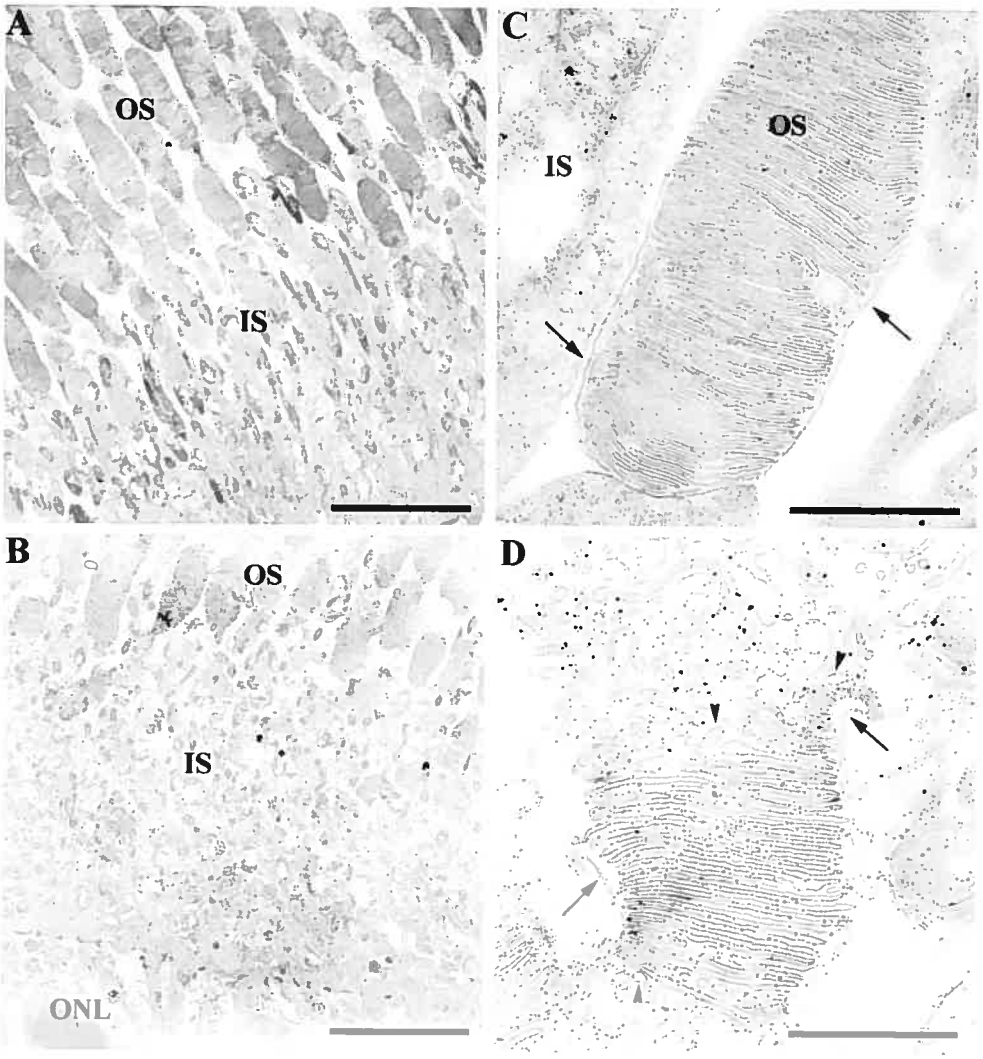

Exposed
Control
Rat 1
Rat 2
Adult-6 days
A
B
C
D
OS
IS
ONL
OPL
INL
IPL
GCL
RPE
PL
50 µm
E
Adult- 3 days of exposure
F
Exposed newborn
Inferior retina
Superior retina
RPE
OS
IS
ONL
OPL
INL
IPL
GCL
50 µm

FIGURE 4



		ADULTS	***NEWBORN RATS***	
	Age (days)	**6 days n=4**	**CONTROL n=20; 30d. n=13; 60d.**	**EXPOSED n=16; 30d. n=15; 60d.**
Rod V_{max} ± S.D. (µV)	30 60	NR	516.8 ± 84.2 433.1 ± 148.8*	543.5 ± 129.1 386.2 ± 139.9*
Maturation index (P60/P30) %			***91.0 ± 35.4 % (n=9)***	***73.1 ± 27.1 % (n=12)***
Mixed rod/cone a-wave ± S.D. (µV)	30 60	NR	313.2 ± 75.8 226.3 ± 69.0*	312.8 ± 57.7 177.5 ± 39.0*†
Maturation index			***65.2 ± 15.6 %***	***59.6 ± 18.0 %***
Peak time ± S.D. (msec)	30 60	NR	12.1 ± 1.0 13.4 ± 1.2*	12.1 ± 0.8 13.0 ± 1.4*
Mixed rod/cone b-wave ± S.D. (µV)	30 60	45.5 ± 21.8	780.9 ± 167.2 611.2 ± 194.8*	802.0 ± 132.6 511.6 ± 141.6*
Maturation index			***74.4 ± 20.8 %***	***63.8 ± 26.0 %***
Peak time ± S.D. (msec)	30 60	64.4 ± 8.5	45.6 ± 10.1 48.8 ± 5.8	47.5 ± 15.9 56.4 ± 10.3*†
Photopic cone b-wave ± S.D. (µV)	30 60	21.7 ± 12.2	164.0 ± 46.3 136.0 ± 28.0	189.9 ± 34.8 123.4 ± 31.1*
Maturation index			***67.1 ± 10.0 %***	***66.6 ± 23.6 %***
Peak time ± S.D. (msec)	30 60	53.1 ± 6.5	44.6 ± 3.5 42.2 ± 3.2*	44.4 ± 4.1 42.2 ± 3.8
Retinal maturation index		NA	**74.4 ± 23.9 % (n=36)**	**65.8 ± 23.7 % (n=48)**
Sensitivity (*k*) (log cd.sec.m^{-2})	30 60	NA	-4.08 ± 0.24 -3.99 ± 0.30	-4.14 ± 0.37 -3.99 ± 0.21
Number of nuclei/mm^2 ONL (± S.D.)	60	0	29267.8 ± 3379.5	26254.5 ± 2113.8

Table 1

CHAPITRE 3

ARTICLE 2

LIGHT-INDUCED RETINOPATHY: COMPARING ADULT AND JUVENILE RATS

Soumis à Investigative Ophthalmology and Visual Science

LIGHT-INDUCED RETINOPATHY: COMPARING ADULT AND JUVENILE RATS

Sandrine Joly[1], Vincent Pernet[2], Allison L. Dorfman[3], Sylvain Chemtob[3] and Pierre Lachapelle[1,4,*].

[1]Department of Biological Sciences, [2]Department of Pathology and Cell Biology, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada; [3]Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, Quebec, Canada; [4]Department of Ophthalmology, McGill University- Montreal Children's Hospital Research Institute, Montreal, Quebec, Canada.

Grant information: This study was supported by research grants (MOP-13383 and MOP-14639) from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), from the FRSQ-Réseau Vision as well as from the McGill University-Montreal Children's Hospital Research Institute.

Word count: 5081 words

Keywords: electroretinography; light damage; retinal development

Corresponding Author:
Pierre Lachapelle, Ph.D.
Department of Ophthalmology (D-164)
McGill University- Montreal Children's Hospital Research Institute
2300 Tupper Street,
Montreal, Quebec, Canada. H3H 1P3
Phone: (514) 412-4400 ext.23890
Fax: (514) 412-4331
[redacted]

III.1- Abstract

PURPOSE: To investigate the effect of a chronic exposure to a bright luminous environment, starting at the opening of the eyes, on the retinal structure and function of the suckling rat. **METHODS:** Juvenile Sprague-Dawley rats were exposed to 10,000 lux, for varying lengths of time, between postnatal day 14 and 34 (P14-P34). Results were compared to those obtained from adult rats exposed to the same light intensity and for the same duration. Electroretinograms (ERG) were recorded at 1 month and 2 months of age following which the retinas were harvested for histological analysis. **RESULTS:** In juvenile rats, the severity of the light-induced retinopathy (LIR) depended not only upon the duration of the exposure but also, and more importantly, on the age of the rat at the onset of exposure. For example, in adult rats a 6 day-exposure reduced the thickness of the outer nuclear layer (ONL) to less than 18% of normal, while in juvenile rats, a 6 day-exposure between P14-P20 only reduced it to 50% compared to 27% following a P28-P34 exposure. An adult-like effect could only be evidenced in rats exposed at the end of the first postnatal month (P28-P34). A similar age-dependent effect was also noted with the electroretinogram. **CONCLUSION:** Our results show that, compared to the mature retina, the developing retina appears to be relatively preserved from the devastating consequences of bright light exposure. This window of resistance to light damage gradually weakens as the juvenile rat approaches its one month anniversary.

III.2- Introduction

Numerous studies have demonstrated the deleterious effects of bright light exposure on adult retinas[1-9]. The severity of the retinal damages depends essentially on 4 factors, namely: the duration of the exposure, the intensity and the wavelength of the luminous environment as well as the type of exposure (cyclical or chronic). Although each method used to generate this retinopathy possesses its own particularities, a general degenerative pattern can nevertheless be described[10]. Light damages are rhodopsin-mediated and thus, are initiated in the outer segments of the photoreceptors where the light stimulus is transduced[9]. The first signs of degeneration are detected by electron microscopy as early as 1 hour after light exposure[11-13]. The lamellar structure of the saccules at the most external tip of the outer segments becomes disorganized, leading to membrane separation and vacuolization. The slender outer segments become rounded and then detach from the atrophied inner segments. Some pyknotic photoreceptor nuclei appear in the outer nuclear layer (ONL) along with anomalies in the retinal pigment epithelium such as an increase in the number of lysosomes. In the most extreme cases, the ONL completely disappears, while the inner nuclear layer (INL), inner plexiform layer (IPL) and the retinal ganglion cell layer (RGC) of the retina do not appear to be affected[10, 11, 13, 14]. These structural alterations are also associated with functional losses. For example, following exposure to a constant light of 1,700 lux for as little as 24 hours, eight week-old rats showed an almost complete abolition of the electroretinogram (ERG) response. This was accompanied by a marked thinning of the ONL[1, 2, 4, 15]. The processes of light damages described above are those reported for adult animals. However, very little is known if juvenile rats are exposed to the same bright light.

The development of the visual system (retinal neurogenesis and synaptogenesis) begins early in the embryonic life and lasts until the first postnatal days of life[16, 17]. In rodents, the somas of rods and cones are already present at birth and, in rats, retinogenesis is achieved near postnatal day 12 (P12)[16]. In rats, rhodopsin is detectable for the first time at P7 and an ERG can be recorded at around P12[18, 19]. In a previous study of ours, we showed that exposure to a bright luminous environment taking place prior to eye opening in neonatal rats only caused subtle functional and structural retinal damages[20]. In comparison, adult rats subjected to the same luminous environment for as little as 6 days had a nearly

abolished ERG and their retinas were devoid of photoreceptors and ONL. These results suggest that the developing retina might benefit from a relative immunity to exogenous stress agents such as bright light[20].

The purpose of this study was therefore to determine the consequences of a chronic exposure to a bright luminous environment, starting at eye opening, on the retinal structure and function of juvenile "suckling" rats. Our results suggest that the retina of the juvenile rat possesses a remarkable resistance to light damage that gradually wares off by the end of the first month of life.

III.3- Methods

III.3.1- Animals

Experiments were conducted in accordance with the ARVO Statement on the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and were approved by the McGill University-Montreal Children's Hospital Animal Care Committee. Pregnant Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories, St-Constant, Que.) were ordered at day 15 of gestation and were kept under a normal lighting environment of 80 lux (12 hours dark: 12 hours light). During the exposure period, pups and their mothers (e.g. juvenile rats were all weaned at the end of the exposure) were put into clear plexiglass cages and exposed for 12 hours/day to a bright luminous environment of 10,000 lux in intensity as measured at the floor level of each cages with a IL 1700 Research light meter (International Light, Newburyport, MA, USA). The set-up consisted of 12, 48 inches long, fluorescent tubes (Sylvania model, 34 watts, cool-white neon light; Mississauga, ON, Canada) covering the top and two sides of the cages. Rats were exposed from eyelid opening (P14) until postnatal day 17 (P14-P17; N=11), 20 (P14-P20; N=4), and 28 (P14-P28; N=17), or from P20 to P28 (N=10), or P28 to P34 (N=10). Following exposure, the rats were removed from the bright luminous environment, and maintained in the normal lighting conditions of the animal care facility (12D: 12L at 80 lux) until P60. Similarly, adult female albino rats were also exposed to the same bright luminous environment (12D: 12L at 10,000 lux) for 1 (N=9), 3 (N=3), 6 (N=4) or 14 (N=2) consecutive days or kept as controls (N=10) in the normal lighting conditions

of the animal care facilities. Female rats were chosen so that the data they generated could be added to that obtained from the mothers that had been exposed with their pups. Following exposure, the rats were returned to the normal luminous environment of the animal care facilities. Control age-matched juvenile (N=30) and adult female (N=6) rats were raised under the normal luminous environment (12D: 12L at 80 lux) of the animal care facility.

III.3.2- Electroretinography:

Electroretinograms (ERGs) were first recorded between P30 and P37 and repeated at P60. For adult rats, ERGs were obtained once, one month after the beginning of the light exposure. The ERG recordings were performed according to a protocol previously reported[21, 22]. Briefly, after a 12-hour period of dark-adaptation, rats were anaesthetized, under a dim-red light illumination, with an intramuscular injection of ketamine (85 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg). Pupils were dilated with drops of 1% cyclopentolate hydrochloride. The rats were then positioned, lying on their side, in a recording chamber of our design[23] in which the top part housed the rod desensitizing background light and a photostimulator (model PS 22, Grass instruments, Quincy, MA). The ERGs were recorded with a DTL fiber electrode (27/7 *X-Static*® silver coated conductive nylon yarn: Sauquoit Industries, Scranton, PA, USA) maintained on the cornea with 2% methylcellulose, which also prevented desiccation of the cornea. Reference (Grass E5 disc electrode, Grass Instruments, Quincy, MA, USA) and ground (Grass E2 subdermal electrode) electrodes were inserted in the mouth and subcutaneously in the tail respectively. Broadband ERGs (bandwidth: 1-1,000 Hz; 10,000 X; 6 db of attenuation; Grass P-511 amplifiers) and oscillatory potentials (bandwidth: 100-1,000 Hz; 50,000 X; 6 db of attenuation) were recorded simultaneously with the AcqKnowledge data acquisition system (Biopac MP 100 WS, BIOPAC System Inc., Goleta, CA, USA). Scotopic luminance-response functions were obtained in response to progressively brighter stimuli spanning over a 6 log-unit range (Grass PS 22 photostimulator; inter-stimulus interval: 10 sec; average of 5 flashes; 0.3 log-unit increment; maximal intensity: 0.6 log cd.s.m^{-2}). This was followed by the recording of the photopic (cone-mediated) signal (photopic background: 30 cd.m^{-2}; flash intensity: 0.9 log cd.s.m^{-2}; inter-stimulus interval: 1 sec). The recording of the photopic responses was

performed 20 minutes after the opening of the background light in order to avoid the previously reported light adaptation effect[24, 25].

III.3.3- Retinal histology

At the end of the last ERG session (at P60), the rats were sacrificed with an anesthetic overdose followed by an intracardiac perfusion with 3.5% glutaraldehyde in 0.067 M Sorensen Phosphate buffer (pH 7.4). The eyes were enucleated and immersed for 1 hour in 3.5% glutaraldehyde. The cornea and lens were then removed and the remaining of the eye was fixed in a 1% osmium tetroxide solution for 4 hours. Following sequential dehydration in baths of 50, 70, 90, 95 and 100% ethanol, the specimens were embedded in Epon resin (Mecalab, Montreal, Canada). Semithin sections, 0.7 µm-thick, were mounted on glass slides and stained with 0.1% toluidine blue. The images were examined and captured with a QImaging Retiga 1300 monochrome 10-bit CCD camera mounted on a Nikon Eclipse E-600 Microscope using the Northern Eclipse image analysis software (Empix, Imaging Inc., Canada). Except for the data shown at Figure 5, thicknesses of the retinal layers (measured with the Image-Pro Plus Imaging Software, Media Cybernetics, MD, U.S.A.) were obtained from measurements made on 8 different retinal sections taken in the superior hemisphere of the retina (control juveniles: n=3; 14-20: n=3; 14-28: n=4; 20-28: n=3; 28-34: n=3; control adults: n=4; adults exposed for 1 day: n=6, for 3 days: n=3, for 6 days: n=2, and for 14 days: n=2), since the superior retina was previously shown by others to be the most affected by bright light exposure[26]. On each section, retinal layer thicknesses were measured in five, randomly chosen, sectors.

III.3.4- Data analysis.

Analysis of the ERG waveforms was performed according to the standard practice[21, 22, 27]. The amplitude of the a-wave was measured from baseline to the most negative trough, while that of the b-wave was measured from the trough of the a-wave to the most positive peak of the retinal response. Peak times were measured from flash onset to peak. Scotopic luminance-response function curves were obtained by plotting the amplitude of the b-wave against the intensity of the flash used to evoke the response. From this curve, the V_{max} value (maximum rod mediated response) was defined as the amplitude of the b-wave measured

when an a-wave appears clearly on the ERG (e.g., a-wave threshold) and the (mixed) rod a- and b-waves referred to the ERG evoked to the highest flash luminance available. The amplitude of each oscillatory potential (OP) was measured from the preceding trough to the peak. OP amplitudes were reported as the sum of the OPs (SOPs=OP_2+OP_3+OP_4+OP_5 in scotopic conditions and OP_2+OP_3+OP_4 in photopic conditions). It should be pointed out that OP_1 was not included in the analysis as it is often difficult to identify. Statistical analysis was performed using a One-Way ANOVA, followed by a Tukey post-hoc (GraphPad Instat Software Inc., San Diego, CA).

III.4- Results

III.4.1- Effects of bright light exposure on the function of the adult and juvenile retina.

Representative scotopic and photopic ERG and OP responses obtained from adult and juvenile rats exposed or not to the bright luminous environment are presented at figures 1 (scotopic) and 2 (photopic). Group data is reported at table 1.

In adults, a one day-exposure (figure 1B) already caused a significant ($P<0.001$) reduction of the mixed (rod-cone) a- and b-wave amplitudes to 31% and 41% of normal respectively, compared to 48% ($P<0.001$) for the rod V_{max} . Similarly, the cone b-wave was also reduced to 64% of control amplitude ($P<0.05$; table 1 and Figure 2A). Increasing the exposure to 3 consecutive days (figures 1C, 2A; Table 1) did not significantly add to the amplitude attenuation already measured after 1 day of exposure. The scotopic mixed (rod-cone) a-wave completely disappeared after 6 days of bright light exposure (see figure 1D), while residual mixed (rod-cone) b-wave (6% of normal as per table 1) and photopic b-wave (14% of control, $P<0.001$; Figure 2A and table 1) could still be obtained after more than 14 days of exposure (see arrows at Fig. 1E and 2A).

Contrary to adult rats, juvenile rats exposed to the same bright environment for 3 (P14-P17 exposure interval) consecutive days did not develop significant ERG anomalies and that, irrespective of the ERG component considered (Fig. 1G and 2B, second tracing; Table 1, $P>0.05$). Increasing light exposure to 6 days (P14-P20 interval; Fig. 1H) reduced the amplitude of the mixed (rod-cone) a- and b-waves to 51% ($P<.001$) and 67% ($P<.01$) of control respectively (Table 1) while the rod V_{max} and the cone b-wave (Fig. 2B) were not

significantly attenuated. As the exposure interval lengthened, there was a gradual attenuation of the ERG signal (scotopic ERG: Figures 1I to 1K; photopic ERG: Fig. 2B, and table 1). Following the longest exposure regimen tested (P14-P28), the amplitude of the mixed (rod-cone) a-wave was less than 16% of normal while that of the mixed (rod-cone) b-wave, rod V_{max} and cone b-wave were 44%, 48% and 54% of normal respectively ($P<.001$ as per table 1). Interestingly, compared to adults exposed for 6 days to the bright luminous environment, juvenile rats exposed for the same duration still produced an ERG response albeit significantly smaller than normal, the extent of this reduction depending on the age at which the exposure started as exemplified at figure 1 as well as in table 1. For example, a 6-day exposure between P28-P34 generated a significantly more severe retinopathy (as per ERG measurements) compared to that obtained following a 6-day exposure between P14-P20 (reduction to 3% and 51% of the control value for the a-wave and to 11% and 67% for the b-wave in P28-P34 and P14-P20 respectively). Similarly, a 6-day exposure between P28-P34 caused a more severe retinopathy than that obtained following an 8-day exposure between P20-P28 (reduction to 17% of the control value for the a-wave and to 31% for the b-wave following P20-P28 exposure). It is worth mentioning that, irrespective of the duration of exposure (adults) or the exposure regimen considered (juvenile rats), the scotopic ERGs were always significantly ($P<.05$; compare mixed rod-cone b-wave and cone b-wave measurements at table 1) more attenuated than the photopic ERGs, suggesting that rods are significantly more susceptible to the bright light insult and that this retinopathy mostly (or initially) affects rod function.

The oscillatory potentials (scotopic OPs: Fig. 1L; photopic OPs: Fig. 2C) were also affected following exposure to the bright luminous environment. Six days of continuous exposure completely abolished the scotopic and photopic SOPs of adult rats (Table 1), while in juvenile rats there was a gradual decrease in the amplitude of the scotopic (Fig. 1L) and photopic OPs (Fig. 2C), an effect also measurable with the data found at Table 1. However, as acknowledged above, for an equal duration of exposure, the OPs of juvenile rats were better preserved than those of adult rats (table 1). For instance, 3 days of exposure in adult rats reduced the scotopic and photopic SOPs to 50% and 83% of normal amplitude respectively. Similarly, a 6-day exposure between P14 and P20 reduced the rod SOPs to 71% of normal amplitude but had no measurable impact on the photopic SOPs, while a 6-

day exposure between P28 and P34 reduced the scotopic and photopic SOPs to less than 8% and 19% of normal amplitudes respectively. Again, irrespective of the age of the rat, the rod-mediated OPs were always significantly more affected than the cone-mediated OPs.

III.4.2- Effects of bright light exposure on the structure of the adult and juvenile retina.

In adult rats, the outer retinal layers were all rapidly and significantly decreased following as little as 1 day of exposure (OS: 15% of normal, IS: 14%, ONL: 32% and OPL: 10%; P<.001; Figures 3B and 4A). Increasing the exposure to 3 days (Fig. 4A) did not significantly add to what was readily observed after 1 day of exposure, while increasing it to 6 days (Fig. 3D and 4A) led to the complete disappearance of the OS, IS and OPL, while the ONL was reduced to 17% of normal (P<.001), a value that was further attenuated to 13% of control thickness after 14 days of exposure (Fig. 3E, 4A). It is of interest to note that layers below the OPL were never (except for a slight but significant increase in thickness of GCL following 6 days of exposure) altered following exposure to the bright luminous environment (Fig. 4A).

In juvenile rats, most of the damages resulting from bright light exposure were also concentrated in the outer retinal layers. Of interest however, while the thinning of the outer retinal layers (OS, IS, ONL and OPL) measured following the P14-P20 exposure was not significantly enhanced (figures 3G, 4B) with longer exposure intervals (P14-P28 or P20-P28), a different picture emerged following the P28-P34 exposure which resulted in the near complete destruction of all the retinal layers above the inner nuclear layer (figure 3J). As indicated in figure 4B, outer and inner segments of photoreceptors as well as the outer plexiform layer completely disappeared, while a residual (13% of normal thickness; P<0.001) outer nuclear layer remained. This roughly represented a one-nucleus thick layer as illustrated at figure 3J.

Interestingly, results presented at figure 4B also suggest that the more aggressive exposure regimens significantly increased the thickness of the INL. This phenomenon could not be attributed to the normal maturation process of the retina, since as illustrated at figures 3K-M and figure 4C, the thickness of the retina normally decreases as the rat ages, this being most noticeable for the ONL, OPL, INL and GCL. In contrast, the OS lengthens

during the same period and the content of the ONL nuclei appears fragmented in rats aged 14 days (3N) compared to older rats (3O). Of interest as the ONL becomes thinner so does the INL (Figure 4C), unlike what is observed in retinas of juvenile rats exposed to the bright light source (Figure 4B). In order to explore this further, we compared (figures 4D-E) the thickness of the ONL with that of the INL taken from the retinas of juvenile rats following the different exposure regimens (Fig. 4B). Similar correlations were also obtained from the data taken from the adult retinas (normal and exposed: Fig. 4A) as well as that resulting from the normal maturation of the juvenile rat retinas (Fig. 4C). As expected from the data shown at figure 4C, a high correlation coefficient associates the two events (Figure 4E: solid line) indicating that as the juvenile retina matures, both nuclear layers see their thicknesses reduce. This relationship was however strikingly different from that evidenced with the data obtained from the juvenile rats exposed to the bright light environment, where the gradual thinning of the ONL appears to be "compensated" by a proportional increase in thickness of the INL, the two events being, again, highly correlated (figure 4E, dotted line). Of interest, a similar "compensation phenomenon" could not be evidenced with the adult (exposed) retina (figure 4D) where, for all intended purposes, the thickness of the INL remains the same despite the progressive disappearance of the ONL, thus explaining the poor correlation coefficient obtained.

Previous reports[26] have evidenced a regional difference in the reaction of the retina to bright light exposure where the superior (dorsal) retina was always significantly more affected (at histology) than the inferior (ventral) retina. We examined if a similar differential effect could also be evidenced in our juvenile rats (Figure 5). If one only takes into consideration the thickness of the ONL, a striking difference in reaction to light between the superior and inferior retina clearly stands out. In adults, following 6 consecutive days of exposure, there is a complete destruction of the superior ONL (Figure 5D) while a two nuclei thick ONL persists in the inferior retina (Figure 5H; compared to a 12.5 ± 0.7 rows of nuclei in normal). In comparison, following the P14-P20 exposure, the superior ONL of the juvenile retina (Figure 5B; also normally composed of 12 rows of nuclei) drops to 5.3 ± 0.6 rows of nuclei (42% of normal) compared to 8.7 ± 1.2 (70% of normal) for the inferior ONL (Figure 5F; n=3; Student *t*-test, $P<0.05$). A further reduction

to 3.8 ± 0.5 (30% of normal) and 6.5 ± 0.6 (52% of normal) rows of nuclei for the superior (Figure 5C) and inferior ONL (Figure 5G) respectively (n=4; Student *t*-test, P<0.001) is obtained following the P14-P28 regimen. The hemispheric difference in the kinetic of this light-induced retinal degeneration is summarized at figure 5I where the number of nuclei in the inferior and superior ONL of juvenile (black squares) and of adult (white squares) retinas are compared. Each data point represents the cellular count obtained following light exposure of predetermined durations, as indicated numerically above each data point. The light-induced retinal degeneration was slower (i.e. lower slope value) in young (dashed line) compared to older (solid line) retinas. Moreover, the y-intercept values reveal that a completely destroyed superior ONL corresponds to a 4 layers of nuclei inferior ONL in the juvenile retina compared to approximately 2 rows of nuclei in the adult retinas, stressing once more the increased resistance of the juvenile retina to the light-induced retinopathy.

III.4.3- Maturation of the light damaged retina.

In a previous study[20], we presented ERG evidences suggesting that the retinopathy induced following postnatal exposure to a bright luminous environment was degenerative, rather than destructive, in nature. With time away from the end of the exposure period, the retinal potentials became more severely attenuated. In order to examine if a similar trend could also be evidenced in the present study, we devised the ERG maturation index parameter, which represents the ratio between ERG amplitudes measured at P60 compared to the same ERG component measured at P30 (i.e. P60/P30 X 100 %). Results from this data manipulation are illustrated at figure 6. As previously documented by us[21, 22], the normal maturation of the rat retina (from P30 to P60) is accompanied by a reduction in ERG amplitudes. For exposure regimens that were terminated prior to P28, the maturation indexes were similar (albeit smaller in most cases) to that measured in normal rats. In contrast, for exposure regimens that ended at or after P28 (especially P14-P28, P20-P28 and P28-P34), the maturation indexes were significantly larger than those measured in normal rats, suggesting that the normal course of the retinal maturation process was significantly altered as a result of late postnatal exposure to a bright luminous environment.

Our findings thus clearly suggest that compared to adult rats, the retinas of juvenile rats exhibit a remarkable resistance to light damages. This is best summarized at figure 7 where the effect of bright light exposure on the structure (thickness of the total retina and ONL) and function (rod a- and b-waves, rod V_{max} and cone b-wave) of the adult (Fig. 7A) and juvenile (Fig. 7B) retina are compared. While in adult rats there is a clear evidence of a dose-response effect (structure and function), the latter is less obvious in data obtained from the juvenile rat. In juvenile rats, the effect of bright light exposure on retinal structure or function depends, not only, on the duration of exposure but also on the degree of retinal maturation at onset of exposure.

III.5- Discussion

Results presented above support the claim that following exposure to a bright luminous environment, the retina of the juvenile rat is significantly less damaged (structure and function) than that of the adult rat retina. Of all the ERG components considered, the rod a-wave (adult and juvenile responses) is that most affected by the intense luminous environment (Figure 7, table 1), supportive of a previous claim that LIR is rhodopsin mediated[9]. This is followed (juvenile and adult responses) by the rod b-wave, rod V_{max} and finally the cone b-wave, suggesting that the sequence of events leading to the full expression of this LIR is the same irrespective of the age of the rats. Unfortunately, for reasons that remain to be explained, rat retinas do not generate a recordable photopic (cone-mediated) a-wave[28, 29] and consequently it is impossible, with our data, to state if the cone photoreceptor (structure and/or function) itself is also directly impaired by the bright luminous environment. However, the fact that the cone b-wave is also significantly reduced strongly suggests that this might be the case although one cannot completely rule out an indirect effect (such as via the rod pathway) at the retinal site where the cone b-wave is generated (for example ON depolarizing bipolar cells receiving rod and cone input[30]). Another possible mechanism is also suggested below.

Presumably as a result of this gradual loss in photoreceptor cells, there is also a significant thinning of the OPL (Fig. 4B). No other retinal layers (of adult or juvenile retinas) were reduced as a result of exposure to the bright luminous environment, suggesting that death of the photoreceptor cells alone explains the functional deficits

(attenuation in ERG a- and b-waves as well as OPs) obtained following exposure. Conversely, our results also suggest that compared to adults, the photoreceptors of the juvenile rat retina are partially protected from the deleterious effects of bright light. This is in sharp contrast with previous results of ours obtained following the postnatal exposure to hyperoxia which showed that the functional consequences (reduced b-wave and OPs with spearing of a-wave) were tied to the specific alterations of the deeper retinal layers while the photoreceptor layer remained unaffected[21, 22].

Strikingly, rod and cone photoreceptors were not similarly affected by the bright luminous environment: rods appeared to be more sensitive to light damage compared to the cones. As shown at figure 7B and table 1, cones required significantly more light (i.e. exposure of longer duration) than rods in order to yield equivalent b-wave reductions. The above supports previous reports indicating that, at least in rodents, the light-induced retinopathy is rhodopsin mediated[6, 9, 31, 32], thus explaining the response discrepancy of rods and cones following bright light exposure. If indeed light-induced retinal abnormalities (in structure and function) are rhodopsin mediated, how can we explain our demonstration of cone b-wave anomalies? Previous studies suggested that the degeneration of cones might be induced by the massive release of neurotransmitters and/or potentially toxic ions by the dying rods[33] or the consequence of the loss of some trophic supports usually provided by the rods[33, 34]. Supportive of the latter concept, a rod-secreted surviving factor, namely the Rod-derived Cone Viability Factor (RdCVF), was recently identified in an *in vitro* model of *rd* mouse retina[35, 36]. The fact that the light induced anomaly is observed fairly early into the process (rather than cone function starting to degenerate only once rod function is completely abolished) could support the above concept.

Comparative analysis of the recordings taken at P30 and at P60 days revealed a small (but non-significant) enhancement (i.e. P30 amplitude measurements > P60 amplitude measurements) of the ERG anomalies evidenced at P30 (Table 1) for rats exposed prior to P28, suggesting that the retinopathy induced following light exposure (measurements taken at P30) could deteriorate with time (measurements at P60). Again this is in sharp contrast with the oxygen-induced retinopathy where, for all intended purpose, recordings obtained at P60 were not different from those obtained at P30; the only differences being attributable to the normal maturation process[21, 22]. As illustrated at table 1

and figure 6, during the normal maturation of the retina, there is a gradual decrease in amplitude of all the ERG parameters (rod a- and b-waves, Rod V_{max} and cone b-wave) such that the ERG amplitudes measured at P60 are significantly smaller than those measured at P30. This is consistent with previous reports that compared ERG responses taken at P30 and P60 in normal rats[21, 22, 37]. However, the exact reverse (i.e. P60 measurements > than P30 measurements) is observed for exposure intervals including P28 and after (P14-P28, P20-P28 and P28-P34). It could be that the first ERG recording (i.e. between P30 and P37) was too close to the end of the bright light exposure and thus, the photoreceptors did not have sufficient time to partly recover from the possible reversible effect of bright light exposure [38, 39, 40]. Clearly this phenomenon will need to be further investigated.

Our results also showed that the superior retina was more affected than the inferior retina after bright light exposure (Figure 5), a finding consistent with previous reports obtained with the adult rat [9, 26, 41-43]. Of interest however, the kinetic of the light-induced retinopathy is much slower in juvenile rats compared to adult rats (Fig. 7), a feature that further distinguishes adult from juvenile LIR. Similarly, this kinetic is much slower in the inferior retina compared to the superior retina (see figure 5I).

Finally, our results also demonstrated an interesting phenomenon of the juvenile rat retinas where the progressive thinning of the ONL (resulting from the exposure) is accompanied by a gradual increase in thickness of the INL (Fig. 4D-E), a phenomenon not observed when the adult retina is subjected to the same stress or during the normal maturation process of the retina. This could suggest a compensation phenomenon where the INL would increase its synaptic contacts in order to amplify the lower signal generated by the impaired outer retinal layers in order to generate a close to normal retinofugal output, a phenomenon that could only be evidenced when using a developing retina model. Of interest, we did not observed a similar compensation phenomenon with our model of oxygen-induced retinopathy[21,22]. Supportive of this compensation hypothesis are previous studies reporting some neural remodelling following retinal degeneration[3, 44], such as migration of RPE cells into the retina, hypertrophy and migration of Müller cells, hypertrophy of the soma of horizontal cells. A similar remodelling process has also been described in an animal model of retinitis pigmentosa namely the *rd/rd* mutant mice[45, 46].

The increase in thickness of the INL we observe in our model of light-induced degeneration could have followed one of the remodelling scenario suggested above.

In summary, our results show that compared to adults, the retina of juvenile rats is relatively preserved from the deleterious effect of bright light exposure until approximately one month of age. Further investigations will be necessary in order to determine the mechanisms at the origin of this endogenous resistance.

Acknowledgements

This study was supported by research grants (MOP-13383 and MOP-14639) from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), from the FRSQ-Réseau Vision as well as from the McGill University-Montreal Children's Hospital Research Institute. We wish to thank Hakima Moukhles, Ph.D. for use of the ultramicrotome and also Louise Pelletier, MSc, for her technical assistance with the electron microscopy.

III.6- References

1. Li F, Cao W, Anderson RE. Protection of photoreceptor cells in adult rats from light-induced degeneration by adaptation to bright cyclic light. *Exp Eye Res* 2001;73:569-77.

2. Penn JS, Thum LA, Naash MI. Photoreceptor physiology in the rat is governed by the light environment. *Exp Eye Res* 1989;49:205-15.

3. Marc RE, Jones BW, Watt CB, Strettoi E. Neural remodeling in retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2003;22:607-55.

4. Penn JS, Thum LA. A comparison of the retinal effects of light damage and high illuminance light history. *Prog Clin Biol Res* 1987;247:425-38.

5. Organisciak DT, Darrow RM, Barsalou LS. Light-induced retinal degeneration. In: Levin LA, Di Polo A, editors. *Ocular neuroprotection.* New York Basel: Marcel Dekker, Inc, 2003:85-107.

6. Organisciak DT, Winkler BS. Retinal light damage: Practical and theoretical considerations. *Prog Retin Eye Res* 1994;13:1-29.

7. Organisciak DT, Jiang YL, Wang HM, Pickford M, Blanks JC. Retinal light damage in rats exposed to intermittent light. Comparison with continuous light exposure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:795-805.

8. O'Steen WK, Anderson KV, Shear CR. Photoreceptor degeneration in albino rats: dependency on age. *Invest Ophthalmol* 1974;13:334-9.

9. Noell WK, Walker VS, Kang BS, Berman S. Retinal damage by light in rats. *Invest Ophthalmol* 1966;5:450-73.

10. Wenzel A, Grimm C, Samardzija M, Reme CE. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2005;24:275-306.

11. O'Steen WK, Shear CR, Anderson KV. Retinal damage after prolonged exposure to visible light. A light and electron microscopic study. *Am J Anat* 1972;134:5-21.

12. Grignolo A, Orzalesi N, Castellazzo R, Vittone P. Retinal damage by visible light in albino rats. An electron microscope study. *Ophthalmologica* 1969;157:43-59.

13. Kuwabara T, Gorn RA. Retinal damage by visible light. An electron microscopic study. *Arch Ophthalmol* 1968;79:69-78.

14. Zhang C, Lei B, Lam TT, Yang F, Sinha D, Tso MO. Neuroprotection of photoreceptors by minocycline in light-induced retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2753-9.

15. Li F, Cao W, Anderson RE. Alleviation of constant-light-induced photoreceptor degeneration by adaptation of adult albino rat to bright cyclic light. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4968-75.

16. Rapaport DH, Wong LL, Wood ED, Yasumura D, LaVail MM. Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol* 2004;474:304-24.

17. Cepko CL, Austin CP, Yang X, Alexiades M, Ezzeddine D. Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:589-95.

18. Weidman TA, Kuwabara T. Postnatal development of the rat retina. An electron microscopic study. *Arch Ophthalmol* 1968;79:470-84.

19. Bonting SL, Caravaggio LL, Gouras P. The rhodopsin cycle in the developing vertebrate retina. I. Relation of rhodopsin content, electroretinogram and rod structure in the rat. *Exp Eye Res* 1961;1:14-24.

20. Joly S, Pernet V, Dorfman A, Moukhles H, Chemtob S, Lachapelle P. Functional and structural consequences of postnatal exposure to a bright luminous environment on the retina of newborn rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:ARVO E-Abstract 1870.

21. Dembinska O, Rojas LM, Varma DR, Chemtob S, Lachapelle P. Graded contribution of retinal maturation to the development of oxygen-induced retinopathy in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1111-8.

22. Dembinska O, Rojas LM, Chemtob S, Lachapelle P. Evidence for a brief period of enhanced oxygen susceptibility in the rat model of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2481-90.

23. Lachapelle P, Blain L. A new speculum electrode for electroretinography. *J Neurosci Methods* 1990;32:245-9.

24. Lachapelle P. Analysis of the photopic electroretinogram recorded before and after dark adaptation. *Can J Ophthalmol* 1987;22:354-61.

25. Peachey NS, Goto Y, al-Ubaidi MR, Naash MI. Properties of the mouse cone-mediated electroretinogram during light adaptation. *Neurosci Lett* 1993;162:9-11.

26. Rapp LM, Naash MI, Wiegand RD, Joel CD, Nielson JC, Anderson RE. Morphological and biochemical comparisons between retinal regions having differing susceptibility to photoreceptor degeneration. In: Liss AR, editor. *Retinal degeneration: Experimental and clinical studies*, 1985:421-437.

27. Marmor MF, Zrenner E. Standard for clinical electroretinography (1999 update). International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. *Doc Ophthalmol* 1998;97:143-56.

28. Fonteille VL, Racine J, Joly S, Dorfman AL, Rosolen SG, Lachapelle P. Do Rats Generate a Photopic a–Wave? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:ARVO E-Abstract 2246.

29. Rosolen SG, Rigaudiere F, LeGargasson JF, et al. Comparing the photopic ERG i-wave in different species. *Vet Ophthalmol* 2004;7:189-92.

30. Kolb H. The architecture of functional neural circuits in the vertebrate retina. The Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:2385-404.

31. Reme CE, Bush R, Hafezi F, Wenzel A, Grimm C. Photostasis and beyond- Where adaptation ends. In: Williams, Thistle, editors. *Photostasis and Related Phenomena.* New York: Plenum Press, 1998:199-206.

32. Grimm C, Wenzel A, Hafezi F, Yu S, Redmond TM, Reme CE. Protection of Rpe65-deficient mice identifies rhodopsin as a mediator of light-induced retinal degeneration. *Nat Genet* 2000;25:63-6.

33. Farber DB, Flannery JG, Bowes-Rickman C. The rd mouse story: Seventy years of research on an animal model of inherited retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 1994;13:31-64.

34. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992;356:397-400.

35. Mohand-Said S, Deudon-Combe A, Hicks D, et al. Normal retina releases a diffusible factor stimulating cone survival in the retinal degeneration mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:8357-62.

36. Leveillard T, Mohand-Said S, Lorentz O, et al. Identification and characterization of rod-derived cone viability factor. *Nat Genet* 2004;36:755-9.

37. Rapp LM, Tolman BL, Koutz CA, Thum LA. Predisposing factors to light-induced photoreceptor cell damage: retinal changes in maturing rats. *Exp Eye Res* 1990;51:177-84.

38. Young RW. The renewal of photoreceptor cell outer segments. *J Cell Biol* 1967;33:61-72.

39. Young RW. Visual cells and the concept of renewal. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1976;15:700-25.

40. Noell WK. There are different kinds of retinal light damage in the rat. In: Williams TP, Baker BN, editors. *The effects of constant light on visual processes*. New York: Plenum Press, 1980:3-28.

41. Gordon WC, Casey DM, Lukiw WJ, Bazan NG. DNA damage and repair in light-induced photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:3511-21.

42. Rapp LM, Williams TP. A parametric study of retinal light damage in albino and pigmented rats. In: Williams TP, Baker BN, editors. *The effects of constant light on visual processes.* New York: Plenum Press, 1980:135-159.

43. LaVail MM, Matthes MT, Yasumura D, Steinberg RH. Variability in rate of cone degeneration in the retinal degeneration (rd/rd) mouse. *Exp Eye Res* 1997;65:45-50.

44. Jones BW, Marc RE. Retinal remodeling during retinal degeneration. *Exp Eye Res* 2005;81:123-37.

45. Strettoi E, Porciatti V, Falsini B, Pignatelli V, Rossi C. Morphological and functional abnormalities in the inner retina of the rd/rd mouse. *J Neurosci* 2002;22:5492-504.

46. Strettoi E, Pignatelli V, Rossi C, Porciatti V, Falsini B. Remodeling of second-order neurons in the retina of rd/rd mutant mice. *Vision Res* 2003;43:867-77.

III.7- Figures

Figure 1. Representative scotopic ERGs (A-K) and OPs (L) recorded in adults (A-E) and in juvenile rats (F-K and L). ERGs were obtained from control (unexposed) adults (A), in 30 day-old control (unexposed) juvenile rat (F), in adults exposed for 1 day (B), 3 days (C), 6 days (D) and 14 consecutive days (E) and in rats exposed at different time intervals during the first postnatal month (G-K) to a bright luminous environment. Regimens of exposure are indicated at the top of each column (F-K). In adults, ERG recordings were performed one month after the beginning of the light exposure and between P30 and P37 in juvenile rats. Progressively brighter flashes (*bottom* to *top*) from -6.3 to 0.6 log cd.sec.m^{-2} (as indicated at the left of the tracings in A) were used to establish the luminance-response function curves. a and b on the control tracing (column A and F, intensity 0.6) identify the ERG a- and b-waves respectively. The oblique black arrows point at remnants of the b-wave recorded following exposures of 6 (D) and 14 (E) consecutive days in duration. In L are shown representative scotopic OPs obtained from a normal (unexposed) rat (tracing C) and rats exposed to the bright luminous environment during the different exposure regimens as indicated at the left of each tracing. Flash intensity: 0.6 log cd.sec.m^{-2}. OPs are numerically identified as shown in the control tracings. Horizontal calibrations and vertical calibrations: 40 msec and 500 µvolts (ERGs); 20 msec and 50 µvolts (OPs), respectively. A 20-msec pre-stimulus baseline is included in all tracings. Vertical arrows indicate flash onset.

Figure 2. Representative photopic ERGs (A-B) and OPs (C) recorded from adult (A) and and juvenile (B-C) rats. The duration of exposure (in days; A) as well as the different exposure regimens (exposure intervals in postnatal days; B) are indicated on the left of each tracing. In both groups, "C" (*first tracing*) identifies the response recorded from the control (unexposed) rat. In the adult rats, residual cone b-wave are identified with obliquely oriented black arrows (tracings 6 and 14). In C are shown representative photopic OPs obtained from a normal (unexposed) rat (tracing C) and juvenile rats exposed to the bright luminous environment during the different exposure regimens as indicated at the left of each tracing. Flash intensity: 0.6 log cd.sec.m^{-2}. OPs are numerically identified as shown in the control tracings. Horizontal calibrations and vertical calibrations: 20 msec (ERGs and OPs) and 50 μvolts (ERGs) or 5 μvolts (OPs), respectively. A 20-msec pre-stimulus baseline is included in all tracings. Vertical arrows indicate flash onset.

Figure 3. (A-E): Representative photomicrographs of retinas obtained from a normal (unexposed) adult rat (A) and from adult rats exposed for 1 day (B), 3 days (C), 6 days (D) or 14 consecutive days (E) to the bright luminous environment. (F-J): Representative photomicrographs of retinas obtained from a normal (unexposed) juvenile rat (F) and from juvenile rats exposed during the different exposure regimens (as indicated on the top of each retina). (K-O): Representative photomicrographs of retinas obtained at P14 (K), P20 (L) and P28 (M) illustrating the normal development of the retina in juvenile rats. N and O represent a magnified view of the ONL at P14 (N) and at P28 (O). Abbreviations: RPE: retinal pigment epithelium; OS: outer segments; IS: inner segments; ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer. FL: nerve fiber layer. Calibration bars: 50 μm (A-M) and 25 μm (N, O).

Figure 4. (A-B): Measurements of the retinal layer thicknesses (ordinate: μm ± 1 S.D.) in adults (A) and in juvenile rats (B). Given the difficulty in accurately dissociating the different retinal layers, the ONL data of the 28-34 day group includes what is left of the outer and inner segments, the ONL and the OPL (B). (C): Measurements of the different retinal layers obtained at the different postnatal age as indicated with the accompanying legend. Statistical analysis was performed using a One-Way ANOVA followed by a post-hoc Tukey test comparing data obtained from all the exposure regimens with controls (* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$), as well as a Student *t*-test (†, $P<0.05$) between non-exposed adults and adults exposed for 3 days (A). Abscissa: Retina: thickness of the entire retina; RPE: retinal pigment epithelium; OS: outer segments; IS: inner segments; ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer; FL: nerve fiber layer.

(D-E): Correlation between the thicknesses of the ONL and INL (μm ± 1 S.D.) of retinas obtained from exposed adults (A) and in juvenile rats (B) following exposure to bright light (dotted line and square data points) and during development (solid line and triangular data points). Numerals next to each data points indicate the duration of exposure (in days) for adult (A) and juvenile rats (B: dotted line) or the age of the juvenile rat at the time the retina was excised (B: solid line). r identifies the correlation coefficients calculated from each regression curve.

Figure 5. Representative photomicrographs of the superior (A-D) and inferior (E-H) retinas of control (unexposed) rats (A, E), rats exposed from postnatal day 14 to 20 (B, F), from postnatal day 14 to 28 (C, G) and from adults exposed for 6 consecutive days (D, H) to the bright luminous environment. In I are compared the linear regression curves obtained when correlating the superior (abscissa) and inferior (ordinate) ONL thicknesses (in number of nuclei units) of juvenile (black squares, dashed line) and adult (white squares, solid line) retinas. Each data point represents the cellular count obtained following light exposure of predetermined duration as indicated numerically above each data point. The correlation coefficient (r) and the slope are indicated next to each curve. Abbreviations: RPE: retinal pigment epithelium; OS: outer segments; IS: inner segments; ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer; FL: nerve fiber layer. Scale bar: 50 μm.

Figure 6. Retinal maturation measured for control (unexposed) and exposed juvenile retinas. The index of retinal maturation index represents the average (in %) of the ratios (P60/P30 X 100) for each ERG parameter (rod a-wave, rod b-wave, rod V_{max} and cone b-wave). Values are given as mean ± 1 S.D. Statistical analysis was done with a One-Way ANOVA followed by a post-hoc Tukey test (* $P<0.05$, *** $P<0.001$).

Figure 7. Summary of findings illustrating the kinetics of the light-induced retinal degeneration in adult (A) and in juvenile (B) rats. In adults, the gradual loss in amplitude of the ERG waves and thickness of ONL and total retina (ordinate: in % of control values) are plotted against the duration of exposure (indicated in days on the abscissa) while in juvenile rats, it is plotted against the age at offset of exposure (in "days" on the abscissa). In juvenile rats, the duration of the exposure is indicated in days on top of each data point (B).

Table 1. Group data reporting the amplitudes (in μvolts) of the scotopic a- (mixed rod-cone a-wave) and b- (mixed rod-cone b-wave) waves, rod V_{max}, photopic b-wave (cone b-wave), scotopic and photopic SOPs measured in control and exposed rats. Light exposure regimens are indicated in the first column while the second column indicates the age of the rats (30 or 60 days) at time of data collection. All values are given as mean ± 1 S.D. Statistical analysis was done with a One-Way ANOVA followed by a post-hoc Tukey test (* $P<0.05$; ‡ $P<0.01$; † $P<0.001$) between controls and exposed rats at 30 and 60 days of age. A Student *t*-test was also used to compare control adults and adults exposed for 3 days (§, $P<0.05$).

FIGURE 1

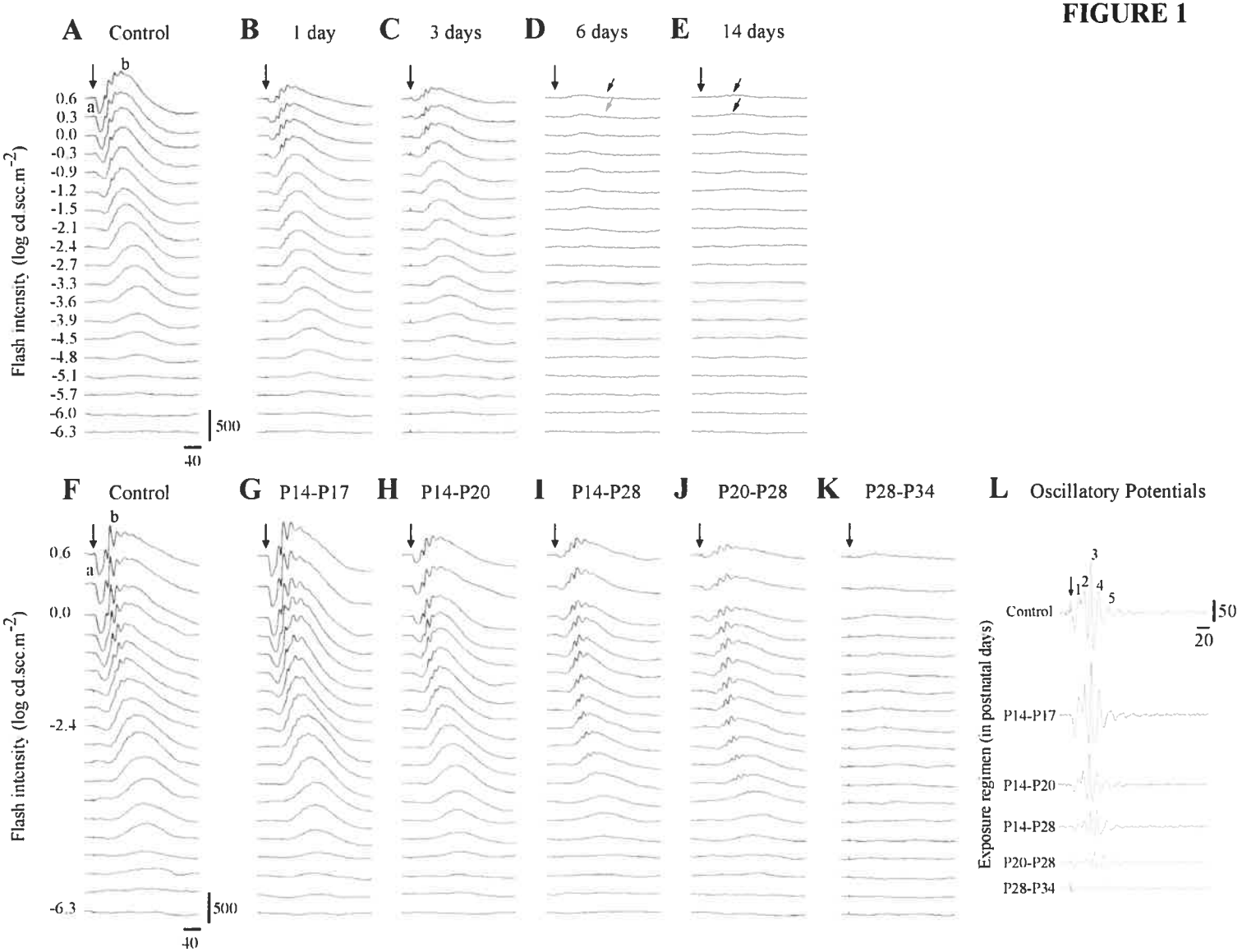

A Control
B 1 day
C 3 days
D 6 days
E 14 days
Flash intensity (log cd.scc.m-2)
0.6
0.3
0.0
-0.3
-0.9
-1.2
-1.5
-2.1
-2.4
-2.7
-3.3
-3.6
-3.9
-4.5
-4.8
-5.1
-5.7
-6.0
-6.3
a
b
500
40
F Control
G P14-P17
H P14-P20
I P14-P28
J P20-P28
K P28-P34
L Oscillatory Potentials
Flash intensity (log cd.scc.m-2)
0.6
0.0
-2.4
-6.3
Exposure regimen (in postnatal days)
Control
P14-P17
P14-P20
P14-P28
P20-P28
P28-P34
1
2
3
4
5
50
20

FIGURE 2

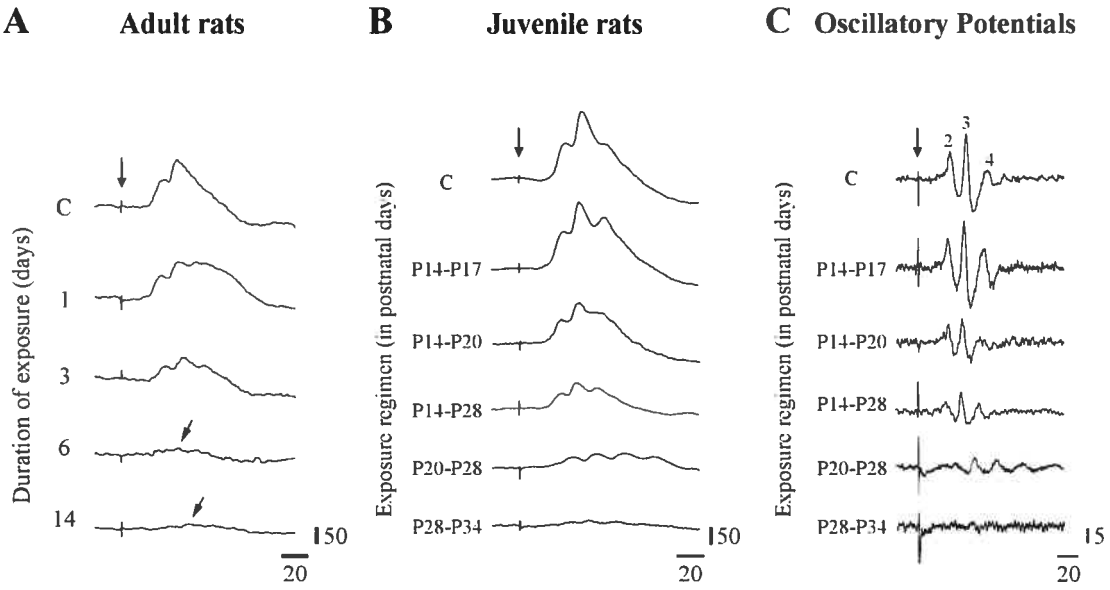

A
Adult rats
B
Juvenile rats
C
Oscillatory Potentials
Duration of exposure (days)
C
1
3
6
14
150
20
Exposure regimen (in postnatal days)
C
P14-P17
P14-P20
P14-P28
P20-P28
P28-P34
150
20
Exposure regimen (in postnatal days)
C
P14-P17
P14-P20
P14-P28
P20-P28
P28-P34
2
3
4
15
20

FIGURE 3

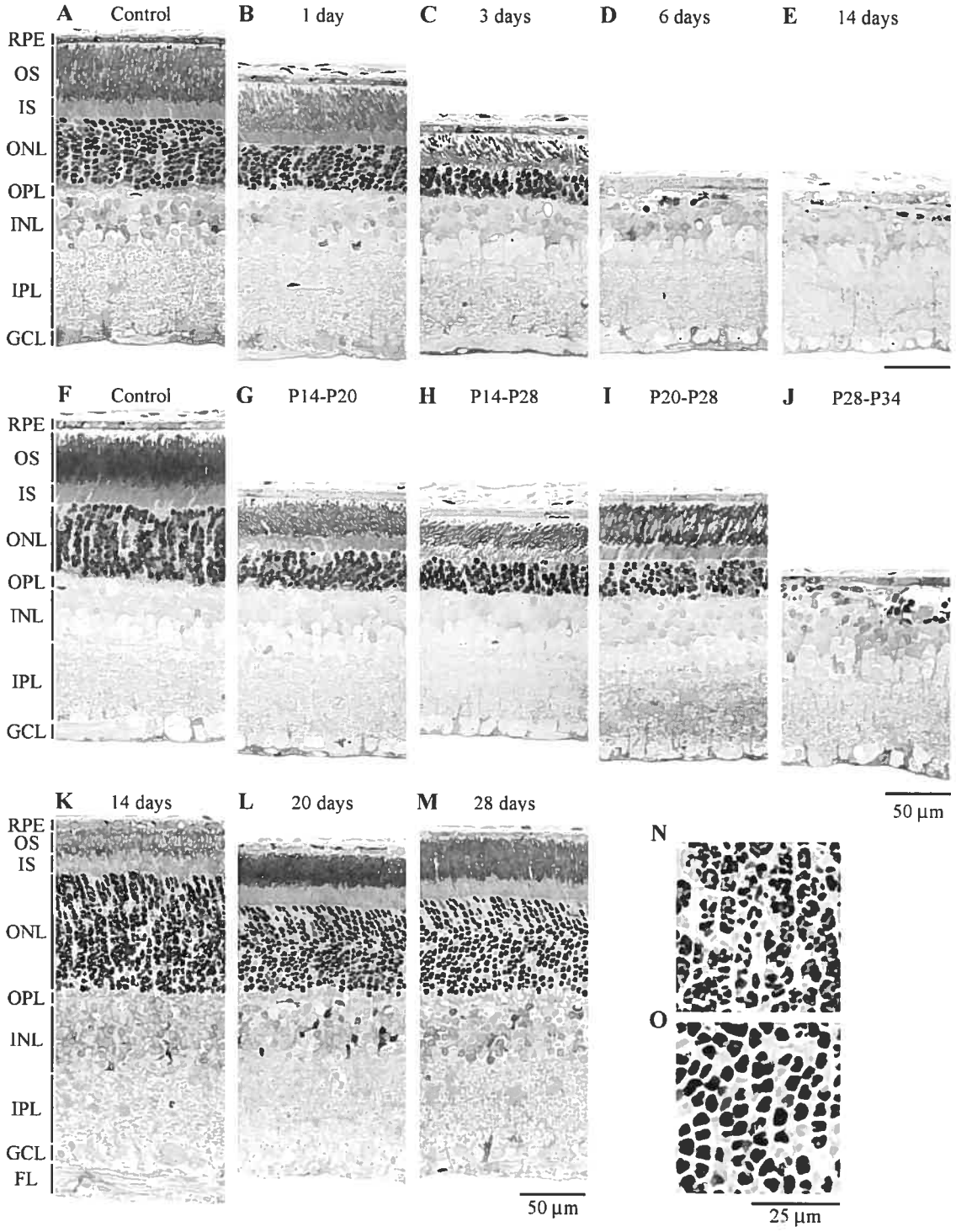

A Control
B 1 day
C 3 days
D 6 days
E 14 days
RPE
OS
IS
ONL
OPL
INL
IPL
GCL
F Control
G P14-P20
H P14-P28
I P20-P28
J P28-P34
50 µm
K 14 days
L 20 days
M 28 days
FL
50 µm
N
O
25 µm

FIGURE 4

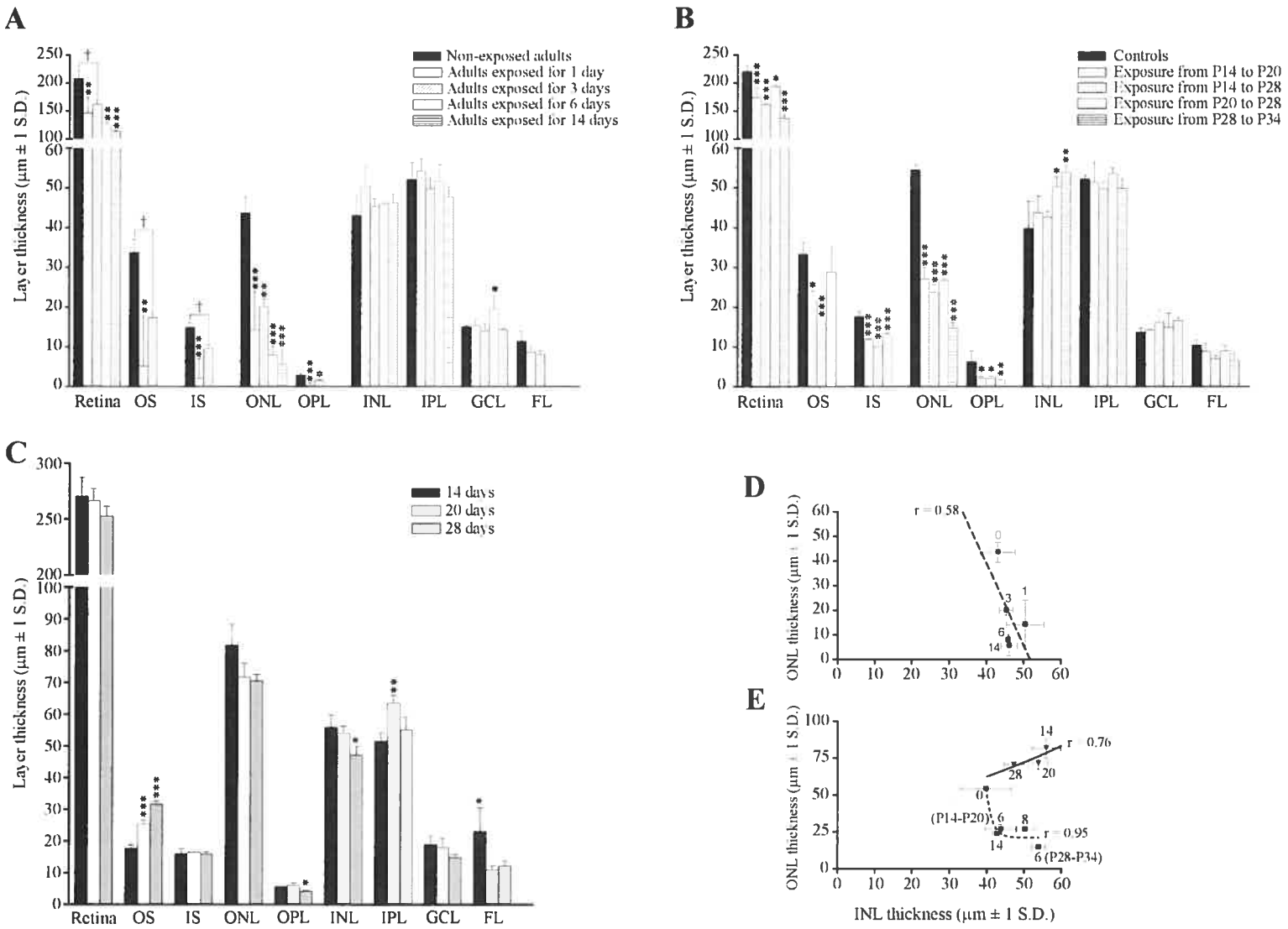

A
Non-exposed adults
Adults exposed for 1 day
Adults exposed for 3 days
Adults exposed for 6 days
Adults exposed for 14 days
Layer thickness (µm ± 1 S.D.)
Retina OS IS ONL OPL INL IPL GCL FL
B
Controls
Exposure from P14 to P20
Exposure from P14 to P28
Exposure from P20 to P28
Exposure from P28 to P34
Layer thickness (µm ± 1 S.D.)
Retina OS IS ONL OPL INL IPL GCL FL
C
14 days
20 days
28 days
Layer thickness (µm ± 1 S.D.)
Retina OS IS ONL OPL INL IPL GCL FL
D
r = 0.58
ONL thickness (µm ± 1 S.D.)
E
r = 0.76
r = 0.95
(P14-P20)
6 (P28-P34)
ONL thickness (µm ± 1 S.D.)
INL thickness (µm ± 1 S.D.)

FIGURE 5

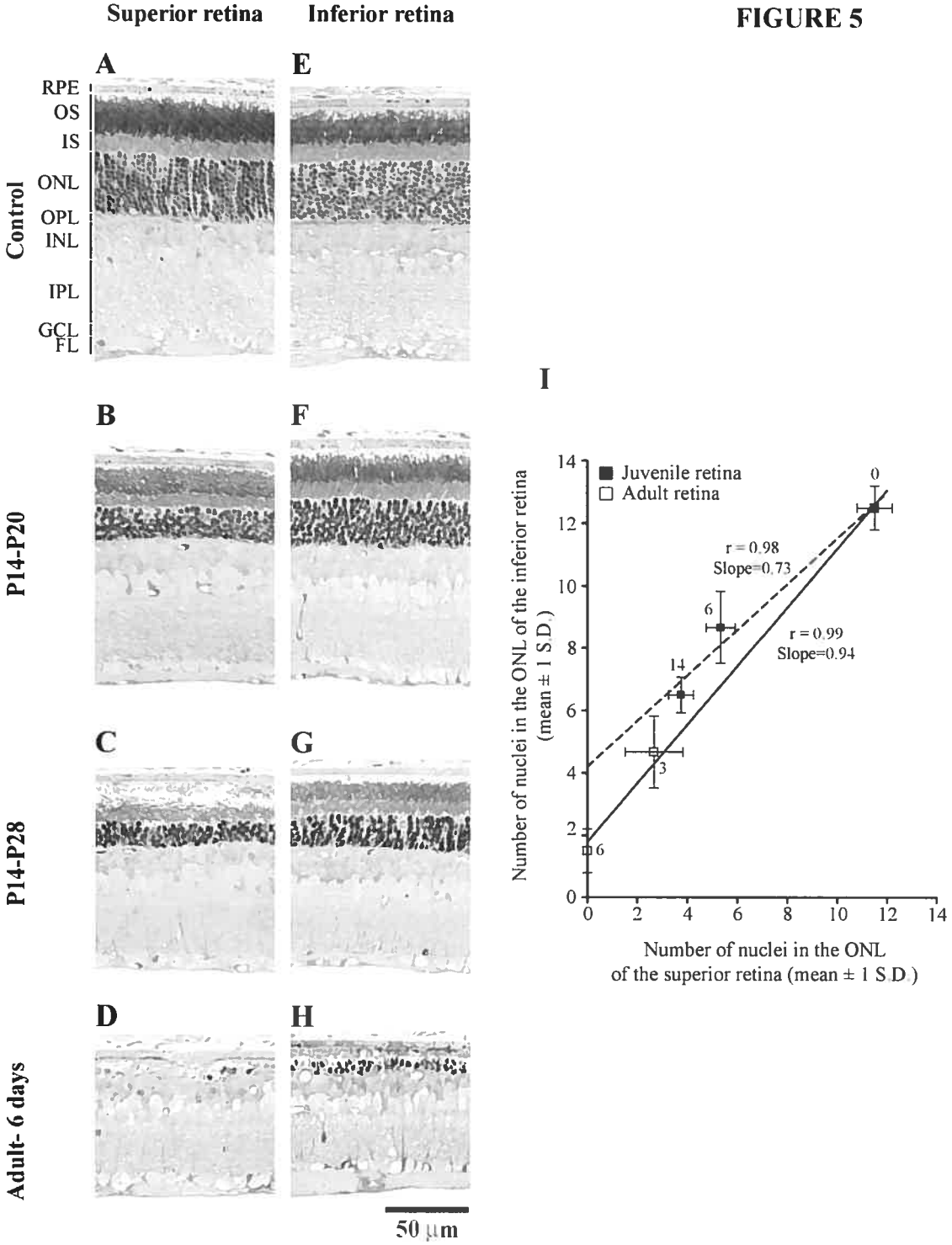

Superior retina
Inferior retina
A
E
RPE
OS
IS
ONL
OPL
INL
IPL
GCL
FL
Control
B
F
P14-P20
C
G
P14-P28
D
H
Adult- 6 days
50 µm
I
Juvenile retina
Adult retina
r = 0.98
Slope=0.73
r = 0.99
Slope=0.94
Number of nuclei in the ONL of the inferior retina (mean ± 1 S.D.)
Number of nuclei in the ONL of the superior retina (mean ± 1 S.D.)

FIGURE 6

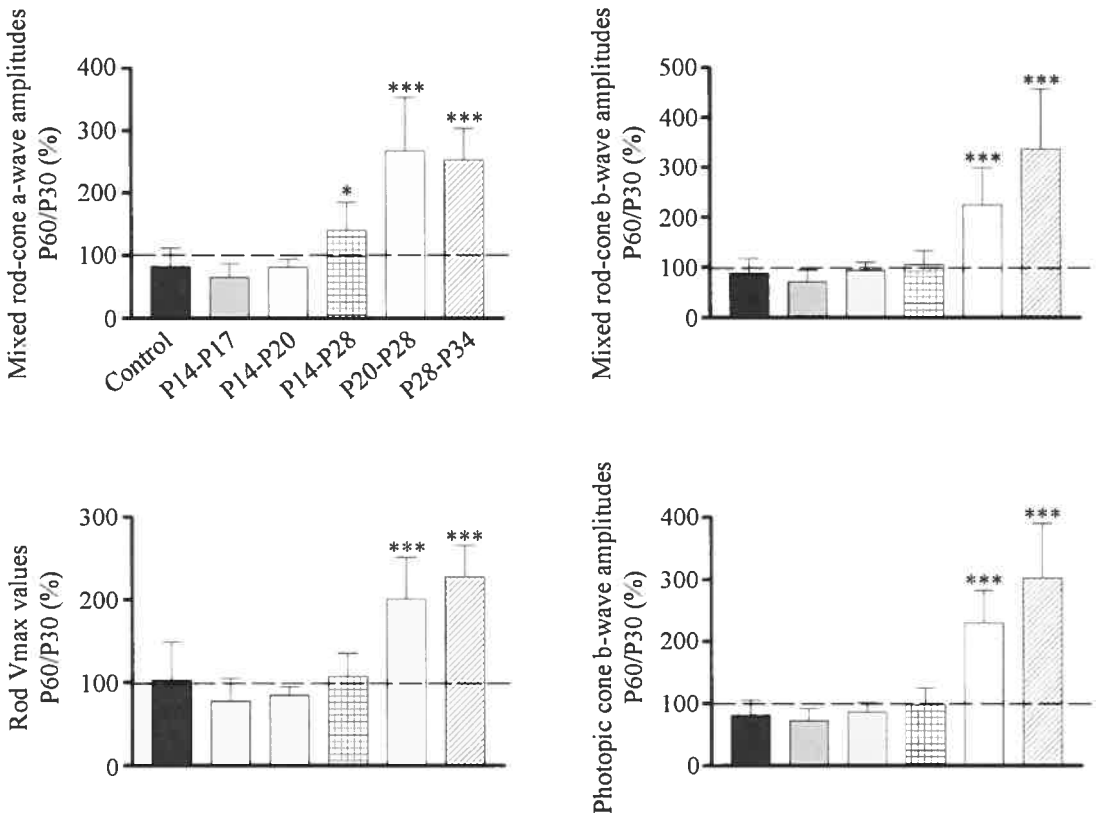

Mixed rod-cone a-wave amplitudes P60/P30 (%)
400
300
200
100
0
*
***
***
Control
P14-P17
P14-P20
P14-P28
P20-P28
P28-P34
Mixed rod-cone b-wave amplitudes P60/P30 (%)
500
400
300
200
100
0
***
***
Rod Vmax values P60/P30 (%)
300
200
100
0
***
***
Photopic cone b-wave amplitudes P60/P30 (%)
400
300
200
100
0
***
***

FIGURE 7

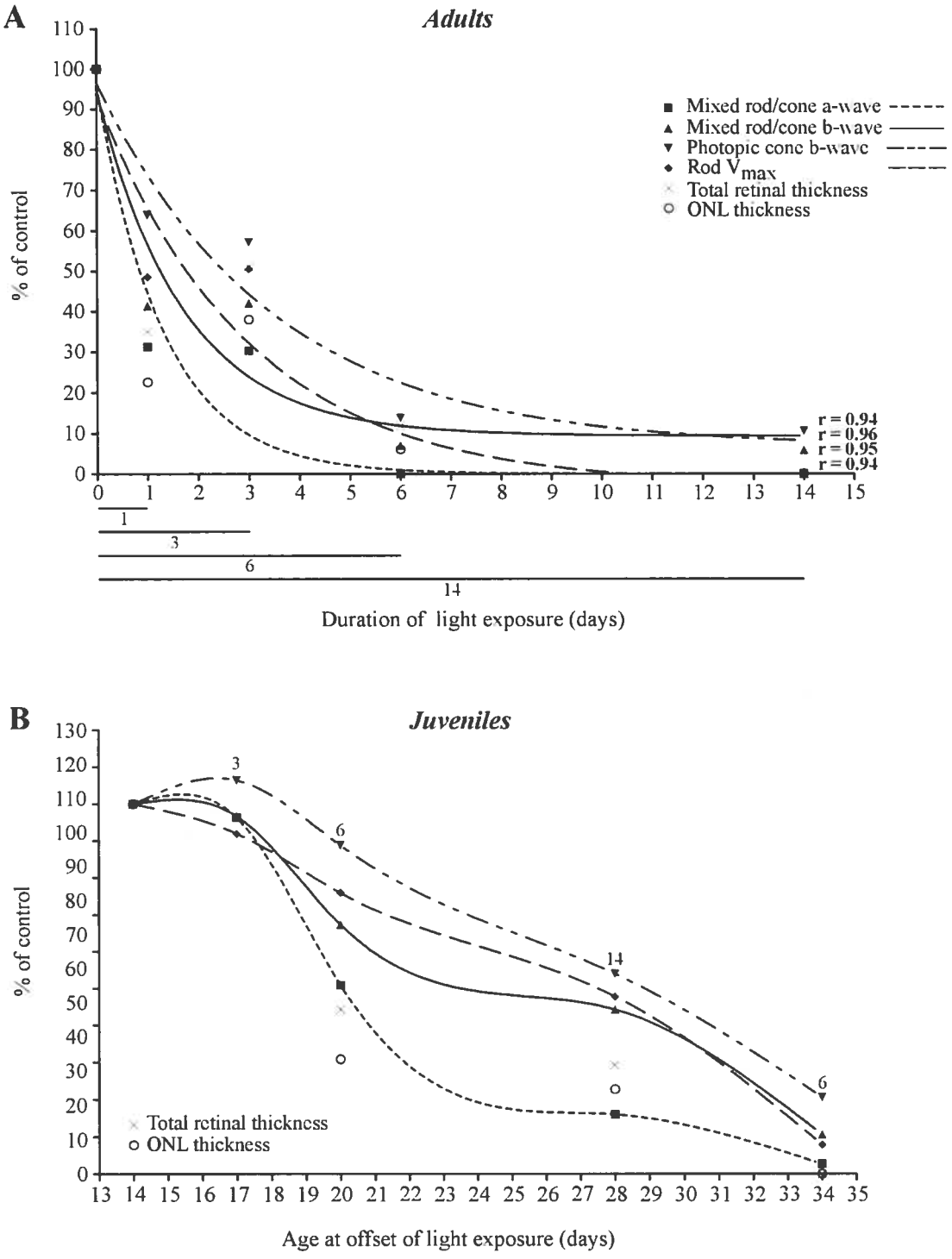

A
Adults
Mixed rod/cone a-wave
Mixed rod/cone b-wave
Photopic cone b-wave
Rod Vmax
Total retinal thickness
ONL thickness
% of control
r = 0.94
r = 0.96
r = 0.95
r = 0.94
1
3
6
14
Duration of light exposure (days)
B
Juveniles
% of control
Total retinal thickness
ONL thickness
Age at offset of light exposure (days)

TABLE 1

		Mixed rod-cone a-wave (μV ± 1 S.D.)	Mixed rod-cone b-wave (μV ± 1 S.D.)	Rod V_{max} (μV ± 1 S.D.)	Photopic cone b-wave (μV ± 1 S.D.)	Scotopic SOP (μV ± 1 S.D.)	Photopic SOP (μV ± 1 S.D.)
Adults- Normal	30d. (n=10)	243.7 ± 47.8	645.7 ± 143.3	484.1 ± 112.6	157.1 ± 35.7	266.7 ± 57.2	41.8 ± 12.8
Adults- 1 day	30d. (n=9)	76.3 ± 44.2†	267.3 ± 146.8†	234.9 ± 123.1†	100.4 ± 52.0*	153.6 ± 58.7	32.2 ± 13.3
Adults- 3 days	30d. (n=3)	73.8 ± 30.0†	271.9 ± 60.6‡	244.7 ± 56.1*	89.8 ± 24.3§	129.3 ± 14.6	34.8 ± 12.1
Adults- 6 days	30d. (n=4)	-	45.5 ± 21.8†	-	21.7 ± 12.2†	-	-
Adults- 14 days	30d. (n=2)	-	38.1 ± 10.8†	-	16.6 ± 1.5†	-	-
CONTROL	30d. (n=30)	305.2 ± 65.3	752.9 ± 163.5	490.3 ± 102.3	165.2 ± 39.7	373.2 ± 82.9	47.9 ± 22.4
	60d. (n=23)	238.2 ± 74.9	609.1 ± 173.5	420.4 ± 129.5	138.2 ± 42.8	267.1 ± 83.8	39.6 ± 15.9
P14-P17	30d. (n=11)	293.9 ± 47.8	727.8 ± 125.8	450.7 ± 70.5	175.8 ± 36.5	351.3 ± 68.8	54.4 ± 16.5
	60d. (n=11)	194.1 ± 80.2	528.1 ± 215.5	351.8 ± 136.7	125.7 ± 40.0	266.1 ± 117.2	41.0 ± 12.6
P14-P20	30d. (n=4)	155.3 ± 23.7†	506.9 ± 116.5‡	372.3 ± 48.6	146.7 ± 35.2	264.8 ± 59.5	48.8 ± 13.7
	60d. (n=4)	124.9 ± 6.4‡	459.2 ± 22.1	314.1 ± 40.1	124.4 ± 26.4	239.9 ± 27.5	41.8 ± 10.3
P14-P28	30d. (n=17)	48.6 ± 20.2†	332.9 ± 106.0†	234.1 ± 76.4†	89.0 ± 29.6†	165.2 ± 70.2†	26.9 ± 9.0‡
	60d. (n=10)	73.7 ± 24.6†	402.8 ± 127.8‡	286.4 ± 99.1*	98.6 ± 37.6	198.5 ± 62.2	36.3 ± 11.9
P20-P28	30d. (n=10)	53.1 ± 14.3†	233.6 ± 55.0†	232.4 ± 46.6†	68.2 ± 13.1†	175.9 ± 68.2†	30.4 ± 14.6
	60d. (n=10)	133.5 ± 21.5†	502.9 ± 99.9	454.7 ± 84.2	152.4 ± 22.5	245.4 ± 37.5	51.9 ± 6.1
P28-P34	30d. (n=10)	8.1 ± 10.7†	79.8 ± 27.1†	38.6 ± 62.7†	33.9 ± 11.1†	29.6 ± 7.5†	9.0 ± 5.0†
	60d. (n=10)	46.3 ± 15.6†	251.6 ± 88.1†	255.3 ± 63.9‡	96.9 ± 29.2*	117.1 ± 28.6†	33.4 ± 6.7

CHAPITRE 4

ARTICLE 3

EVIDENCE SUGGESTING FGF-2 AND CNTF NEUROPROTECTION IN THE JUVENILE RAT MODEL OF LIGHT-INDUCED RETINOPATHY

Manuscrit préliminaire pour soumission à Investigative Ophthalmology and Visual Science

EVIDENCE SUGGESTING FGF-2 AND CNTF NEUROPROTECTION IN THE JUVENILE RAT MODEL OF LIGHT-INDUCED RETINOPATHY.

Sandrine Joly[1], Vincent Pernet[2], Sylvain Chemtob[3], Adriana Di Polo[2] and Pierre Lachapelle[1.4.*].

[1]Department of Biological Sciences, [2]Department of Pathology and Cell Biology, University of Montreal, Quebec, Canada; [3]Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Quebec, Canada; [4]Department of Ophthalmology, McGill University-Montreal Children's Hospital Research Institute, Quebec, Canada.

Grant information: This study was supported by a research grant (MOP-13383) from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), from the FRSQ-Réseau Vision as well as from the McGill University-Montreal Children's Hospital Research Institute.

***Corresponding Author:**
Pierre Lachapelle, Ph.D.
Department of Ophthalmology (D-164)
McGill University- Montreal Children's Hospital Research Institute
2300 Tupper Street,
Montreal, Quebec, Canada. H3H 1P3
Phone: (514) 412-4400 ext. 23890
Fax: (514) 412-4331
[redacted]

IV.1- Abstract.

PURPOSE: We have previously demonstrated that compared to adult rats, the retina of juvenile Sprague-Dawley (SD) rats possessed a remarkable endogenous resistance to light-induced retinopathy (LIR). The purpose of the present study was to investigate the cellular and molecular mechanisms that could explain this discrepancy. **METHODS**: Juvenile SD rats were exposed for 6 (P14-P20) and 14 (P14-P28) days to a bright luminous environment of 10,000 lux. Retinal histology was obtained immediately following the offset of the light exposure or at 2 months of age. The TUNEL method was used to quantify retinal cell death. Protein level changes and retinal localization of FGF-2, CNTF and BDNF were followed by western-blot analysis and immunohistochemistry, respectively. **RESULTS**: Although the kinetic of the loss of the ONL thickness was different after 6 and 14 days of exposure, remarkably a similar ONL thickness was reached in rats at 2 months, independently of the duration of exposure. A high number of TUNEL-positive cells was visualized immediately after 6 and 14 days of light exposure, reflecting the intense cell death occurring in the ONL at these times. Western-blot analysis showed that light exposure induced a strong up-regulation of FGF-2 and CNTF in juvenile retinas, while no change in BDNF protein expression was noticed. Interestingly, FGF-2 and CNTF up-regulations were found to occur in Müller cells. **CONCLUSION**: Our data show that neurotrophic factor up-regulation by Müller cells may play a role in preserving the juvenile retina from bright light-induced damages.

Abbreviations used: FGF-2: fibroblast growth factor-2; BDNF: brain-derived neurotrophic factor; CNTF: ciliary neurotrophic factor; GDNF: glial cell line-derived neurotrophic factor; PEDF: pigment epithelium-derived factor; LEDGF: lens epithelium-derived growth factor, GFAP: glial fibrillary acidic protein, CRALBP: cellular retinaldehyde binding protein.

IV.2- Introduction.

Bright light exposure leads to severe retinal degeneration in albino adult rats (Noell et al., 1966; O'Steen et al., 1974; Penn and Thum, 1987; Organisciak et al., 1989; Penn et al., 1989; Organisciak and Winkler, 1994; Li et al., 2001; Marc et al., 2003; Organisciak et al., 2003). The sequence of events leading to photoreceptor degeneration is well established (Wenzel et al., 2005) and as the duration of exposure increases progressive electrophysiological (loss of the a-wave) and histological (diminution in the thickness of the photoreceptor layer) deficits are observed (functional alterations: (Penn et al., 1987; Penn et al., 1989; Li et al., 2001, , 2003); - histological deficits: (Kuwabara and Gorn, 1968; Grignolo et al., 1969; O'Steen et al., 1972; Zhang et al., 2004; Wenzel et al., 2005). In the most extreme cases, there is a complete destruction of the photoreceptor layer while the inner layers of the retina remain intact (Kuwabara and Gorn, 1968; O'Steen et al., 1972; Zhang et al., 2004; Wenzel et al., 2005).

Contrasting with the above are results showing a relative resistance of the juvenile rat retina to the light damage during the first 30 days or so life (Joly et al., in correction). The exact mechanisms at the origin of this relative immunity remains however to be explored.

Neurotrophic factors are potent neuroprotective molecules for the rescue of the retinal cells (Chaum, 2003). In animal models of retinal degeneration such as retinitis pigmentosa, photoreceptor cell death is slowed down following intravitreal injections of neurotrophic factors such as BDNF (LaVail et al., 1998; Okoye et al., 2003), CNTF (Cayouette et al., 1998; LaVail et al., 1998), FGF-2 (Faktorovich et al., 1990; Gao and Hollyfield, 1996; LaVail et al., 1998) or GDNF (McGee Sanftner et al., 2001). Similarly, in light-induced retinal degeneration, photoreceptors can be protected with BDNF treatment

(LaVail et al., 1992; Ikeda et al., 2003; Gauthier et al., 2005). Moreover, intravitreal injections of PEDF (Cao et al., 2001b; Imai et al., 2005), FGF-2 (Faktorovich et al., 1992; LaVail et al., 1992; Masuda et al., 1995; Cao et al., 2001b) or LEDGF (Machida et al., 2001) were also shown to rescue photoreceptors following light exposure. In adults, the levels of some neurotrophic factors, such as FGF-2 and CNTF, are up-regulated after mechanical injury (Wen et al., 1995; Cao et al., 1997b; Cao et al., 2001a) and in light-induced photoreceptor degeneration (Gao and Hollyfield, 1996; Wen et al., 1998; Walsh et al., 2001). Interestingly, photoreceptors are protected from light alterations by local injury (Faktorovich et al., 1992) or optic nerve axotomy (Gargini et al., 2004; Valter et al., 2005). Thus, the up-regulation of neurotrophins appears as a natural protective mechanism for adult photoreceptors.

In contrast, little is known on neurotrophic factor changes in the light-injured, developing retina. Neurotrophins show high variations during postnatal life (Cao et al., 2001a). For example, BDNF is strongly up-regulated after eyelid opening, at P14, to reach a maximum at 1 month of age (Seki et al., 2003). In addition, mechanical injury occurring early after birth induces changes in neurotrophin mRNA levels sustained at least until the 6th month of age (Cao et al., 2001a). In light of these results, we hypothesized that variations in retinal neurotrophins may explain the resistance to light-induced damage that we reported for the juvenile rat retinas (<30 days of age) (Joly et al., in correction).

The purpose of our study was therefore to further explore the mechanisms at the origin of the endogenous resistance to light that we observed when the retinas of juvenile and adult rats were compared. Our results indicate that following light exposure the juvenile rat retina shows an enhancement of FGF-2 and CNTF, both factors possibly contributing to the neuroprotection of the retinal tissue. This specific enhancement was not observed in adults. Immunohistological analysis showed that the up-regulation of both neurotrophins occurred in the Müller cells.

IV.3- Methods.

IV.3.1- Animals

All the procedures were conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care for the use of experimental animals and were approved by the

McGill University- Montreal Children's Hospital Animal Care Committee. Pregnant female Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories, St-Constant, Que.) were ordered at 15 days of gestation and were kept under normal cyclic (12D: 12L) light environment of 80 lux. After birth, pups were maintained at 80 lux until postnatal day 14 (P14). They were then exposed for 6 (group P14-P20) or 14 (group P14-P28) consecutive days to a bright luminous environment (10,000 lux; 12D: 12L). Control animals were raised in the normal light environment of the animal care facility.

IV.3.2- Histological and photoreceptor cell death analysis.

Immediately after light offset, the rats were sacrificed with an anesthetic overdose following which they were perfused intracardially with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.2M phosphate buffer (PB, pH 7.4). The left eyes were kept for retinal histology while the right eyes were used for TUNEL staining (N=3 for each regimen of exposure).

- *Retinal histology*. After the removal of the cornea and lens, the left eyes were post-fixed for 2 hours in 4% PFA solution in 0.2M PB (pH 7.4). Following a 4 hour-fixation period in 1% osmium tetroxide and sequential dehydration in alcohol baths, the eyes were then embedded in Epon resin (Mecalab, Montreal, Canada). Retinal sections of 0.7 µm were cut, mounted on glass slides and stained with 0.1% toluidine blue. Thickness of the retinal layers was measured on 7 different retinal sections in the superior and the inferior hemispheres (Image-Pro Plus Imaging Software, Media Cybernetics, MD, U.S.A.). On each section, retinal layer thicknesses were measured in five, randomly chosen, sectors.

- *TUNEL staining* (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling). After cornea and lens dissection, the right eyes were immersed for 2 hours in 4% PFA in 0.2M PB (pH 7.4) and were cryo-protected in graded sucrose solutions (10-30% in PB) at 4°C. Eyes were embedded in OCT (Optimal Cutting Temperature) compound (Tissue-Tek, Miles Laboratories, Elkhart, IN, USA) and frozen in a 2-methylbutane/liquid nitrogen bath. The cryosections (14-16µm thick) were collected on gelatin-coated slides on which the TUNEL assay was conducted using an apoptosis detection kit (ApopTag Fluorescein In Situ Apoptosis Detection; Chemicon Temecula, CA, USA). TUNEL-positive cells were counted on the entire surface of the retina.

Histological slides and fluorescent TUNEL staining were examined using a Zeiss Axioskop 2 Plus microscope (Carl Zeiss Canada, Kirkland, Quebec, Canada), pictures captured with a CCD video camera (Retiga, Qimaging Burnaby, BC, Canada) and analyzed with the Northern Eclipse software.

IV.3.3- Western blot analysis.

Immediately after the end of the exposure, retinas from exposed and age-matched control rats (N=3 for controls and N=4 for each regimen of exposure) were rapidly extracted and homogenized with an electric pestle (Kontes, Vineland, NJ, USA) in ice-cold lysis buffer (0.1% sodium dodecyl sulfate, 20mM Tris, pH 8.0, 135mM sodium chloride, 1% NP-40, 10% glycerol supplemented with protease inhibitors). Right and left retinas from each animal were pooled as one sample. Retinal lysates were incubated on ice for 30 minutes and then centrifuged at 14,000 rpm for 15 min following which the supernatant was collected. Protein concentration was determined by the Lowry method (Bio-Rad Life Science, Mississauga, Ontario, Canada). For each sample, 100µg of proteins were resolved by electrophoresis on 15% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels (SDS-PAGE) and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad Life Science). Blots were incubated in 10mM Tris (pH 8.0), 150mM NaCl, 0.2% Tween 20 (TBST) and 5% lyophilized skim milk for 1 hour at room temperature to block non-specific signal. Membranes were incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: monoclonal anti-human FGF-2 (Type II, clone bFM-2, 2.5µg/ml, Upstate Biotechnology), monoclonal anti-mouse CNTF (5µg/ml, Chemicon International) and monoclonal anti-human BDNF (anti-human BDNF pAb, 5µg/ml, Promega Corporation). Membranes were washed with TBST and then incubated, for 1 hour at room temperature, with anti-mouse (Amersham Pharmacia, Baie d'Urfé, Quebec, Canada) or anti-chicken (Promega Corporation, WI, Madison, USA) peroxidase-linked secondary antibody. Protein signals were detected using a chemiluminescent reagent (ECL, Amersham Biosciences) followed by exposure of membranes to X-OMAT (Kodak) imaging film. Membranes were then incubated in a stripping solution (200mM glycine pH 2.8, 500mM NaCl and 0.7% β-mercaptoethanol) at 55°C for 1 hour and were reprobed with a primary antibody polyclonal anti γ-actin (1:10,000; generous gift from Dr J. C. Bulinski, Columbia University, NY, USA) followed

by the incubation with an anti-rabbit peroxidase-linked secondary antibody (Amersham Pharmacia, Baie d'Urfé, QC). The γ-actin protein was chosen as reference instead of β-actin which is developmentally regulated (Micheva et al., 1998; Weinberger et al., 1996).

IV.3.4- Immunohistochemistry.

Sections were incubated in 3% normal goat serum, 0.3% Triton X-100 (Sigma, St Louis, MO, USA) in 0.1M PBS, pH 7.4 for 30min at room temperature to block non-specific binding. Retinal sections were incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: monoclonal anti-human FGF-2 (Type II, clone bFM-2, 10µg/ml, Upstate Biotechnology), monoclonal anti-mouse CNTF (5µg/ml, Chemicon International), polyclonal anti-rabbit GFAP (1:100, Sigma, St Louis, MO, USA) and polyclonal anti-rabbit CRALBP (1:1,000; generous gift from Dr Saari, University of Washington, Seattle, Washington). Sections were then incubated with the appropriate secondary antibody for 1 hour at room temperature, washed in PBS and mounted using an anti-fade reagent (SlowFade, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). The fluorescence was observed with a Zeiss Axioskop 2 Plus microscope (Carl Zeiss Canada, Kirkland, Quebec, Canada), pictures captured with a CCD video camera (Retiga, Qimaging Burnaby, BC, Canada) and analyzed with Northern Eclipse software.

IV.4- Results.

Rats were perfused intracardially at different periods during the first developmental month and the retinas were harvested and processed for histological analysis. During the normal course of retinal maturation, the thickness of the retina decreases significantly until it reaches its adult size at approximately P60 (Fig. 1; P14: 270.7 ± 16.7 µm vs. 2 months: 220.3 ± 9.7 µm; $P<0.05$, Student t-test). The thickness of the outer nuclear layer (ONL) also decreases gradually with maturation. At P20 (Fig. 1B) and P28 (Fig. 1C), the thickness of the ONL is 87.7% and 86.3% ($P<0.05$; ANOVA) of the P14 value (Fig. 1A) compared to 66.5% at P60 (Fig. 1A and 1D; $P<0.001$ ANOVA).

In order to determine the kinetic of the light-induced damages, the retinas of juvenile rats were harvested immediately or 2 months after a 6 (group P14-P20) or 14 day (group P14-

P28) exposure to the bright luminous environment. Immediately following 6 days of exposure (Fig. 2B), the thickness of the ONL dropped to 74.0% ($P<0.05$) of the P20 value (Fig. 2A) and further decreased to 50.8% ($P<0.01$; Figure 2B-C) at P60. In contrast, retinas from adult rats exposed for 6 days to bright light demonstrated a complete loss of the photoreceptor layer (Fig. 2D). Similarly, following 14 days of exposure, the thickness of the ONL of the juvenile rat retinas, significantly decreased to 46.3% (Fig. 2F; $P<0.001$) of the P28 control value (Fig. 2E). This diminution seemed to be stable between P28 and 2 months. In comparison, 14 days of exposure in adult rat leads to a complete destruction of the external layers of the retina (Fig. 2H), stressing once more the relative resistance of the juvenile retina to the light-induced retinal degeneration. This is best illustrated at figure 3 where the thickness of the ONL is plotted against the age when the retinas were collected in normal and light exposed rats. Despite minor differences in the ONL attrition process, both exposure regimens yield at P60 equivalent ONL [P14-P20 (diamonds and dashed line); 27.0 ± 2.9 µm, N=3) and P14-P28 (circles); 23.8 ± 1.8 µm, N=3)] with thicknesses approximately half of normal (squares and black line; $P<0.001$), independently of the duration of light treatment.

It was previously shown that the pathophysiological processess triggered by the bright light exposure are intimately tied to apoptosis (Wenzel et al., 2005). In order to better characterize the cellular death process that occurs in our model of light-induced degeneration, we performed a TUNEL staining from the retinas of juvenile rats exposed for 6 (Fig. 4D) or 14 (Fig. 4E) consecutive days. The count of TUNEL positive cells is shown in figure 4F. A high number of cells became TUNEL-positive in the ONL after 6 and 14 days of light exposure (Fig. 4D-E). Quantitatively, TUNEL-positive cells were significantly more numerous after 6 compared to 14 days of exposure (Fig. 4F), while in the non-exposed rats, very few TUNEL-positive cells were encountered (Fig. 4A-C and 4F). With TUNEL, we observed that photoreceptor death was highest after 6 days of exposure but remained elevated following 14 days of exposure.

It has been previously demonstrated in adult rats that, following a retinal injury (Wen et al., 1995; Cao et al., 1997b; Cao et al., 2001a) including light damage (Gao and Hollyfield, 1996; Wen et al., 1998; Walsh et al., 2001), there was an up-regulation of some

neurotrophic factors. We therefore examined the levels of endogenous neurotrophic factors, such as FGF-2 (Fig. 5A), CNTF (Fig. 5B) and BDNF (Fig. 5C) using western-blot analysis. Juvenile rat retinas were collected immediately following 6 and 14 days of light exposure (group P14-P20 and P14-P28) and in age-matched control rats (P14, P20, P28). Following 14 days of exposure, FGF-2 protein level (Fig. 5A) was up-regulated by more than 476% (Student t-test, $P<0.05$) compared to the basal level of P28 rats, while 6 days of exposure did not significantly change FGF-2 protein level ($P>0.05$). Similarly, 14 days of exposure led to a significant (Student t-test, $P<0.001$) 139% increase of the CNTF protein level (Fig. 5B), while 6 days of exposure did not change the endogenous CNTF protein level. BDNF protein levels were not up-regulated either after 6 days or 14 days of exposure (Fig. 5C). In order to determine the acute effect of the light exposure, adult rats were exposed for 1 day, since we had already demonstrated that the latter duration was sufficient to yield significant electrophysiological and morphological sequels to the retina (Joly et al., in correction). Similarly, juvenile rats were also exposed for 1 day (P20-P21). A 1-day exposure was insufficient to yield measurable increase in the level of neurotrophic factor in adults as well as in juvenile rats (Fig. 5A-C, right part of each graph).

Immunohistochemistry revealed that FGF-2 staining was present in the inner nuclear layer (INL) of control retinas (Fig. 6A). Following 14 days of exposure, light increased FGF-2 signal in the INL (Fig. 6B). To determine if the FGF-2 up-regulation (Fig. 6C) occurred in the Müller cells, a specific Müller glial cell antibody, anti-CRALBP (cellular retinaldehyde binding protein), was used. Anti-CRALBP stained Müller cell bodies and radial processes (Fig. 6D). The superimposition of the two stainings revealed that FGF-2 up-regulation occurred in Müller cell bodies (Fig. 6E). Similarly, CNTF staining was observed in the INL of control animals (Fig. 7A-B). After 6 (Fig. 7C) and 14 (Fig. 7D) days of bright light exposure, CNTF up-regulation occurred in the INL and in both cases, radial processes of the retinas were stained. The co-immunostaining for CNTF (Fig. 7E) and GFAP (glial fibrillary acidic protein; Fig. 7F), a marker for active Müller glial cells, revealed that Müller cell bodies and extensions actively up-regulated CNTF after light exposure (Fig. 7G). These results thus identify the glial Müller cells as a source for FGF-2 and CNTF up-regulation after light exposure.

Previous studies, including ours, have shown regional differences in the susceptibility of the rat retina to light damages (Figure 8). During normal development, the thickness of the inferior and superior ONL thickness are basically identical (see P20: Fig. 8A-B, 8M; P28: Fig 8G-H, 8M). Similarly, immediately following 6 (Fig. 8C-D) or 14 (Fig. 8I-J) consecutive days of exposure, the thickness of the ONL of both retinal hemispheres (inferior: Fig. 8C, 8I; superior: Fig. 8D, 8J) was similar (quantification fig. 8M, $P>0.05$). However as shown at figure 8, at P60, the superior ONL was thinner ($P>0.05$) than the inferior ONL after 6 days of exposure, a difference that reached a significant level following 14 days of exposure ($P<0.01$). Despite the above demonstration of a hemiretinal difference in LIR, the level of neurotrophic factors (FGF-2 and CNTF) were identical in both retinal hemispheres in rats exposed for 6 days to light (P14-P20) and comparable to those measured in normal age-matched controls (Fig. 8N) as revealed with Western-blot analysis.

IV.5- <u>Discussion.</u>

We have previously demonstrated that juvenile rat retinas exposed to bright cyclic light, during the first postnatal month of life, displayed a remarkable endogenous resistance to LIR compared to adult retinas. In the present study, we show that, despite the difference in durations of light exposure, the retinas presented approximately the same level of photoreceptor survival at 2 months of age (Figures 2 and 3). Indeed, 6 and 14 days of light exposure led to a reduction of almost 50% of the ONL thickness (Figure 3).

Rat retinas exposed for 6 days (group P14-P20) presented a higher number of TUNEL-positive cells than rat retinas exposed for 14 days (group P14-P28) (Figure 4). This observation is consistent with histological observations (Figure 2). Immediately after 6 days of exposure, retinas presented a 26%-loss of photoreceptors (Fig. 2B and 3) and this loss was increased at 2 months of age (Fig. 2C and 3). The TUNEL picture that we reported in Figure 4D showed that the process of photoreceptor death was occurring at the moment of the perfusion. However, immediately after 14 days of light exposure, rat retinas presented a thickness of the ONL almost similar to that of an exposed rat aged 2 months (compare Figures 2 F and 2G and 3). The TUNEL picture that we presented in Figure 4E showed that the process of photoreceptor loss was almost finished immediately after the

light exposure as the final thickness of the ONL was already reached. The loss of photoreceptor nuclei in the ONL was correlated with the TUNEL analysis, suggesting that apoptosis was directly related to photoreceptor cell death.

In this study, we showed that 14 days of exposure induced a significant ($P<0.05$) FGF-2 up-regulation (Figure 5). In contrast, one day of exposure in adults, which induced at least 30% of loss in the ONL retinal thickness (Joly et al., in correction), did not lead to any significant change compared to unexposed adult. Our data showed that FGF-2 was localized in the INL (Figure 6A-B), a finding that is consistent with reports from Valter and her collaborators (Valter et al., 2005). Strikingly, FGF-2 protein level reached after 14 days of exposure was 2 times higher than in non-exposed adults. Consistent with our results, Müller cells have been previously identified as an important source of FGF-2 (Faktorovich et al., 1992; Wen et al., 1995; Cao et al., 1997a; Cao et al., 1998) but synthesis of FGF-2 has also been reported to occur in rat retinal photoreceptors (Noji et al., 1990). Moreover, in intact rats, FGF-2 receptor, FGF receptor-1 (FGFR-1), was localized in the ONL (Valter et al., 2002; Sapieha et al., 2003; Valter et al., 2005). It is not thus surprising that FGF-2 can exert its action on photoreceptors after light damage. It has been proposed that bright light exposure may induce FGF-2 up-regulation in the retina to protect photoreceptor by inhibiting nitric oxide (NO) synthesis from the RPE (Steinberg, 1994).

We also demonstrated that 14 days of light exposure led to a significant up-regulation of CNTF (Figure 5B). Interestingly, CNTF protein level reached after 14 days of exposure was higher than in non-exposed adults. Our data also showed that CNTF was localized in the INL in control and exposed animals (Figure 7). CNTF receptors (CNTFRα) have been shown in the photoreceptor outer segments (Valter et al., 2003). Thus, we can suggest that after binding to its specific receptor in the outer segments, CNTF may protect photoreceptors from light insults and may enhance their survival.

Our results showed that BDNF was not upregulated following bright light exposure (Figure 5C), a finding which is consistent with previous studies (Wen et al., 1995; Cao et al., 2001a). One explanation may be that only green and red cones express the BDNF

receptor TrkB (Di Polo et al., 2000) and this subpopulation of cells represents less than 1% of all photoreceptors in the rat retina (Szel and Rohlich, 1992). BDNF may be not required to protect photoreceptors after light exposure.

Our results demonstrated that Müller cells up-regulated FGF-2 and CNTF in the INL (Figures 6 and 7). Retinal light damages induce the degeneration of photoreceptors, and leads to Müller glial cell gliosis and GFAP expression (Grosche et al., 1997). It is also well known that, in general, retinal neurons and Müller cells produce growth factors in response to damages (Kostyk et al., 1994; Wen et al., 1995; Cao et al., 1997a; Valter et al., 1998; Honjo et al., 2000; Walsh et al., 2001; Valter et al., 2005). Recently, Harada and his collaborators presented evidences suggesting that activated microglial cells secreted some factors migrating to the outer retina during photodegeneration. These factors increased the production of trophic factors by Müller cells, allowing the survival of the retinal photoreceptors (Harada et al., 2002). Neurotrophic factors such as FGF-2 and CNTF may be up-regulated by Müller cells as a natural mechanism of photoreceptor neuroprotection.

A high number of reports mentioned that the superior retina was more sensitive to light damages than the inferior retina (Noell et al., 1966; Rapp and Williams, 1980; Rapp et al., 1985; LaVail et al., 1997; Gordon et al., 2002; Joly et al., in correction). The present study was the first to show equal susceptibility between the superior and the inferior retinas immediately after light exposure (Figure 8A-M). Strikingly, the superior retina did not display significant increase of FGF-2 or CNTF protein level compared to the inferior retina (Figure 8N), suggesting that another mechanism supports the differential survival in retinal hemispheres. It has been proposed that the longer photoreceptor outer segments and the larger amounts of rhodopsin in the superior retina may generate higher amounts of free radicals and thus more damages after light exposure (Rapp et al., 1985). The inferior retina also displays a higher density of cones than the superior retina (Szel et al., 1992). Cones are considered more resistant than rods to light-induced damages (Cicerone, 1976; LaVail, 1976; Birch and Jacobs, 1980; Joly et al., in correction). All of the above morphological and biochemical characteristics of the rat retina could explain why the superior retina was more sensitive than the inferior retina.

Our results showed that FGF-2 and CNTF up-regulation in Müller cells may preserve photoreceptors from bright light-induced cell death. However, other mechanisms may contribute to the endogenous neuroprotection that the rat retina displays during the first postnatal month of life.

Acknowledgements

This study was supported by research grants (MOP-13383 and MOP-14639) from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), from the FRSQ-Réseau Vision as well as from the McGill University-Montreal Children's Hospital Research Institute.

IV.6- References

Birch DG, Jacobs GH (1980) Light-induced damage to photopic and scotopic mechanisms in the rat depends on rearing conditions. Exp Neurol 68:269-283.

Cao W, Li F, Steinberg RH, LaVail MM (1998) Induction of c-fos and c-jun mRNA expression by basic fibroblast growth factor in cultured rat Muller cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 39:565-573.

Cao W, Li F, Steinberg RH, Lavail MM (2001a) Development of normal and injury-induced gene expression of aFGF, bFGF, CNTF, BDNF, GFAP and IGF-I in the rat retina. Exp Eye Res 72:591-604.

Cao W, Wen R, Li F, Cheng T, Steinberg RH (1997a) Induction of basic fibroblast growth factor mRNA by basic fibroblast growth factor in Muller cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 38:1358-1366.

Cao W, Wen R, Li F, Lavail MM, Steinberg RH (1997b) Mechanical injury increases bFGF and CNTF mRNA expression in the mouse retina. Exp Eye Res 65:241-248.

Cao W, Tombran-Tink J, Elias R, Sezate S, Mrazek D, McGinnis JF (2001b) In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. Invest Ophthalmol Vis Sci 42:1646-1652.

Cayouette M, Behn D, Sendtner M, Lachapelle P, Gravel C (1998) Intraocular gene transfer of ciliary neurotrophic factor prevents death and increases responsiveness of rod photoreceptors in the retinal degeneration slow mouse. J Neurosci 18:9282-9293.

Chaum E (2003) Retinal neuroprotection by growth factors: a mechanistic perspective. J Cell Biochem 88:57-75.

Cicerone CM (1976) Cones survive rods in the light-damaged eye of the albino rat. Science 194:1183-1185.

Di Polo A, Cheng L, Bray GM, Aguayo AJ (2000) Colocalization of TrkB and brain-derived neurotrophic factor proteins in green-red-sensitive cone outer segments. Invest Ophthalmol Vis Sci 41:4014-4021.

Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM (1990) Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. Nature 347:83-86.

Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM (1992) Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat. J Neurosci 12:3554-3567.

Gao H, Hollyfield JG (1996) Basic fibroblast growth factor: increased gene expression in inherited and light-induced photoreceptor degeneration. Exp Eye Res 62:181-189.

Gargini C, Bisti S, Demontis GC, Valter K, Stone J, Cervetto L (2004) Electroretinogram changes associated with retinal upregulation of trophic factors: observations following optic nerve section. Neuroscience 126:775-783.

Gauthier R, Joly S, Pernet V, Lachapelle P, Di Polo A (2005) Brain-derived neurotrophic factor gene delivery to muller glia preserves structure and function of light-damaged photoreceptors. Invest Ophthalmol Vis Sci 46:3383-3392.

Gordon WC, Casey DM, Lukiw WJ, Bazan NG (2002) DNA damage and repair in light-induced photoreceptor degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 43:3511-3521.

Grignolo A, Orzalesi N, Castellazzo R, Vittone P (1969) Retinal damage by visible light in albino rats. An electron microscope study. Ophthalmologica 157:43-59.

Grosche J, Grimm D, Clemens N, Reichenbach A (1997) Retinal light damage vs. normal aging of rats: altered morphology, intermediate filament expression, and nuclear organization of Muller (glial) cells. J Hirnforsch 38:459-470.

Harada T, Harada C, Kohsaka S, Wada E, Yoshida K, Ohno S, Mamada H, Tanaka K, Parada LF, Wada K (2002) Microglia-Muller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. J Neurosci 22:9228-9236.

Honjo M, Tanihara H, Kido N, Inatani M, Okazaki K, Honda Y (2000) Expression of ciliary neurotrophic factor activated by retinal Muller cells in eyes with NMDA- and kainic acid-induced neuronal death. Invest Ophthalmol Vis Sci 41:552-560.

Ikeda K, Tanihara H, Tatsuno T, Noguchi H, Nakayama C (2003) Brain-derived neurotrophic factor shows a protective effect and improves recovery of the ERG b-wave response in light-damage. J Neurochem 87:290-296.

Imai D, Yoneya S, Gehlbach PL, Wei LL, Mori K (2005) Intraocular gene transfer of pigment epithelium-derived factor rescues photoreceptors from light-induced cell death. J Cell Physiol 202:570-578.

Joly S, Pernet V, Dorfman AL, Chemtob S, Lachapelle P (in correction) Light-induced retinopathy: Comparing adult and juvenile rats. Invest Ophthalmol Vis Sci.

Kostyk SK, D'Amore PA, Herman IM, Wagner JA (1994) Optic nerve injury alters basic fibroblast growth factor localization in the retina and optic tract. J Neurosci 14:1441-1449.

Kuwabara T, Gorn RA (1968) Retinal damage by visible light. An electron microscopic study. Arch Ophthalmol 79:69-78.

LaVail MM (1976) Survival of some photoreceptor cells in albino rats following long-term exposure to continuous light. Investigative Ophthalmology 15:64-70.

LaVail MM, Matthes MT, Yasumura D, Steinberg RH (1997) Variability in rate of cone degeneration in the retinal degeneration (rd/rd) mouse. Exp Eye Res 65:45-50.

LaVail MM, Unoki K, Yasumura D, Matthes MT, Yancopoulos GD, Steinberg RH (1992) Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. Proc Natl Acad Sci U S A 89:11249-11253.

LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Lau-Villacorta C, Unoki K, Sung CH, Steinberg RH (1998) Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. Invest Ophthalmol Vis Sci 39:592-602.

Li F, Cao W, Anderson RE (2001) Protection of photoreceptor cells in adult rats from light-induced degeneration by adaptation to bright cyclic light. Exp Eye Res 73:569-577.

Li F, Cao W, Anderson RE (2003) Alleviation of constant-light-induced photoreceptor degeneration by adaptation of adult albino rat to bright cyclic light. Invest Ophthalmol Vis Sci 44:4968-4975.

Machida S, Chaudhry P, Shinohara T, Singh DP, Reddy VN, Chylack LT, Jr., Sieving PA, Bush RA (2001) Lens epithelium-derived growth factor promotes photoreceptor survival in light-damaged and RCS rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 42:1087-1095.

Marc RE, Jones BW, Watt CB, Strettoi E (2003) Neural remodeling in retinal degeneration. Prog Retin Eye Res 22:607-655.

Masuda K, Watanabe I, Unoki K, Ohba N, Muramatsu T (1995) Functional Rescue of photoreceptors from the damaging effects of constant light by survival-promoting factors in the rat. Invest Ophthalmol Vis Sci 36:2142-2146.

McGee Sanftner LH, Abel H, Hauswirth WW, Flannery JG (2001) Glial cell line derived neurotrophic factor delays photoreceptor degeneration in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa. Mol Ther 4:622-629.

Noell WK, Walker VS, Kang BS, Berman S (1966) Retinal damage by light in rats. Invest Ophthalmol 5:450-473.

Noji S, Matsuo T, Koyama E, Yamaai T, Nohno T, Matsuo N, Taniguchi S (1990) Expression pattern of acidic and basic fibroblast growth factor genes in adult rat eyes. Biochem Biophys Res Commun 168:343-349.

O'Steen WK, Shear CR, Anderson KV (1972) Retinal damage after prolonged exposure to visible light. A light and electron microscopic study. Am J Anat 134:5-21.

O'Steen WK, Anderson KV, Shear CR (1974) Photoreceptor degeneration in albino rats: dependency on age. Invest Ophthalmol 13:334-339.

Okoye G, Zimmer J, Sung J, Gehlbach P, Deering T, Nambu H, Hackett S, Melia M, Esumi N, Zack DJ, Campochiaro PA (2003) Increased expression of brain-derived neurotrophic factor preserves retinal function and slows cell death from rhodopsin mutation or oxidative damage. J Neurosci 23:4164-4172.

Organisciak DT, Winkler BS (1994) Retinal light damage: Practical and theoretical considerations. Progress in Retinal and Eye Research 13:1-29.

Organisciak DT, Darrow RM, Barsalou LS (2003) Light-induced retinal degeneration. In: Ocular Neuroprotection (Levin LA, Di Polo A, eds), pp 85-107. New York

Basel: Marcel Dekker, Inc.

Organisciak DT, Jiang YL, Wang HM, Pickford M, Blanks JC (1989) Retinal light damage in rats exposed to intermittent light. Comparison with continuous light exposure. Invest Ophthalmol Vis Sci 30:795-805.

Penn JS, Thum LA (1987) A comparison of the retinal effects of light damage and high illuminance light history. Prog Clin Biol Res 247:425-438.

Penn JS, Naash MI, Anderson RE (1987) Effect of light history on retinal antioxidants and light damage susceptibility in the rat. Exp Eye Res 44:779-788.

Penn JS, Thum LA, Naash MI (1989) Photoreceptor physiology in the rat is governed by the light environment. Exp Eye Res 49:205-215.

Rapp LM, Williams TP (1980) A parametric study of retinal light damage in albino and pigmented rats. In: The effects of constant light on visual processes (Williams TP, Baker BN, eds), pp 135-159. New York: Plenum Press.

Rapp LM, Naash MI, Wiegand RD, Joel CD, Nielson JC, Anderson RE (1985) Morphological and biochemical comparisons between retinal regions having differing susceptibility to photoreceptor degeneration. In: Retinal degeneration: Experimental and clinical studies (Liss AR, ed), pp 421-437.

Sapieha PS, Peltier M, Rendahl KG, Manning WC, Di Polo A (2003) Fibroblast growth factor-2 gene delivery stimulates axon growth by adult retinal ganglion cells after acute optic nerve injury. Mol Cell Neurosci 24:656-672.

Seki M, Nawa H, Fukuchi T, Abe H, Takei N (2003) BDNF is upregulated by postnatal development and visual experience: quantitative and immunohistochemical analyses of BDNF in the rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 44:3211-3218.

Steinberg RH (1994) Survival factors in retinal degenerations. Curr Opin Neurobiol 4:515-524.

Szel A, Rohlich P (1992) Two cone types of rat retina detected by anti-visual pigment antibodies. Exp Eye Res 55:47-52.

Szel A, Rohlich P, Caffe AR, Juliusson B, Aguirre G, Van Veen T (1992) Unique topographic separation of two spectral classes of cones in the mouse retina. J Comp Neurol 325:327-342.

Valter K, Bisti S, Stone J (2003) Location of CNTFRalpha on outer segments: evidence of the site of action of CNTF in rat retina. Brain Res 985:169-175.

Valter K, Maslim J, Bowers F, Stone J (1998) Photoreceptor dystrophy in the RCS rat: roles of oxygen, debris, and bFGF. Invest Ophthalmol Vis Sci 39:2427-2442.

Valter K, van Driel D, Bisti S, Stone J (2002) FGFR1 expression and FGFR1-FGF-2 colocalisation in rat retina: sites of FGF-2 action on rat photoreceptors. Growth Factors 20:177-188.

Valter K, Bisti S, Gargini C, Di Loreto S, Maccarone R, Cervetto L, Stone J (2005) Time course of neurotrophic factor upregulation and retinal protection against light-induced damage after optic nerve section. Invest Ophthalmol Vis Sci 46:1748-1754.

Walsh N, Valter K, Stone J (2001) Cellular and subcellular patterns of expression of bFGF and CNTF in the normal and light stressed adult rat retina. Exp Eye Res 72:495-501.

Wen R, Song Y, Cheng T, Matthes MT, Yasumura D, LaVail MM, Steinberg RH (1995) Injury-induced upregulation of bFGF and CNTF mRNAS in the rat retina. J Neurosci 15:7377-7385.

Wen R, Cheng T, Song Y, Matthes MT, Yasumura D, LaVail MM, Steinberg RH (1998) Continuous exposure to bright light upregulates bFGF and CNTF expression in the rat retina. Curr Eye Res 17:494-500.

Wenzel A, Grimm C, Samardzija M, Reme CE (2005) Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. Prog Retin Eye Res 24:275-306. Epub 2004 Nov 2011.

Zhang C, Lei B, Lam TT, Yang F, Sinha D, Tso MO (2004) Neuroprotection of photoreceptors by minocycline in light-induced retinal degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 45:2753-2759.

IV.7- Figures

Figure 1. Representative microphotographs of retinas obtained from juvenile rats at P14 (A), P20 (B), P28 (C) and at 2 months of age (D) illustrating the normal development of the retina. Note the constant decrease of the retinal thickness between P14 and 2 months. A reduction of the ONL thickness was more obvious between P14 and P20 and between P28 and 2 months. Abbreviations: RPE: retinal pigmented epithelium; OS: outer segments; IS: inner segments; ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer; FL: nerve fiber layer. Scale bar: 50 µm.

Figure 2. Representative microphotographs of retinas obtained from juvenile rats exposed for 6 (P14-P20; B-C) and 14 (P14-P28; F-G) days to bright light. Retinas were collected immediately after 6 (B) or 14 (F) days of exposure and from control (unexposed) rats aged P20 (A) or P28 (E). Delayed damages were observed in animals reaching 2 months of age after 6 days (C) and 14 days (G) of light treatment. Adult rat retinas exposed for 6 (D) or 14 days (H) to the same intensity of light displayed complete photoreceptor disappearance 1 month after light offset. Abbreviations: RPE: retinal pigmented epithelium; OS: outer segments; IS: inner segments; ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer; FL: nerve fiber layer. Scale bar: 50 μm.

Figure 3. Kinetic of outer nuclear layer (ONL) thickness decrease in young exposed rats (ordinate: μm ± 1 S.D.) measured at different postnatal ages (P14, P20, P28 and P60). The thickness of the ONL was reported during the normal development of the rat retina (squares) and in retinas of rats exposed for 6 (P14-P20; diamonds) or 14 (P14-P28; circles) days to light.

Figure 4. Photoreceptor cell death visualized by TUNEL method. Representative pictures of retinas obtained from normal (unexposed) rats aged P14 (A), P20 (B) and P28 (C) and from rats exposed for 6 (P14-P20; D) and 14 (P14-P28; E) days to bright light are presented here. (F) Quantitative analysis of TUNEL-positive cells (ordinate: number of nuclei ± 1 S.D.) in photoreceptor layer has been reported. Statistical analysis was performed using a Student *t*-test (* $P<0.05$) and comparing control animals (white bar) and exposed animals (gray bars) respectively after 6 and 14 days of exposure. Abbreviations: PL: photoreceptor layer; ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer. Scale bar: 100 μm (A-E).

Figure 5. Variations of FGF-2 (A), CNTF (B) and BDNF (C) protein levels in exposed animals by western-blot analysis. Retinas were collected from control (unexposed) rats at P14 (white bars), P20 and P28 (gray bars) of age and from rats exposed (black bars) for 6 days (P14-P20) or for 14 days (P14-P28) to light. To determine the acute effect of light on neurotrophin expression, we collected retinas from control (non-exposed) adults (noted as *Ad*; gray bar) and from adults exposed for 1 day to light (noted as *Ad*; black bar). To compare adults and juveniles, retinas from juvenile rats at P21 were collected from non-exposed rats (gray bars) and rats exposed for 1 day (black bars). The quantification was performed by normalizing each neurotrophic factor level with that of the γ-actin (ordinate: ratio/γ-actin in mean ± 1 S.D.). The molecular weight (in kDa) of each band is indicated on the right of the graphs. For FGF-2, the signal is constituted by a doublet (22 and 24 kDa) and by a unique band at 18 kDa which was used for quantification.

Figure 6. Cellular localization of FGF-2 in control (unexposed) retinas (A) and in rat retinas exposed for 14 days (B). Fluorescent microscopy images of retinal sections revealed an up-regulation of the FGF-2 staining in the inner nuclear layer (INL) (B). Co-localization of FGF-2 immunostaining (C) with anti-CRALBP (cellular retinaldehyde binding protein) staining (D), specific for cell bodies and radial processes of the Müller glial cells, demonstrated that Müller cells actively up-regulated FGF-2 after light exposure (E). Abbreviations: PL: photoreceptor layer; ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer. Scale bars: 100 μm (A, B) and 50 μm (C-E).

Figure 7. Cellular localization of CNTF in control (unexposed) retinas (A, B) and in rat retinas exposed for 6 (C) or 14 days (D) days to light. Fluorescent microscopy images of retinal sections revealed an up-regulation of the CNTF staining in the inner nuclear layer (INL) after 6 (C) and after 14 days of light (D). Co-localization of CNTF immunostaining (E) with anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein) labeling (F), specific for active Müller glial cells, demonstrated that Müller cells actively up-regulated CNTF after light exposure (G). Abbreviations: PL: photoreceptor layer; ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer. Scale bars: 100 μm (A-D) and 50 μm (E-G).

Figure 8. Representative microphotographs of inferior (A, C, E, G, I, K) and superior (B, D, F, H, J, L) retinas obtained from control (unexposed) rats at P20 (A, B) or P28 (G, H) and from rats exposed for 6 (P14-P20; C-F) or 14 (P14-P28; I-L) days to bright light. Retinas were collected either immediately after offset of light exposure (C, D and I, J) or at 2 months of age (E, F and K, L). The thickness of the outer nuclear layer (ONL; in μm ± 1 S.D.) was quantified for each regimen of exposure (indicated on the abscissa) in the superior (black bars) and the inferior (gray bars) retinas (M). To determine changes in FGF-2 and CNTF protein levels in both retinal hemispheres, retinas were dissected into superior and inferior hemi-retinal samples in intact and juvenile exposed rats for 6 days (N). Molecular weights (kDa) are indicated on the left of each western-blot. Abbreviations: RPE: retinal pigmented epithelium; OS: outer segments; IS: inner segments; ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer; FL: nerve fiber layer. Scale bar: 50 μm (A-L).

FIGURE 1

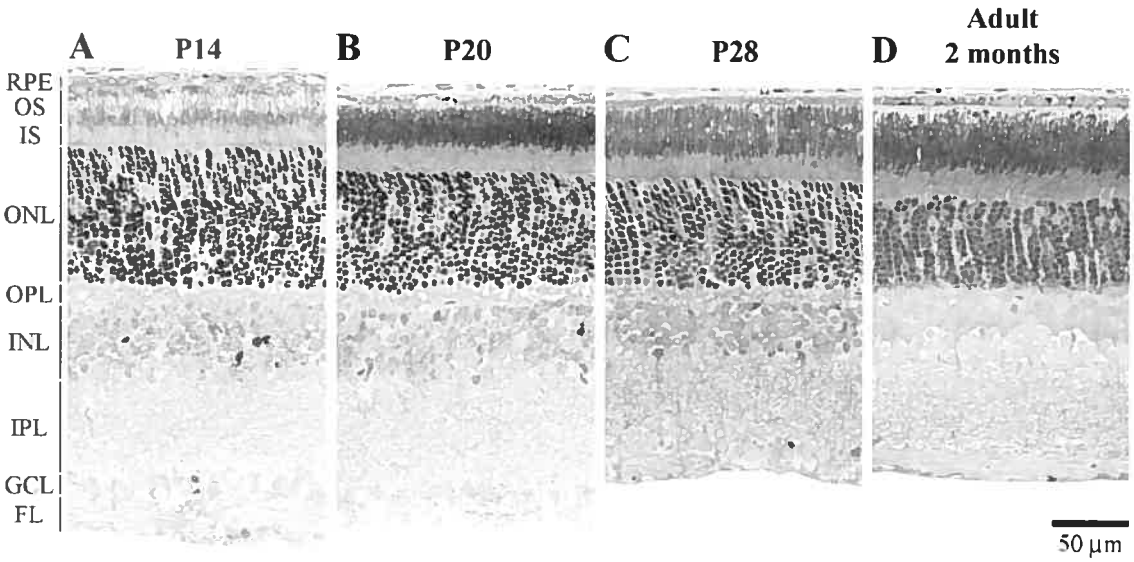
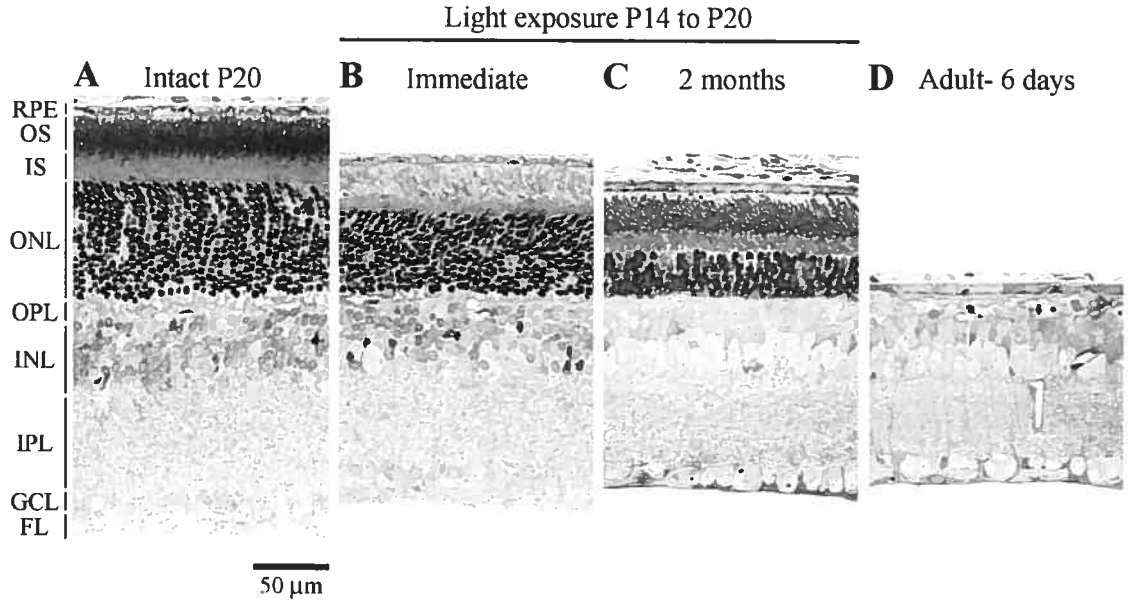

A
P14
B
P20
C
P28
D
Adult
2 months
RPE
OS
IS
ONL
OPL
INL
IPL
GCL
FL
50 µm

FIGURE 2


Light exposure P14 to P20
A Intact P20
B Immediate
C 2 months
D Adult- 6 days
RPE
OS
IS
ONL
OPL
INL
IPL
GCL
FL
50 µm

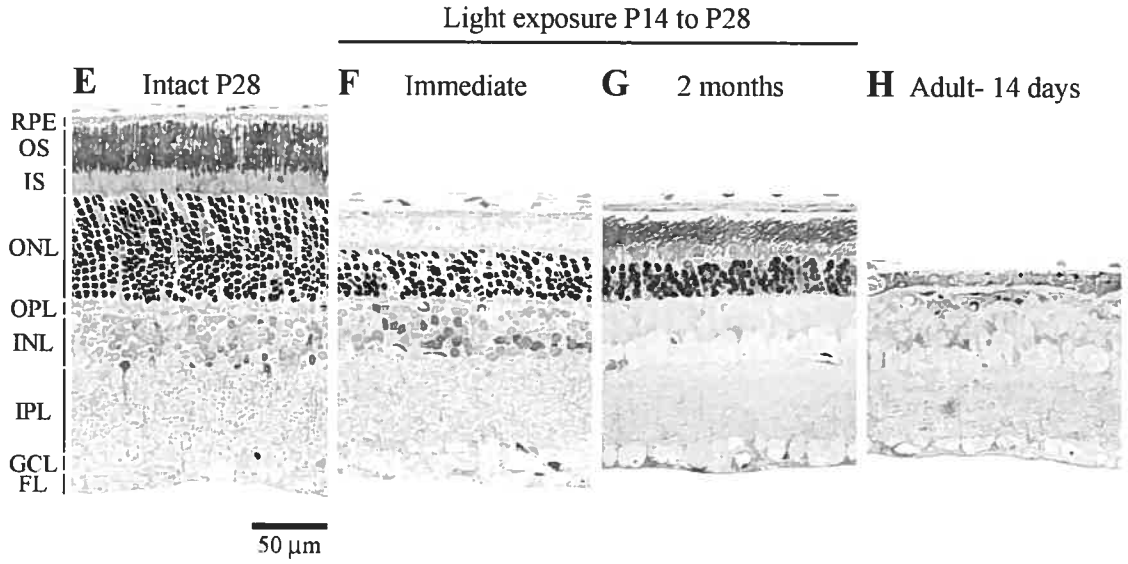

Light exposure P14 to P28
E Intact P28
F Immediate
G 2 months
H Adult- 14 days
RPE
OS
IS
ONL
OPL
INL
IPL
GCL
FL
50 µm

FIGURE 3

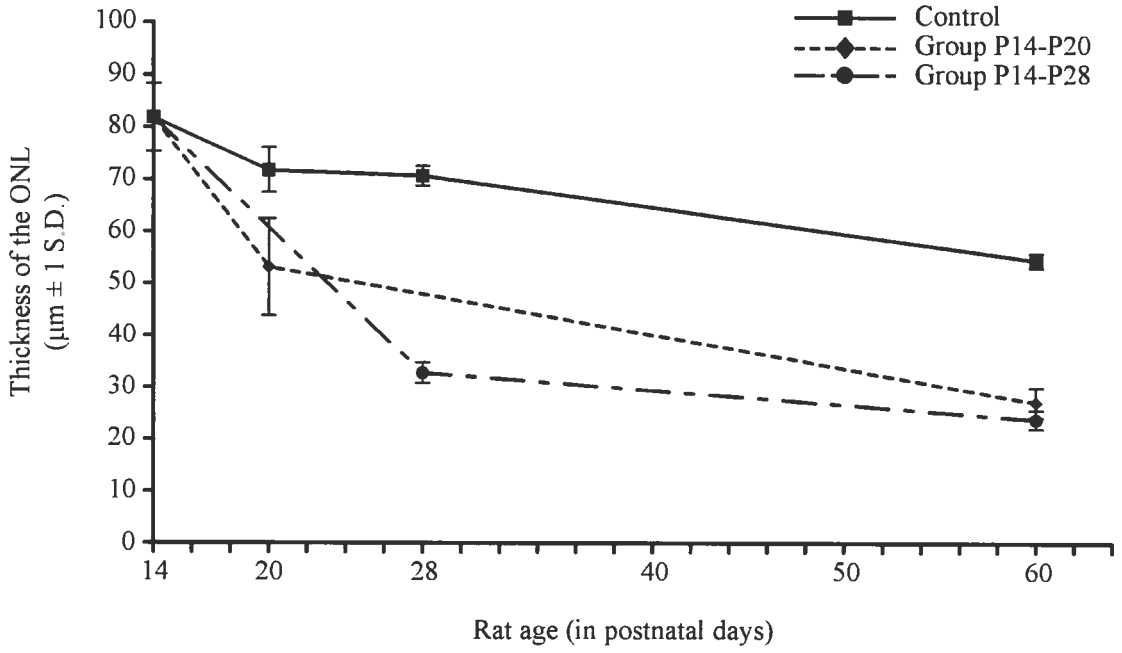
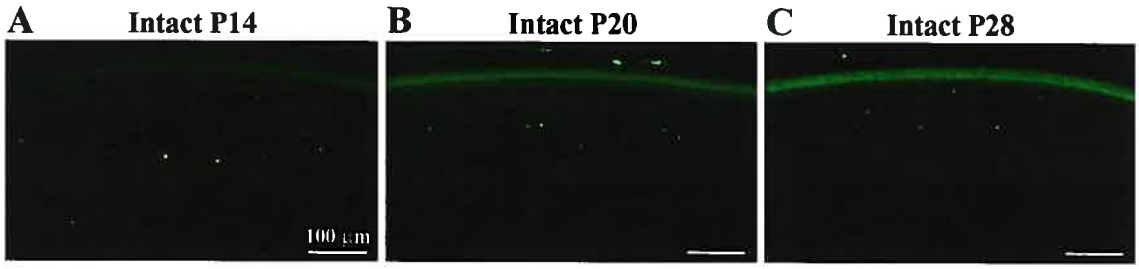
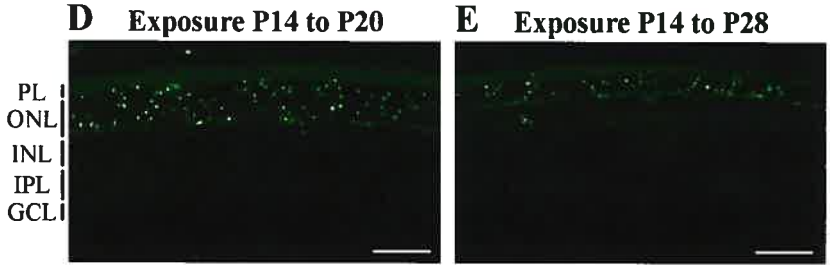

Control
Group P14-P20
Group P14-P28
Thickness of the ONL
(µm ± 1 S.D.)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
14
20
28
40
50
60
Rat age (in postnatal days)

FIGURE 4


A
Intact P14
B
Intact P20
C
Intact P28
100 µm


D
Exposure P14 to P20
E
Exposure P14 to P28
PL
ONL
INL
IPL
GCL

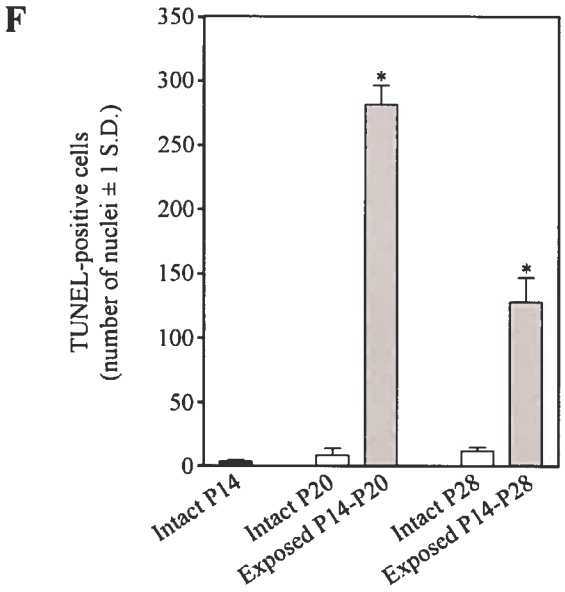

F
TUNEL-positive cells
(number of nuclei ± 1 S.D.)
350
300
250
200
150
100
50
0
*
*
Intact P14
Intact P20
Exposed P14-P20
Intact P28
Exposed P14-P28

FIGURE 5

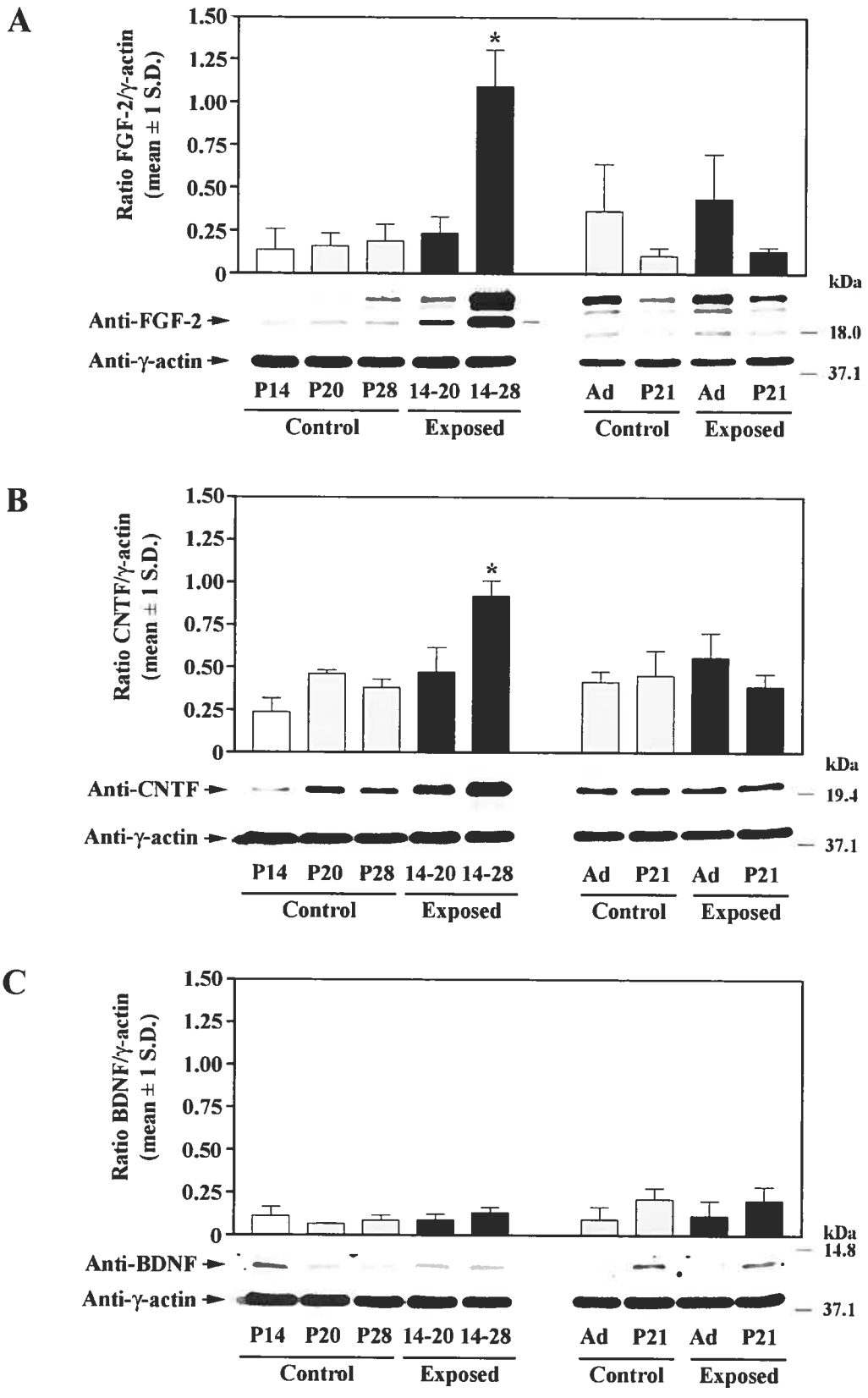

A
Ratio FGF-2/γ-actin (mean ± 1 S.D.)
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0
*
kDa
Anti-FGF-2
18.0
Anti-γ-actin
37.1
P14 P20 P28 14-20 14-28 Ad P21 Ad P21
Control Exposed Control Exposed
B
Ratio CNTF/γ-actin (mean ± 1 S.D.)
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0
*
kDa
Anti-CNTF
19.4
Anti-γ-actin
37.1
P14 P20 P28 14-20 14-28 Ad P21 Ad P21
Control Exposed Control Exposed
C
Ratio BDNF/γ-actin (mean ± 1 S.D.)
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0
kDa
Anti-BDNF
14.8
Anti-γ-actin
37.1
P14 P20 P28 14-20 14-28 Ad P21 Ad P21
Control Exposed Control Exposed

FIGURE 6

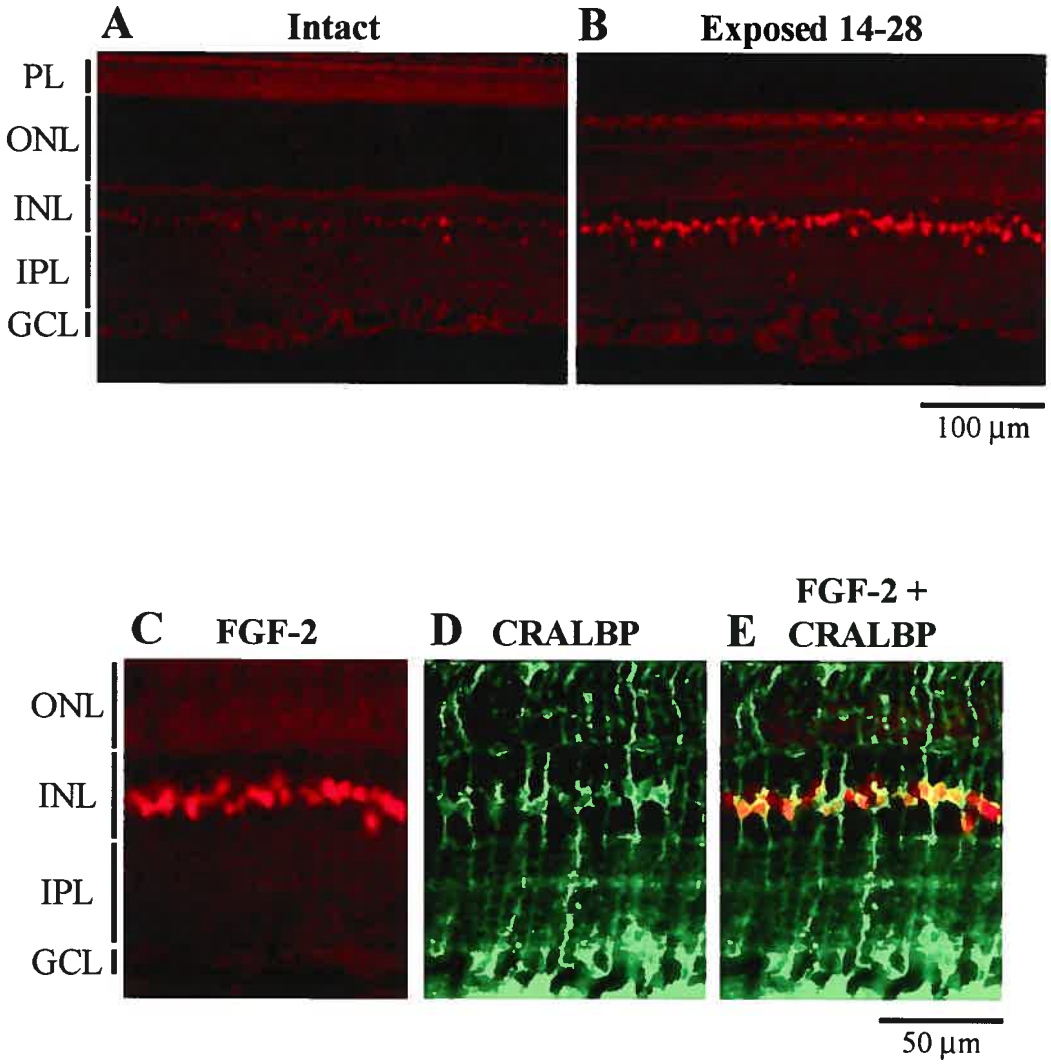
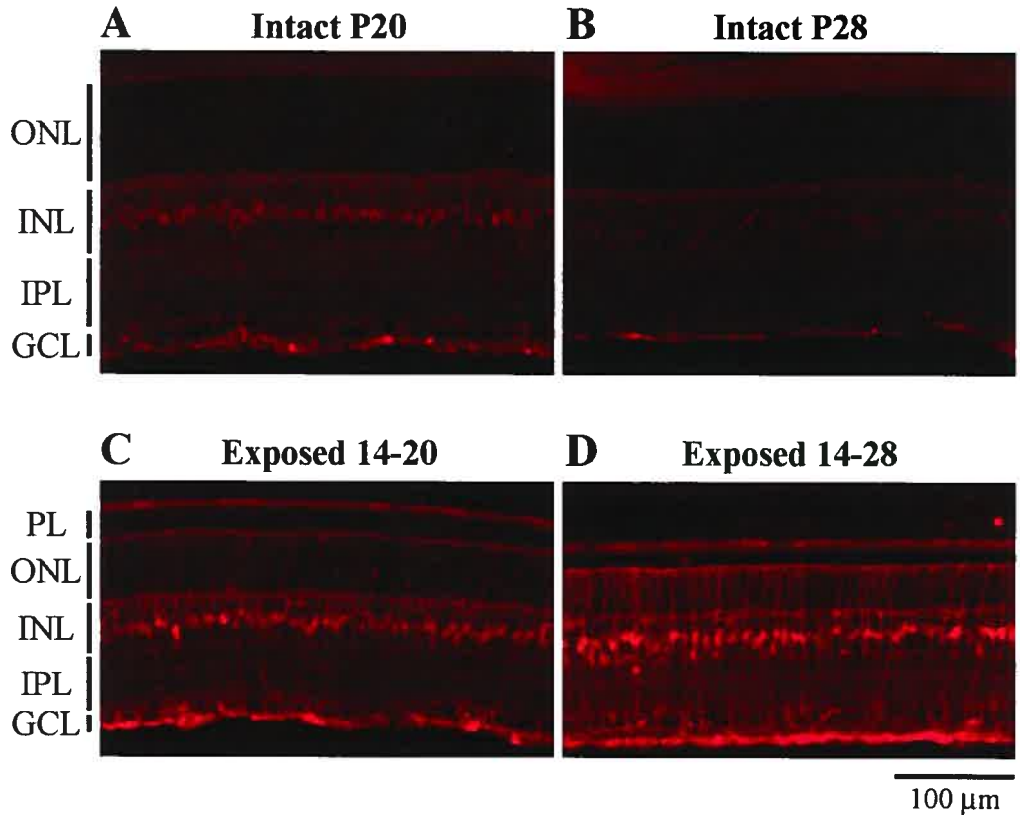

A
Intact
B
Exposed 14-28
PL
ONL
INL
IPL
GCL
100 µm
C
FGF-2
D
CRALBP
E
FGF-2 +
CRALBP
ONL
INL
IPL
GCL
50 µm

FIGURE 7


A
Intact P20
B
Intact P28
ONL
INL
IPL
GCL
C
Exposed 14-20
D
Exposed 14-28
PL
ONL
INL
IPL
GCL
100 µm

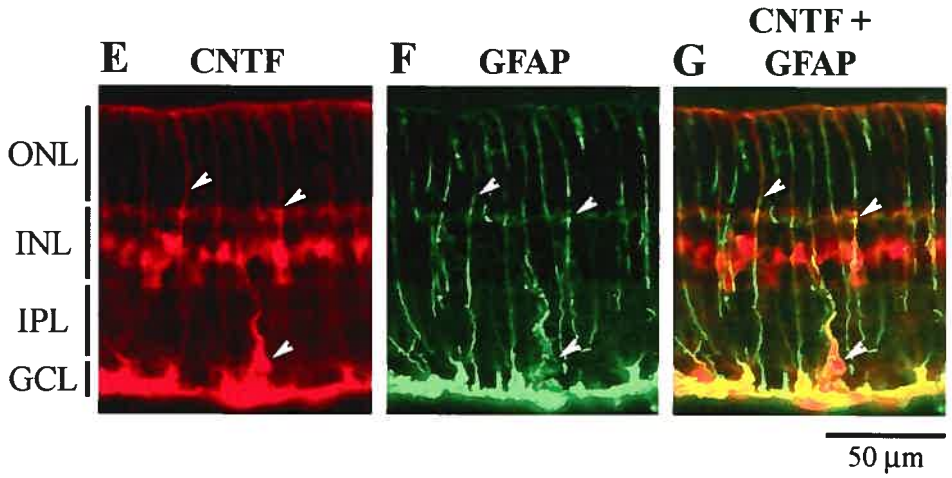
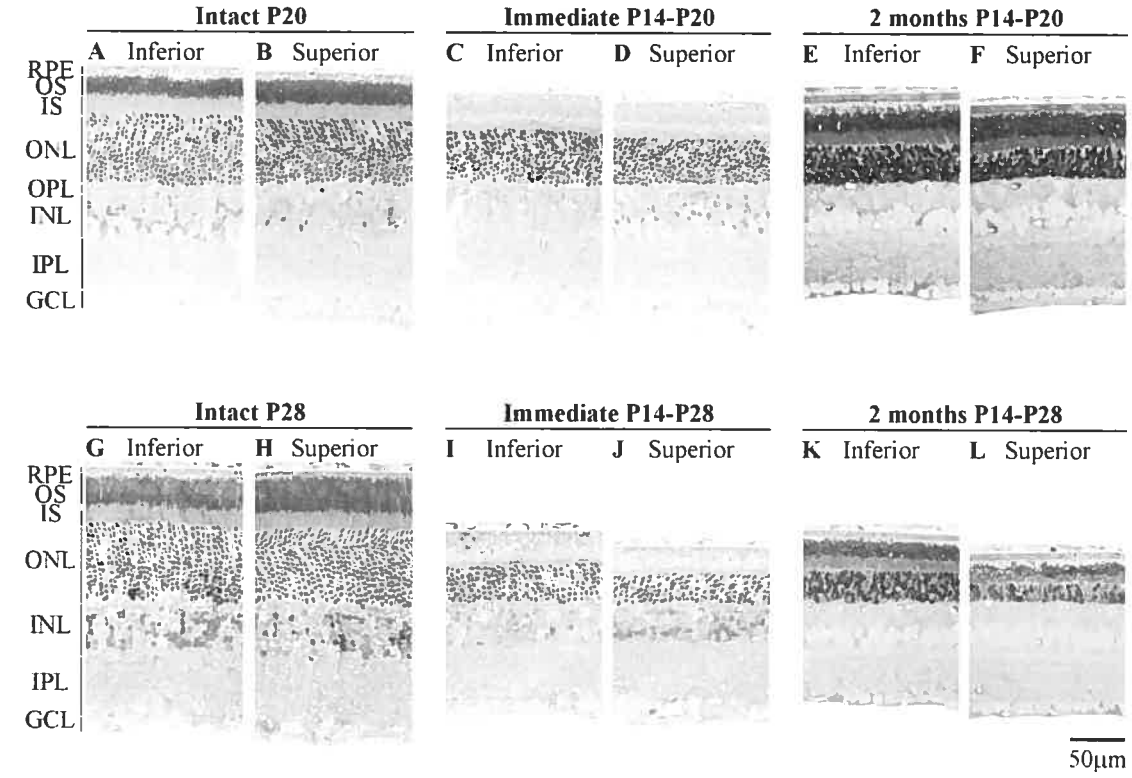
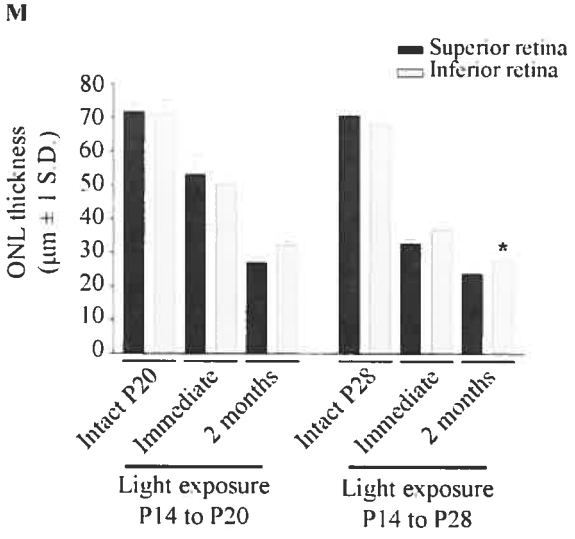
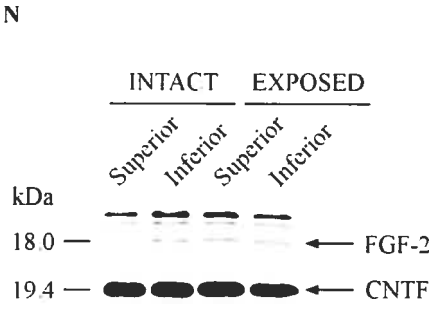

E
CNTF
F
GFAP
G
CNTF +
GFAP
ONL
INL
IPL
GCL
50 µm

FIGURE 8


Intact P20
Immediate P14-P20
2 months P14-P20
A Inferior
B Superior
C Inferior
D Superior
E Inferior
F Superior
RPE
OS
IS
ONL
OPL
INL
IPL
GCL
Intact P28
Immediate P14-P28
2 months P14-P28
G Inferior
H Superior
I Inferior
J Superior
K Inferior
L Superior
50µm


M
Superior retina
Inferior retina
ONL thickness (µm ± 1 S.D.)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
Intact P20
Immediate
2 months
Intact P28
Immediate
2 months
Light exposure P14 to P20
Light exposure P14 to P28


N
INTACT
EXPOSED
Superior
Inferior
Superior
Inferior
kDa
18.0
19.4
FGF-2
CNTF

CHAPITRE 5

DISCUSSION GÉNÉRALE

V.1- <u>Résistance des photorécepteurs aux dommages lumineux.</u>

Les dommages engendrés par la lumière intense ont été très bien documentés chez l'animal adulte (Noell et al., 1966; Penn et al., 1989; Organisciak et al., 2003), mais peu d'études se sont penchées sur les effets délétères d'une exposition chez des animaux en développement. Les études présentées dans cette thèse montrent que, pendant le premier mois postnatal, la rétine des jeunes rats fait preuve d'une grande résistance face au stress lumineux, comparé à des rétines de rats adultes soumises aux mêmes conditions expérimentales. La résistance endogène fonctionnelle observée après analyse des données électrophysiologiques est étroitement corrélée avec une résistance structurelle constatée après étude histologique. Cette résistance faiblit au fur et à mesure que l'on se rapproche de la fin du premier mois postnatal et les jeunes rats finissent par présenter des dommages similaires à ceux des adultes.

D'autres exemples de résistance ont été rapportés chez des rétines juvéniles. Après un stress chimique (injection d'iodate de sodium) ou nutritionnel (déficience en vitamine A) occasionné pendant la période périnatale, les segments externes des photorécepteurs présentent un développement normal jusqu'à P14, tandis qu'une dégénérescence débute vers P20 (Amemiya, 1977; Harada et al., 2000). De même, les photorécepteurs des rétines de jeunes rats sont préservés après une période hyperoxique (80% O_2) ayant lieu pendant les 2 premières semaines postnatales. Par contre, des données électrophysiologiques et histologiques montrent une altération des photorécepteurs quand l'exposition se produit entre P14 et P28 (Dembinska et al., 2001). Après une hyperoxie, les dommages cellulaires, localisés dans la rétine interne, sont sûrement une conséquence directe de l'effet de l'O_2 sur les vaisseaux sanguins. La lumière, quant à elle, induit des dommages au niveau de la rétine externe en dégradant les photorécepteurs. La régionalisation des dommages causés par ces deux stresses oxydatifs pourrait donc provenir de l'activation de voies de signalisation différentes, comme celle de l'oxyde nitrique synthase ou de la cyclooxygénase pour l'oxygène (Hardy et al., 2005) et celle de la peroxydation lipidique pour la lumière (De La Paz and Anderson, 1992 ; Demontis et al., 2002). De manière générale, les photorécepteurs semblent être partiellement protégés jusqu'à la troisième semaine de développement postnatal suite à des traitements avec des facteurs toxiques incluant la lumière.

De façon similaire, les rétines de souris démontrent une formidable résistance de leurs couches internes après un traitement avec le NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate), un agoniste du glutamate. Chez les animaux adultes, le NMDA a un effet dévastateur sur la

rétine et induit une diminution sévère de l'épaisseur de la CPI et une perte des cellules ganglionnaires (Siliprandi et al., 1992; Lam et al., 1999). Par contre, des rétines postnatales exposées à des doses létales de NMDA ne semblent pas être affectées avant 30 jours d'âge postnatal (Izumi et al., 1995). La rétine interne, comme la rétine externe, est donc résistante aux blessures chimiques pendant le premier mois de développement postnatal.

La résistance des jeunes animaux peut être généralisée à l'ensemble du système nerveux central. En effet, il a été démontré que des blessures du cortex visuel induisaient des réponses différentes entre un adulte et un animal jeune (Payne and Lomber, 2002). Le cerveau d'un animal en développement est aussi plus résistant aux lésions induites par un épisode d'anoxie que le cerveau d'un animal adulte (Fazekas et al., 1941; Jacobson and Windle, 1960; Duffy et al., 1975). Le système nerveux central des jeunes animaux démontre une résistance endogène formidable face à différents types de blessures. Nos données sont toutefois les premières qui délimitent clairement une fenêtre temporelle de résistance rétinienne à des dommages lumineux en combinant une approche électrophysiologique et histologique.

V.2- Définition de la période critique.

Pendant la période développementale, toutes les cellules rétiniennes sont formées en excès, y compris les photorécepteurs (Alexiades and Cepko, 1996). Les cellules vont ensuite disparaître pour atteindre le nombre présent chez l'adulte. Lors du développement normal, la période d'apoptose des cellules de la CNI s'étend de P7 à ~ P15 chez le rat albinos et culmine aux alentours de P10. Pour la CNE, la période de mort s'étend de P15 à P25 et atteint son apogée vers P22. En fait, la période d'apoptose dans la CNE coïncide avec la diminution de la mort dans la CNI (Maslim et al., 1997). Le nom de "période critique" a été donné à cet intervalle de temps sans que l'on sache comment la régulation de la mort permet d'atteindre un nombre précis de photorécepteurs (Maslim et al., 1997). Une telle période a aussi été définie chez la souris entre P10 et P26 (Mervin and Stone, 2002b). Dans cet intervalle de temps, la mort des photorécepteurs semble influençable par des facteurs exogènes comme la teneur en O_2 dans l'environnement. Par exemple, l'hyperoxie provoquerait la survie des photorécepteurs alors que l'hypoxie entraînerait plutôt leur mort (Maslim et al., 1997; Mervin and Stone, 2002a). Plus on se rapproche de la fin de la période critique et moins les photorécepteurs sont protégés.

Dans le deuxième article de la thèse, nous avons exposé des rats juvéniles entre P14 et P28 pendant différents intervalles de temps. Nos expositions ont donc eu lieu pendant la période critique. Il se pourrait que la mort cellulaire résultant des dommages lumineux soit masquée par l'apoptose développementale normale survenant pendant cette période critique. Dans notre étude, ceci expliquerait pourquoi après 6 jours d'exposition (P14-P20) l'épaisseur de la CNE est seulement diminuée de 26% (Article 3, Figures 2A et 2B). Pour une exposition prolongée de 14 jours entre P14 et P28, l'épaisseur de la CNE n'est diminuée que de 54% par rapport à l'épaisseur normale observée chez un rat témoin âgé de 28 jours postnatal (Article 3, Figures 2E, F). Par contre, vers la fin de la période critique les dommages ne seraient plus assimilés à la mort naturelle développementale des photorécepteurs et s'accumuleraient pour conduire à des dommages proches de ceux de l'adulte (P28-P34 ; Article 2, Figures 1K, 2B et 3J). Par ailleurs, nous avons observé à 2 mois d'âge le même degré de dommages après 6 jours qu'après 14 jours d'exposition entre P14 et P28 (Article 2, Figures 3G et 3H ; Article 3, Figures 2C, 2G and Figure 3). Ces résultats indiquent que les dommages dans cette période ne dépendent pas de la dose toxique de lumière et qu'au-delà d'un certain niveau de mort, les dommages lumineux n'évoluent plus lors de la période critique. Comme nous l'avons proposé dans le 2ième article de la thèse, l'âge du rat semble plus important que la durée de l'exposition. Par exemple, 6 jours d'exposition entre P14 et P20 sont moins dommageables pour la rétine que 6 jours d'exposition entre P28 et P34 (Article 2, Figures 1H, 1K et 2B, Figures 3G et 3J).

V.3- <u>Les facteurs neurotrophiques dans le mécanisme de résistance endogène</u>

V.3.1- <u>L'augmentation des facteurs neurotrophiques dans la blessure rétinienne</u>.

Les facteurs neurotrophiques ont été abondamment étudiés comme facteurs protecteurs dans la rétine. Les travaux de LaVail ont démontré que de nombreux facteurs neurotrophiques étaient efficaces dans la protection des photorécepteurs adultes (LaVail et al., 1992). Ainsi, une injection intravitréenne de FGF-1, FGF-2, BDNF, CNTF, NT-3, IGF-II (*Insulin-like Growth Factor II*) ou IL-1β (*Interleukin-1β*) peut protéger les photorécepteurs des dommages occasionnés par une exposition lumineuse constante. De manière similaire, les photorécepteurs peuvent être protégés d'un stress lumineux par injection préalable de PEDF (Cao et al., 2001b; Imai et al., 2005) ou LEDGF (Machida et al., 2001).

Nos résultats ont démontré un effet protecteur du BDNF dans des rétines de rats adultes (Annexe 1). Suite à l'injection d'un adénovirus contenant le gène du BDNF (Ad-BDNF), les photorécepteurs ont été protégés après une exposition de 5 et même 10 jours de lumière constante (Annexe 1, Figures 5 et 6). Dans cette étude, le mode de délivrance du BDNF est novateur puisque l'adénovirus a infecté spécifiquement les cellules de Müller, qui servent d'intermédiaires dans la neuroprotection des photorécepteurs.

Chez les animaux juvéniles, nos données suggèrent que l'exposition lumineuse entraîne une sur-régulation des niveaux protéiques de FGF-2 et CNTF après 14 jours de lumière (Article 3, Figures 5A et 5B). Les niveaux obtenus suite à cette surexpression dépassent de 3 et de 2 fois les niveaux de FGF-2 et CNTF, respectivement, par rapport à un animal adulte non-exposé (Article 3, Figures 5A et 5B). Étonnamment, les niveaux protéiques de BDNF ne changent pas suite à l'exposition des jeunes animaux (Article 3, Figure 5C). Nos données suggèrent que ce sont les cellules de Müller qui sur-expriment les facteurs FGF-2 et CNTF (Article 3, Figures 6E et 7G). Des études précédentes ont déjà démontré que les cellules de Müller étaient une source importante de FGF-2 (Faktorovich et al., 1992; Wen et al., 1995; Cao et al., 1997a), supportant ainsi les résultats que nous avons trouvés. Des facteurs neurotrophiques tels que CNTF et FGF-2 peuvent être produits par les cellules de Müller en réponse à des lésions de la rétine (Kostyk et al., 1994; Wen et al., 1995; Cao et al., 1997b; Honjo et al., 2000; Walsh et al., 2001; Valter et al., 2005). De plus, une étude a montré l'action directe des facteurs neurotrophiques sur l'activation des cellules de Müller, suggérant des effets indirects des neurotrophines sur les photorécepteurs via les cellules de Müller (Wahlin et al., 2000). Cependant, on ne sait pas encore comment les cellules de Müller peuvent avoir connaissance de "l'état de détresse" du photorécepteur et se mettre à devenir une source de facteurs neurotrophiques.

V.3.2- <u>Gliose des cellules de Müller</u>.

Les cellules de Müller entrent en gliose après l'exposition à la lumière (Grosche et al., 1995). Un des marqueurs les plus utilisés pour déceler la gliose est la GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) qui est normalement indétectable dans les processus et les corps cellulaires des cellules de Müller. Ce filament intermédiaire est augmenté dans les cellules de Müller lors des dommages lumineux (de Raad et al., 1996) ou des blessures mécaniques de la rétine (Cao et al., 2001a). Le rôle de la gliose des cellules de

Müller dans la survie des photorécepteurs est ambigu. D'une part, les cellules de Müller activées par le stress lumineux semblent avoir un effet délétère sur les photorécepteurs. La surexpression du récepteur $p75^{NTR}$ dans les cellules de Müller parait impliquée dans la mort indirecte des photorécepteurs (Harada et al., 2000). Si la fonction de p75 est bloquée par un anticorps (Rex), la survie des photorécepteurs augmente après exposition lumineuse (Harada et al., 2000). D'autre part, nous avons démontré que les cellules de Müller produisaient des facteurs neurotrophiques tels que CNTF et FGF-2 (Article 3, Figures 6 et 7) chez l'animal juvénile exposé à la lumière. Les cellules de Müller doivent être informées de l'état d'altération des photorécepteurs. Plusieurs études indiquent que les cellules microgliales jouent le rôle d'intermédiaire entre les photorécepteurs et les cellules de Müller (Figure 5). Après l'exposition à la lumière, les cellules microgliales passent d'un état de repos à un état actif (Harada et al., 2002; Zhang et al., 2005a). Les cellules microgliales migrent rapidement des couches de la rétine interne vers la CNE grâce au MCP-3 (*Monocyte Chemoattractant Protein-3*) (Zhang et al., 2005b). Une fois dans la CNE, les cellules microgliales libèrent certaines molécules telles que le GDNF qui stimulent la synthèse de FGF-2 par les cellules de Müller (Harada et al., 2002). De manière très intéressante, les cellules microgliales peuvent, à l'inverse, inhiber la production de FGF-2 dans les cellules de Müller en libérant du NGF (Harada et al., 2002). Cette baisse de FGF-2 est associée à la mort des photorécepteurs (Harada et al., 2002). La libération de GDNF par les cellules microgliales pourrait être indirectement impliquée dans la sécrétion de FGF-2 de la part des cellules de Müller chez le raton (Article 3, Figure 6), bien que cette hypothèse n'ait pas été testée expérimentalement dans la thèse. Les facteurs neurotrophiques pourraient alors diffuser des cellules de Müller vers les photorécepteurs et exercer leurs effets neuroprotecteurs via les récepteurs somatiques du FGF-2, FGFR-1, présents dans la CNE (Sapieha et al., 2003; Valter et al., 2005) et les récepteurs du CNTF, CNTFR-α, localisés au niveau des segments externes (Valter et al., 2003). Une manière de tester la contribution des facteurs neurotrophiques FGF-2 et CNTF à la résistance des photorécepteurs serait d'inhiber leur action avec des anticorps "bloqueurs de la fonction" des récepteurs ("function blocker antibody") et d'observer les effets de la lumière sur la mort des photorécepteurs.

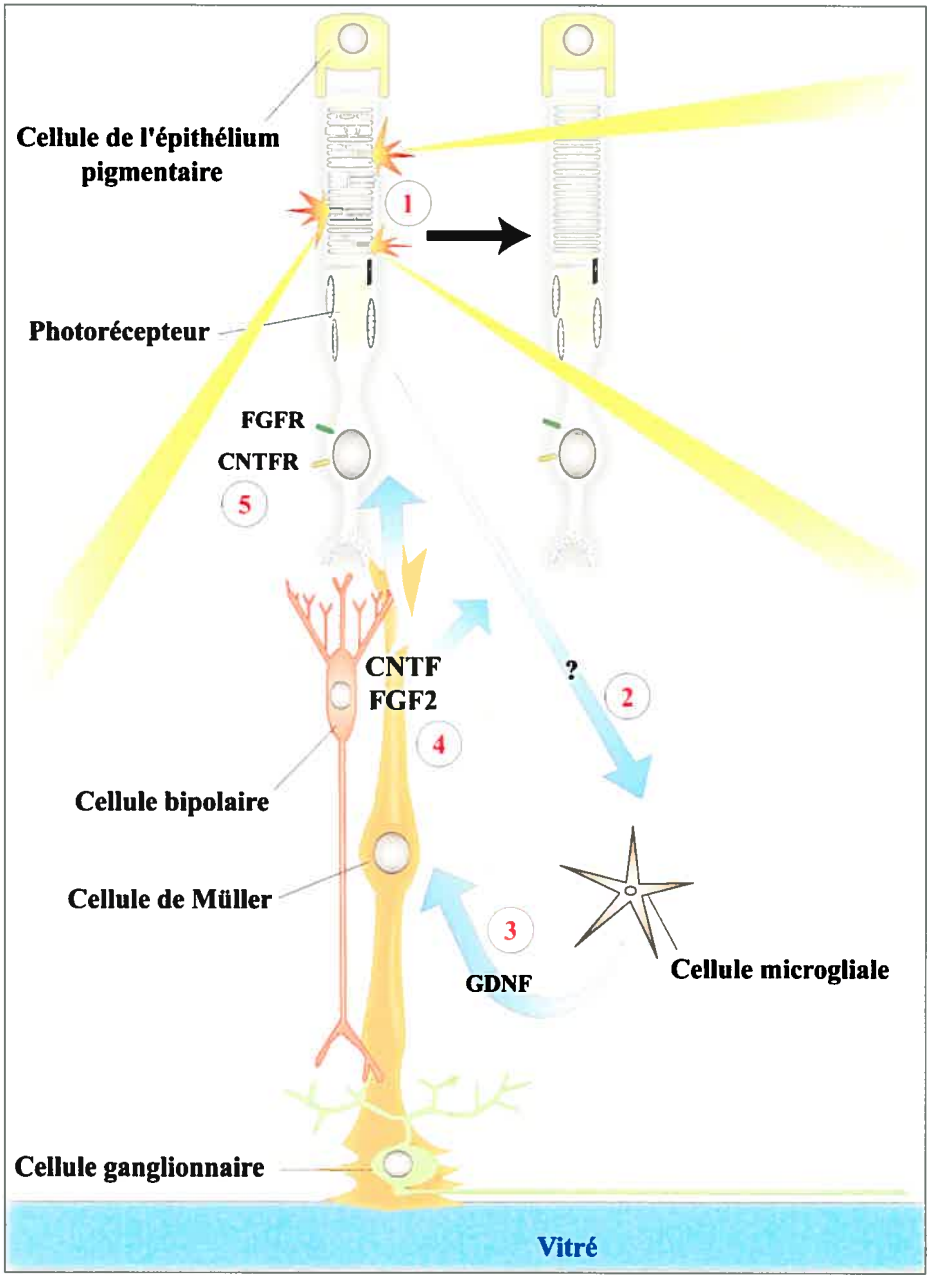


Figure 5. Modèle hypothétique de résistance de la rétine juvénile aux dommages lumineux. (1) Les données de la thèse démontent une résistance des photorécepteurs chez la rétine juvénile exposée à des doses toxiques de lumière. Il est possible que les cellules microgliales reçoivent un signal (2) de la part des photorécepteurs (*Monocyte Chemoattractant Protein-3*, MCP-3?) qui les recrutent dans la CNE. Les cellules microgliales sont capables de sécréter du GDNF (3) pour stimuler la libération secondaire de FGF-2 (et CNTF?) par les cellules de Müller (4). La forte stimulation des récepteurs CNTFR et FGFR (5) par le CNTF et le FGF-2 à la surface des photorécepteurs pourrait contribuer à la neuroprotection endogène démontrée dans la thèse. © Vincent Pernet.

V.4- Autres mécanismes de neuroprotection dans le système visuel immature.

V.4.1- Modulation des voies apoptotiques par le DHA.

Les photorécepteurs sont des cellules rétiniennes extrêmement riches en acides gras polyinsaturés, notamment en DHA (acide docosahexaènoïque), qui leur confèrent une plus grande sensibilité face aux agents oxydatifs. Le DHA pourrait jouer un double rôle dans la rétine. Le DHA est avant tout un composant structurel des membranes des segments externes des photorécepteurs. En effet, le DHA représente environ 50% de la composition lipidique totale des membranes (Stone et al., 1979). De plus, il semblerait qu'il puisse aussi se comporter comme un facteur trophique vis-à-vis des photorécepteurs et ainsi permettre leur survie *in vitro* (Rotstein et al., 1996). Les travaux de Rotstein ont démontré que la concentration de DHA était régulée pendant le développement et que les concentrations les plus élevées étaient observées pendant les périodes de croissance et de différenciation du photorécepteur. Plusieurs études tendent à montrer que la disponibilité du DHA conditionne la survie ou la mort du photorécepteur et que des quantités trop faibles de DHA pourraient déclencher leur mort (Rotstein et al., 1997). Cette théorie représente une certaine analogie avec la "théorie des facteurs neurotrophiques" (Levi-Montalcini, 1987). Bien que l'acide palmitique, l'acide oléique et l'acide arachidonique exercent certains effets de survie sur les photorécepteurs, seul le DHA protège les photorécepteurs en agissant sur les mécanismes de mort de type apoptotique (Rotstein et al., 1997; Kim et al., 2000). De plus, il a été démontré que le DHA interagissait avec la cascade de signalisation apoptotique en augmentant le niveau de protéines anti-apoptotique comme Bcl-2 et en diminuant le niveau de molécules pro-apoptotiques, comme Bax dans les photorécepteurs en culture (Rotstein et al., 2003).

Des expériences faites à partir de cellules dérivées de l'épithélium pigmentaire humain, ARPE 19, ont permis d'élucider une partie du mécanisme anti-apoptotique du DHA (Mukherjee et al., 2004; Bazan et al., 2005). Les cellules ARPE-19 peuvent servir de réservoir de DHA pour les photorécepteurs (Rodriguez de Turco et al., 1999) et sont capables de le transformer en un facteur neuroprotecteur appelé la neuroprotectine D1 ou NPD1 après un stress oxydatif (Mukherjee et al., 2004). La NPD1 est en fait un docosatriène (10, 17S-docosatriène) obtenu par la transformation de DHA par des enzymes comme la PLA_2 et une lipoxygénase (Mukherjee et al., 2004). Suite à un stress oxydatif, la NPD1 diminue la condensation nucléaire et la fragmentation d'ADN, l'activation de la caspase-3 et l'expression des protéines pro-apoptotiques comme Bax

et Bad. Parallèlement, la NPD1 augmente l'expression des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Blc-x_L (Mukherjee et al., 2004; Bazan et al., 2005). Après ischémie/reperfusion, la NPD1 régule les niveaux de facteurs de transcription impliqués dans l'induction de la mort, comme AP-1 ou p53, et inhibe l'induction de la réaction pro-inflammatoire par COX-2 et l'activation de NF_kB (Marcheselli et al., 2003; Bazan et al., 2005). Il a été suggéré que la NPD1 sécrétée par les cellules de l'épithélium pigmentaire pourrait diffuser à travers la matrice extracellulaire et pourrait agir de manière paracrine sur les photorécepteurs (Mukherjee et al., 2004).

L'exposition à la lumière déclenche des phénomènes de peroxydation lipidique au niveau des segments externes des photorécepteurs (Wiegand et al., 1983; Akpalaba et al., 1986; Organisciak et al., 1989; De La Paz and Anderson, 1992; Kayatz et al., 1999; Demontis et al., 2002) et il a précédemment été montré qu'une exposition constante de 3 jours à 800 lux diminuait de 7% la quantité de DHA dans une rétine de rat adulte (Li et al., 2001). Suite au stress oxydatif engendré par la lumière, l'EP des rats juvéniles pourrait synthétiser NPD1 qui contribuerait à la neuroprotection des photorécepteurs en modulant les voies de signalisation impliquées dans le déclenchement de l'apoptose. Cependant, lorsque les niveaux de DHA ne sont plus suffisants pour assurer le rôle trophique initial, il y aurait déclenchement de la mort du photorécepteur et ceci pourrait correspondre à ce que nous observons pour les périodes d'exposition les plus tardives (P14-P28, P20-P28 et P28-P34 ; Article 2).

V.4.2- <u>Action des enzymes anti-oxydantes et mécanismes de réparation.</u>

Dans la rétine de grenouille, l'activité des enzymes anti-oxydantes est régulée à la hausse après exposition à la lumière (Yusifov et al., 2000). Ainsi, les niveaux de glutathione peroxydase, de SOD (*Superoxide Dismutase*) et de la catalase augmentent respectivement de 47%, de 40% et de 62% dans l'épithélium pigmentaire alors qu'aucune augmentation n'a été montrée dans la rétine (Yusifov et al., 2000). Chez le rongeur adulte, il a été montré que les niveaux des protéines antioxydantes telles que la métallothionéine, la céruloplasmine, l'hème oxygénase-1 (Kutty et al., 1995; Chen et al., 2004), la glutathione peroxydase (Ohira et al., 2003) et la thiorédoxine (Tanito et al., 2002) étaient augmentés par l'exposition à la lumière. Cependant, on ne sait pas si l'expression des enzymes antioxydantes est augmentée chez le rat nouveau-né pour limiter les dégradations cellulaires causées par un environnement lumineux intense.

V.5- Rétinopathie induite par la lumière et rétinite pigmentaire.

Certaines analogies existent entre les dommages induits par la lumière et les dommages rétiniens présents dans la rétinite pigmentaire.

Nos données ont montré que l'exposition d'une rétine juvénile à la lumière induisait, en premier, une dégénérescence des bâtonnets suivie par une perte des cônes (Articles 1 et 2). De manière similaire, la dégénérescence des photorécepteurs caractéristique de la RP débute par la perte des bâtonnets situés dans la rétine, suivie par la mort secondaire des cônes (Berson, 1993; Milam et al., 1998). Des études ont montré que, dans les cas de RP, les changements les plus précoces des bâtonnets résidaient en une diminution de la longueur de leurs segments externes (Milam et al., 1998). Nos résultats ont démontré, de manière similaire, un raccourcissement significatif de la longueur des segments externes des photorécepteurs après l'exposition à la lumière (Article 2, Figure 4B et Article 3, Figure 2). Il est intéressant de noter que dans les modèles de dégénérescence rétinienne comme chez le rat RCS, la perte des photorécepteurs survient après la troisième semaine postnatale (Wang et al., 2005). Nos données suggèrent que les dommages rétiniens dans les maladies neurodégénératives ou après une blessure pourraient émerger lorsque la résistance endogène s'atténue après la troisième semaine postnatale. Contrairement aux modèles animaux génétiquement induits, notre modèle d'exposition à la lumière permet de contrôler le déclenchement des dommages à différents âges.

Dans notre étude, après l'exposition à la lumière les rétines de rats juvéniles présentaient une diminution de l'épaisseur de la couche nucléaire externe s'accompagnant d'une augmentation de l'épaisseur de la couche nucléaire interne (Article 2, Figures 4B et 4E). Ce phénomène ne se produit pas après une exposition chez les rétines adultes (Article 2, Figure 4A et 4D). Nous avons donc postulé l'existence d'un phénomène de compensation (Article 2) avec de possibles remodelages cellulaires tels que l'hypertrophie des cellules de Müller ou des cellules horizontales (Marc et al., 2003; Jones and Marc, 2005) spécifiques aux jeunes rats. De façon tout à fait remarquable, de tels processus de remodelage ont été décrits dans un modèle murin de RP, la souris *rd/rd* (Strettoi et al., 2002; Strettoi et al., 2003). L'hypertrophie des cellules de Müller a aussi été démontrée dans des cas de RP chez l'humain (Milam et al., 1998). De plus, l'expression de la protéine GFAP est fortement sur-exprimée dans les cellules de Müller (Milam et al., 1998). Il a été démontré, dans des cas avancés de RP, qu'une couche constituée par un épaississement des extensions des cellules de

Müller remplaçait les photorécepteurs en dégénérescence (Milam et al., 1998). D'après nos marquages immunohistochimiques, les cellules de Müller deviennent gliotiques après l'exposition à la lumière comme le reflète l'expression de la protéine GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) (Article 3, Figure 7F). Il est donc possible que la gliose observée dans notre modèle soit responsable de l'épaississement de la CNI observée chez le juvénile en réponse aux dommages subis par les photorécepteurs (Article 2, Figure 4B). Nous pouvons supposer que la gliose chez le juvénile s'accompagne de la libération abondante des facteurs neurotrophiques que nous avons rapportée.

L'exposition à un environnement lumineux intense déclenche des phénomènes de peroxydation lipidique et de stress oxydatif (Organisciak and Winkler, 1994; Hanna et al., 1997; Boulton et al., 2001; Demontis et al., 2002). De manière analogue, il a récemment été démontré que les dommages oxydatifs seraient une des causes de la mort secondaire des cônes dans la RP (Shen et al., 2005).

Les similitudes énoncées ci-dessus entre les deux pathologies laissent donc penser que la rétinopathie induite par la lumière serait un modèle pour mieux comprendre les mécanismes de mort dans la rétinite pigmentaire.

V.6- Conclusion générale.

Nos données démontrent pour la première fois l'existence d'une période de résistance des rétines juvéniles par rapport aux rétines adultes après une exposition lumineuse intense et suggèrent que les mécanismes impliquent les facteurs neurotrophiques tels que FGF-2 et CNTF.

Les rares études réalisées chez les jeunes animaux ont utilisé un environnement lumineux relativement peu intense. Dans la première étude, nous avons exposé, avant l'ouverture des paupières, des ratons nouveau-nés à un environnement lumineux de 10 000 lux. Nos résultats ont montré que les animaux nouveau-nés développaient des dommages rétiniens beaucoup moins sévères et beaucoup plus tardifs (~1,5 mois après l'exposition) que les adultes soumis aux mêmes conditions expérimentales. Dans la deuxième étude correspondant au troisième chapitre de cette thèse, nous avons rapporté les conséquences d'une telle exposition lumineuse chez des rats juvéniles après l'ouverture des paupières. De manière encore plus surprenante, la résistance observée précédemment chez les rats nouveau-nés a été étendue aux rats juvéniles. Nos résultats ont démontré que cette résistance endogène des jeunes animaux perdurait jusqu'à la fin du premier mois de développement postnatal. Nous avons aussi montré que les

dommages rétiniens étaient asymétriques et que la rétine supérieure était plus affectée que la rétine inférieure. De plus, la rétinopathie induite par la lumière s'accompagnait d'un épaississement de la couche nucléaire interne dont le rôle reste à clarifier.
Dans la dernière partie de cette thèse, nous avons envisagé le rôle des facteurs neurotrophiques dans la résistance des rétines de rats juvéniles. Nos résultats ont montré que les niveaux endogènes de FGF-2 et de CNTF étaient fortement sur-régulés dans les cellules de Müller après une exposition lumineuse intense chez le rat juvénile.

D'autres investigations devront être faites pour déterminer l'importance de ces facteurs de survie dans la résistance endogène découverte par nos travaux.

RÉFÉRENCES

Abraham MC, Shaham S (2004) Death without caspases, caspases without death. Trends Cell Biol 14:184-193.

Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV, Pearce-Kelling SE, Anand V, Zeng Y, Maguire AM, Jacobson SG, Hauswirth WW, Bennett J (2001) Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. Nat Genet 28:92-95.

Aejaz Syeed S, Vohra H, Gupta A, Ganguly NK (2001) Apoptosis: Molecular machinery. Current Science 80:349-360.

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

Ahnelt PK, Kolb H (2000) The mammalian photoreceptor mosaic-adaptive design. Prog Retin Eye Res 19:711-777.

Airaksinen MS, Saarma M (2002) The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. Nat Rev Neurosci 3:383-394.

Akpalaba CO, Oraedu AC, Nwanze EA (1986) Biochemical studies on the effects of continuous light on the albino rat retina. Exp Eye Res 42:1-9.

Alexiades MR, Cepko C (1996) Quantitative analysis of proliferation and cell cycle length during development of the rat retina. Dev Dyn 205:293-307.

Amemiya T (1977) Postnatal maldevelopment of the retina. Biol Neonate 32:319-326.

Arden GB, Brown KT (1965) Some Properties of Components of the Cat Electroretinogram Revealed by Local Recording under Oil. J Physiol 176:429-461.

Baloh RH, Enomoto H, Johnson EM, Jr., Milbrandt J (2000) The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development. Curr Opin Neurobiol 10:103-110.

Battelle BA, LaVail MM (1978) Rhodopsin content and rod outer segment length in albino rat eyes: modification by dark adaptation. Exp Eye Res 26:487-497.

Batten ML, Imanishi Y, Tu DC, Doan T, Zhu L, Pang J, Glushakova L, Moise AR, Baehr W, Van Gelder RN, Hauswirth WW, Rieke F, Palczewski K (2005) Pharmacological and rAAV Gene Therapy Rescue of Visual Functions in a Blind Mouse Model of Leber Congenital Amaurosis. PLoS Med 2:e333.

Bazan NG, Marcheselli VL, Cole-Edwards K (2005) Brain response to injury and neurodegeneration: endogenous neuroprotective signaling. Ann N Y Acad Sci 1053:137-147.

Beltran WA, Rohrer H, Aguirre GD (2005) Immunolocalization of ciliary neurotrophic factor receptor alpha (CNTFRalpha) in mammalian photoreceptor cells. Mol Vis 11:232-244.

Ben Sira I, Nissenkorn I, Kremer I (1988) Retinopathy of prematurity. Surv Ophthalmol 33:1-16.

Bennett J, Maguire AM (2000) Gene therapy for ocular disease. Mol Ther 1:501-505.

Bennett J, Zeng Y, Bajwa R, Klatt L, Li Y, Maguire AM (1998) Adenovirus-mediated delivery of rhodopsin-promoted bcl-2 results in a delay in photoreceptor cell death in the rd/rd mouse. Gene Ther 5:1156-1164.

Berson DM (2003) Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. Trends Neurosci 26:314-320.

Berson EL (1993) Retinitis pigmentosa. The Friedenwald Lecture. Invest Ophthalmol Vis Sci 34:1659-1676.

Besch D, Zrenner E (2003) Prevention and therapy in hereditary retinal degenerations. Doc Ophthalmol 106:31-35.

Bessant DA, Payne AM, Mitton KP, Wang QL, Swain PK, Plant C, Bird AC, Zack DJ, Swaroop A, Bhattacharya SS (1999) A mutation in NRL is associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. Nat Genet 21:355-356.

Birch DG, Jacobs GH (1980) Light-induced damage to photopic and scotopic mechanisms in the rat depends on rearing conditions. Exp Neurol 68:269-283.

Bonaventure N, Wioland N, Roussel G (1985) Stereospecific effects of the alpha-aminoadipic acid on the retina: a morphological and electrophysiological study. Doc Ophthalmol 61:71-77.

Bonnet D, Garcia M, Vecino E, Lorentz JG, Sahel J, Hicks D (2004) Brain-derived neurotrophic factor signalling in adult pig retinal ganglion cell neurite regeneration in vitro. Brain Res 1007:142-151.

Bons N, Szafarczyk A, Assenmacher I (1977) Effects of the light level and duration of the photoperiod on the retina of albino rats. Acta Anat (Basel) 97:333-338.

Bonting SL, Caravaggio LL, Gouras P (1961) The rhodopsin cycle in the developing vertebrate retina. I. Relation of rhodopsin content, electroretinogram and rod structure in the rat. Exp Eye Res 1:14-24.

Bothwell M (1995) Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. Annu Rev Neurosci 18:223-253.

Boulton M, Rozanowska M, Rozanowski B (2001) Retinal photodamage. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 64:144-161.

Braekevelt CR, Hollenberg MJ (1970) The development of the retina of the albino rat. Am J Anat 127:281-301.

Brown KT, Wiesel TN (1961) Analysis of the intraretinal electroretinogram in the intact cat eye. J Physiol (Paris) 158:229-256.

Bush RA, Williams TP (1991) The effect of unilateral optic nerve section on retinal light damage in rats. Exp Eye Res 52:139-153.

Calvert PD, Krasnoperova NV, Lyubarsky AL, Isayama T, Nicolo M, Kosaras B, Wong G, Gannon KS, Margolskee RF, Sidman RL, Pugh EN, Jr., Makino CL, Lem J (2000) Phototransduction in transgenic mice after targeted deletion of the rod transducin alpha -subunit. Proc Natl Acad Sci U S A 97:13913-13918.

Cao W, Li F, Steinberg RH, Lavail MM (2001a) Development of normal and injury-induced gene expression of aFGF, bFGF, CNTF, BDNF, GFAP and IGF-I in the rat retina. Exp Eye Res 72:591-604.

Cao W, Wen R, Li F, Cheng T, Steinberg RH (1997a) Induction of basic fibroblast growth factor mRNA by basic fibroblast growth factor in Muller cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 38:1358-1366.

Cao W, Wen R, Li F, Lavail MM, Steinberg RH (1997b) Mechanical injury increases bFGF and CNTF mRNA expression in the mouse retina. Exp Eye Res 65:241-248.

Cao W, Tombran-Tink J, Elias R, Sezate S, Mrazek D, McGinnis JF (2001b) In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. Invest Ophthalmol Vis Sci 42:1646-1652.

Cao W, Rajala RV, Li F, Anderson RE, Wei N, Soliman CE, McGinnis JF (2003) Neuroprotective effect of estrogen upon retinal neurons in vitro. Adv Exp Med Biol 533:395-402.

Cayouette M, Smith SB, Becerra SP, Gravel C (1999) Pigment epithelium-derived factor delays the death of photoreceptors in mouse models of inherited retinal degenerations. Neurobiol Dis 6:523-532.

Cayouette M, Behn D, Sendtner M, Lachapelle P, Gravel C (1998) Intraocular gene transfer of ciliary neurotrophic factor prevents death and increases

responsiveness of rod photoreceptors in the retinal degeneration slow mouse. J Neurosci 18:9282-9293.

Cepko CL, Austin CP, Yang X, Alexiades M, Ezzeddine D (1996) Cell fate determination in the vertebrate retina. Proc Natl Acad Sci U S A 93:589-595.

Chan-Ling T, Tout S, Hollander H, Stone J (1992) Vascular changes and their mechanisms in the feline model of retinopathy of prematurity. Invest Ophthalmol Vis Sci 33:2128-2147.

Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Davisson MT, Nusinowitz S, Heckenlively JR (2002) Retinal degeneration mutants in the mouse. Vision Res 42:517-525.

Chang GQ, Hao Y, Wong F (1993) Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice. Neuron 11:595-605.

Chaum E (2003) Retinal neuroprotection by growth factors: a mechanistic perspective. J Cell Biochem 88:57-75.

Chen CK, Burns ME, Spencer M, Niemi GA, Chen J, Hurley JB, Baylor DA, Simon MI (1999a) Abnormal photoresponses and light-induced apoptosis in rods lacking rhodopsin kinase. Proc Natl Acad Sci U S A 96:3718-3722.

Chen J, Simon MI, Matthes MT, Yasumura D, LaVail MM (1999b) Increased susceptibility to light damage in an arrestin knockout mouse model of Oguchi disease (stationary night blindness). Invest Ophthalmol Vis Sci 40:2978-2982.

Chen L, Wu W, Dentchev T, Wong R, Dunaief JL (2004) Increased metallothionein in light damaged mouse retinas. Exp Eye Res 79:287-293.

Cicerone CM (1976) Cones survive rods in the light-damaged eye of the albino rat. Science 194:1183-1185.

Cobb WA, Morton HB (1954) A new component of the human electroretinogram. J Physiol (London) 123:36-37.

Coleman ML, Olson MF (2002) Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis. Cell Death Differ 9:493-504.

Connell G, Bascom R, Molday L, Reid D, McInnes RR, Molday RS (1991) Photoreceptor peripherin is the normal product of the gene responsible for retinal degeneration in the rds mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 88:723-726.

Cortina MS, Gordon WC, Lukiw WJ, Bazan NG (2003) DNA repair in photoreceptor survival. Mol Neurobiol 28:111-122.

Cortina MS, Gordon WC, Lukiw WJ, Bazan NG (2005) Oxidative stress-induced retinal damage up-regulates DNA polymerase gamma and 8-oxoguanine-DNA-glycosylase in photoreceptor synaptic mitochondria. Exp Eye Res 81:742-750.

Cuenca N, Pinilla I, Sauve Y, Lund R (2005) Early changes in synaptic connectivity following progressive photoreceptor degeneration in RCS rats. Eur J Neurosci 22:1057-1072.

D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J, Matthes MT, Abderrahim H, LaVail MM, Vollrath D (2000) Mutation of the receptor tyrosine kinase gene Mertk in the retinal dystrophic RCS rat. Hum Mol Genet 9:645-651.

Dacey DM (1999) Primate retina: cell types, circuits and color opponency. Prog Retin Eye Res 18:737-763.

Dalke C, Graw J (2005) Mouse mutants as models for congenital retinal disorders. Exp Eye Res 81:503-512.

Daniele LL, Lillo C, Lyubarsky AL, Nikonov SS, Philp N, Mears AJ, Swaroop A, Williams DS, Pugh EN, Jr. (2005) Cone-like morphological, molecular, and electrophysiological features of the photoreceptors of the Nrl knockout mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci 46:2156-2167.

De La Paz MA, Anderson RE (1992) Lipid peroxidation in rod outer segments. Role of hydroxyl radical and lipid hydroperoxides. Invest Ophthalmol Vis Sci 33:2091-2096.

de Raad S, Szczesny PJ, Munz K, Remé CE (1996) Light damage in the rat retina: glial fibrillary acidic protein accumulates in Muller cells in correlation with photoreceptor damage. Ophthalmic Res 28:99-107.

de Rouck AF (1991) History of electroretinogram. In: Principles and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision (Heckenlively JR, Arden GB, eds). St. Louis, Baltimore, Boston, Chicago, London, Philadelphia, Sydney, Toronto: Mosby Year Book.

Dejneka NS, Rex TS, Bennett J (2003) Gene therapy and animal models for retinal disease. Dev Ophthalmol 37:188-198.

Dejneka NS, Surace EM, Aleman TS, Cideciyan AV, Lyubarsky A, Savchenko A, Redmond TM, Tang W, Wei Z, Rex TS, Glover E, Maguire AM, Pugh EN, Jr., Jacobson SG, Bennett J (2004) In utero gene therapy rescues vision in a murine model of congenital blindness. Mol Ther 9:182-188.

Delyfer MN, Leveillard T, Mohand-Said S, Hicks D, Picaud S, Sahel JA (2004) Inherited retinal degenerations: therapeutic prospects. Biol Cell 96:261-269.

Dembinska O, Rojas LM, Chemtob S, Lachapelle P (2002) Evidence for a brief period of enhanced oxygen susceptibility in the rat model of oxygen-induced retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 43:2481-2490.

Dembinska O, Rojas LM, Varma DR, Chemtob S, Lachapelle P (2001) Graded contribution of retinal maturation to the development of oxygen-induced retinopathy in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 42:1111-1118.

Demontis GC, Longoni B, Marchiafava PL (2002) Molecular steps involved in light-induced oxidative damage to retinal rods. Invest Ophthalmol Vis Sci 43:2421-2427.

Detwiler SR (1932) Experimental observations upon the developing rat retina. Journal of Comparative Neurology 55:473-492.

Di Polo A, Cheng L, Bray GM, Aguayo AJ (2000) Colocalization of TrkB and brain-derived neurotrophic factor proteins in green-red-sensitive cone outer segments. Invest Ophthalmol Vis Sci 41:4014-4021.

Doonan F, Donovan M, Cotter TG (2003) Caspase-independent photoreceptor apoptosis in mouse models of retinal degeneration. J Neurosci 23:5723-5731.

Dowling JE, Ripps H (1972) Adaptation in skate photoreceptors. J Gen Physiol 60:698-719.

Dryja TP, McGee TL, Reichel E, Hahn LB, Cowley GS, Yandell DW, Sandberg MA, Berson EL (1990) A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. Nature 343:364-366.

Duffy TE, Kohle SJ, Vannucci RC (1975) Carbohydrate and energy metabolism in perinatal rat brain: relation to survival in anoxia. J Neurochem 24:271-276.

Engelhardt M, Wachs FP, Couillard-Despres S, Aigner L (2004) The neurogenic competence of progenitors from the postnatal rat retina in vitro. Exp Eye Res 78:1025-1036.

Ezzeddine ZD, Yang X, DeChiara T, Yancopoulos G, Cepko CL (1997) Postmitotic cells fated to become rod photoreceptors can be respecified by CNTF treatment of the retina. Development 124:1055-1067.

Faber DS (1969) Analysis of slow transretinal potentials in response to light. In. Buffalo: New York.

Fain GL, Lisman JE (1999) Light, Ca2+, and photoreceptor death: new evidence for the equivalent-light hypothesis from arrestin knockout mice. Invest Ophthalmol Vis Sci 40:2770-2772.

Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM (1990) Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. Nature 347:83-86.

Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM (1992) Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat. J Neurosci 12:3554-3567.

Farber DB, Danciger JS, Aguirre G (1992) The beta subunit of cyclic GMP phosphodiesterase mRNA is deficient in canine rod-cone dysplasia 1. Neuron 9:349-356.

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

Fauser S, Luberichs J, Schuttauf F (2002) Genetic animal models for retinal degeneration. Surv Ophthalmol 47:357-367.

Fazekas JF, Alexander AD, Himich HE (1941) Tolerance of the newborn to anoxia. Am J Physiol 134:281-287.

Fischer AJ, Reh TA (2001) Muller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. Nat Neurosci 4:247-252.

Fischer AJ, Reh TA (2003a) Potential of Muller glia to become neurogenic retinal progenitor cells. Glia 43:70-76.

Fischer AJ, Reh TA (2003b) Growth factors induce neurogenesis in the ciliary body. Dev Biol 259:225-240.

Fonteille VL, Racine J, Joly S, Dorfman AL, Rosolen SG, Lachapelle P (2005) Do Rats Generate a Photopic a–Wave? Invest Ophthalmol Vis Sci:46:ARVO E-Abstract 2246.

Forrester JV, Dick AD, McMenamin PG, Lee WR (2002) Anatomy of the eye and orbit. In: The eye- Basic Sciences in Practice. Saunders, W.B. Edition (Forrester JV, Dick AD, McMenamin PG, Lee WR, eds), pp 1-98. Edinburgh, London, New York, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto.

Francois J, De Rouck A (1983) Retrolental fibroplasia and ERG. Doc Ophthalmol Proc Ser 37:287-291.

Frank RN (2004) Diabetic retinopathy. N Engl J Med 350:48-58.

Fuhrmann S, Kirsch M, Hofmann HD (1995) Ciliary neurotrophic factor promotes chick photoreceptor development in vitro. Development 121:2695-2706.

Fulton AB, Hansen RM (1996) Photoreceptor function in infants and children with a history of mild retinopathy of prematurity. J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis 13:566-571.

Fulton AB, Hansen RM, Dodge J, Williams TP (1998) Photoreceptor development and photostasis. In: Photostasis and Related Phenomena (Williams TP, Thistle AB, eds). New York: Plenum Press.

Furukawa T, Hanawa I (1955) Effects of some common cations on electroretinogram of the toad. Jpn J Physiol 5:289-300.

Gao H, Hollyfield JG (1996) Basic fibroblast growth factor: increased gene expression in inherited and light-induced photoreceptor degeneration. Exp Eye Res 62:181-189.

Gargini C, Bisti S, Demontis GC, Valter K, Stone J, Cervetto L (2004) Electroretinogram changes associated with retinal upregulation of trophic factors: observations following optic nerve section. Neuroscience 126:775-783.

Glass P (1988) Role of light toxicity in the developing retinal vasculature. Birth Defects Orig Artic Ser 24:103-117.

Glass P (1990) Light and the developing retina. Doc Ophthalmol 74:195-203.

Goldberg JL, Espinosa JS, Xu Y, Davidson N, Kovacs GT, Barres BA (2002) Retinal ganglion cells do not extend axons by default: promotion by neurotrophic signaling and electrical activity. Neuron 33:689-702.

Gordon WC, Casey DM, Lukiw WJ, Bazan NG (2002) DNA damage and repair in light-induced photoreceptor degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 43:3511-3521.

Gorgels TG, van Norren D (1995) Ultraviolet and green light cause different types of damage in rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 36:851-863.

Gorn RA, Kuwabara T (1967) Retinal damage by visible light. A physiologic study. Arch Ophthalmol 77:115-118.

Grignolo A, Orzalesi N, Castellazzo R, Vittone P (1969) Retinal damage by visible light in albino rats. An electron microscope study. Ophthalmologica 157:43-59.

Grimm C, Wenzel A, Hafezi F, Remé CE (2000a) Gene expression in the mouse retina: the effect of damaging light. Mol Vis 6:252-260.

Grimm C, Wenzel A, Hafezi F, Yu S, Redmond TM, Remé CE (2000b) Protection of Rpe65-deficient mice identifies rhodopsin as a mediator of light-induced retinal degeneration. Nat Genet 25:63-66.

Grimm C, Wenzel A, Williams T, Rol P, Hafezi F, Remé C (2001) Rhodopsin-mediated blue-light damage to the rat retina: effect of photoreversal of bleaching. Invest Ophthalmol Vis Sci 42:497-505.

Grosche J, Hartig W, Reichenbach A (1995) Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), glutamine synthetase (GS), and Bcl-2 protooncogene protein by Muller (glial) cells in retinal light damage of rats. Neurosci Lett 185:119-122.

Guité P, Lachapelle P (1990) The effect of 2-amino-4-phosphonobutyric acid on the oscillatory potentials of the electroretinogram. Doc Ophthalmol 75:125-133.

Hafezi F, Marti A, Munz K, Remé CE (1997) Light-induced apoptosis: differential timing in the retina and pigment epithelium. Exp Eye Res 64:963-970.

Hanna N, Peri KG, Abran D, Hardy P, Doke A, Lachapelle P, Roy MS, Orquin J, Varma DR, Chemtob S (1997) Light induces peroxidation in retina by activating prostaglandin G/H synthase. Free Radic Biol Med 23:885-897.

Harada T, Harada C, Nakayama N, Okuyama S, Yoshida K, Kohsaka S, Matsuda H, Wada K (2000) Modification of glial-neuronal cell interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration. Neuron 26:533-541.

Harada T, Harada C, Kohsaka S, Wada E, Yoshida K, Ohno S, Mamada H, Tanaka K, Parada LF, Wada K (2002) Microglia-Muller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. J Neurosci 22:9228-9236.

Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW (2002) Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. Science 295:1065-1070.

Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. Nature 407:770-776.

Hicks D (1998) Putative functions of fibroblast growth factors in retinal development, maturation and survival. Seminars in Cell and Developmental Biology 9:263-269.

Hitchcock P, Ochocinska M, Sieh A, Otteson D (2004) Persistent and injury-induced neurogenesis in the vertebrate retina. Prog Retin Eye Res 23:183-194.

Honjo M, Tanihara H, Kido N, Inatani M, Okazaki K, Honda Y (2000) Expression of ciliary neurotrophic factor activated by retinal Muller cells in eyes with NMDA- and kainic acid-induced neuronal death. Invest Ophthalmol Vis Sci 41:552-560.

Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. Annu Rev Neurosci 24:677-736.

Ikeda K, Tatsuno T, Noguchi H, Nakayama C (2004) Ciliary neurotrophic factor protects rat retina cells in vitro and in vivo via PI3 kinase. Curr Eye Res 29:349-355.

Ikeda K, Tanihara H, Tatsuno T, Noguchi H, Nakayama C (2003) Brain-derived neurotrophic factor shows a protective effect and improves recovery of the ERG b-wave response in light-damage. J Neurochem 87:290-296.

Imai D, Yoneya S, Gehlbach PL, Wei LL, Mori K (2005) Intraocular gene transfer of pigment epithelium-derived factor rescues photoreceptors from light-induced cell death. J Cell Physiol 202:570-578.

Ip NY, Yancopoulos GD (1996) The neurotrophins and CNTF: two families of collaborative neurotrophic factors. Annu Rev Neurosci 19:491-515.

Isenmann S, Kretz A, Cellerino A (2003) Molecular determinants of retinal ganglion cell development, survival, and regeneration. Prog Retin Eye Res 22:483-543.

Izumi Y, Kirby-Sharkey CO, Benz AM, Labruyere J, Price MT, Wozniak DF, Zorumski CF, Olney JW (1995) Age dependent sensitivity of the rat retina to the excitotoxic action of N-methyl-D-aspartate. Neurobiol Dis 2:139-144.

Jacobson HN, Windle WF (1960) Responses of foetal and newborn monkeys to asphyxia. J Physiol 153:447-465.

Jaissle GB, May CA, Reinhard J, Kohler K, Fauser S, Lutjen-Drecoll E, Zrenner E, Seeliger MW (2001) Evaluation of the rhodopsin knockout mouse as a model of pure cone function. Invest Ophthalmol Vis Sci 42:506-513.

Jindrova H (1998) Vertebrate phototransduction: activation, recovery, and adaptation. Physiol Res 47:155-168.

Johnson JE, Barde YA, Schwab M, Thoenen H (1986) Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells. J Neurosci 6:3031-3038.

Johnson LE, van Veen T, Ekstrom PA (2005) Differential Akt activation in the photoreceptors of normal and rd1 mice. Cell Tissue Res 320:213-222.

Jomary C, Neal MJ, Jones SE (2001) Characterization of cell death pathways in murine retinal neurodegeneration implicates cytochrome c release, caspase activation, and bid cleavage. Mol Cell Neurosci 18:335-346.

Jones BW, Marc RE (2005) Retinal remodeling during retinal degeneration. Exp Eye Res 81:123-137.

Kaldi I, Martin RE, Huang H, Brush RS, Morrison KA, Anderson RE (2003) Bright cyclic rearing protects albino mouse retina against acute light-induced apoptosis. Mol Vis 9:337-344.

Kaplan DR, Miller FD (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. Curr Opin Neurobiol 10:381-391.

Karlsson M, Lindqvist N, Mayordomo R, Hallbook F (2002) Overlapping and specific patterns of GDNF, c-ret and GFR alpha mRNA expression in the developing chicken retina. Mech Dev 114:161-165.

Karwoski C (1991) Introduction to the origins of electroretinographic components. In: Principles and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision (Heckenlively JR, Arden GB, eds), pp 87-90. St. Louis, Baltimore, Boston, Chicago, London, Philadelphia, Sydney, Toronto: Mosby Year Book.

Kaufmann SH, Hengartner MO (2001) Programmed cell death: alive and well in the new millennium. Trends Cell Biol 11:526-534.

Kayatz P, Heimann K, Schraermeyer U (1999) Ultrastructural localization of light-induced lipid peroxides in the rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 40:2314-2321.

Kedzierski W, Lloyd M, Birch DG, Bok D, Travis GH (1997) Generation and analysis of transgenic mice expressing P216L-substituted rds/peripherin in rod photoreceptors. Invest Ophthalmol Vis Sci 38:498-509.

Kedzierski W, Nusinowitz S, Birch D, Clarke G, McInnes RR, Bok D, Travis GH (2001) Deficiency of rds/peripherin causes photoreceptor death in mouse models of digenic and dominant retinitis pigmentosa. Proc Natl Acad Sci U S A 98:7718-7723.

Kennan A, Aherne A, Humphries P (2005) Light in retinitis pigmentosa. Trends Genet 21:103-110.

Kim HY, Akbar M, Lau A, Edsall L (2000) Inhibition of neuronal apoptosis by docosahexaenoic acid (22:6n-3). Role of phosphatidylserine in antiapoptotic effect. J Biol Chem 275:35215-35223.

King-Smith PE, Loffing DH, Jones R (1986) Rod and cone ERGs and their oscillatory potentials. Invest Ophthalmol Vis Sci 27:270-273.

Kirsch M, Fuhrmann S, Wiese A, Hofmann HD (1996) CNTF exerts opposite effects on in vitro development of rat and chick photoreceptors. Neuroreport 7:697-700.

Kirsch M, Lee MY, Meyer V, Wiese A, Hofmann HD (1997) Evidence for multiple, local functions of ciliary neurotrophic factor (CNTF) in retinal development: expression of CNTF and its receptors and in vitro effects on target cells. J Neurochem 68:979-990.

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

Knapp AG, Schiller PH (1984) The contribution of on-bipolar cells to the electroretinogram of rabbits and monkeys. A study using 2-amino-4-phosphonobutyrate (APB). Vision Res 24:1841-1846.

Kojima M, Zrenner E (1978) Off-components in response to brief light flashes in the oscillatory potential of the human electroretinogram. Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol 206:107-120.

Kolb H (1994) The architecture of functional neural circuits in the vertebrate retina. The Proctor Lecture. Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2385-2404.

Kolb H (2003) How the retina works. American Scientist 91:28-35.

Kostyk SK, D'Amore PA, Herman IM, Wagner JA (1994) Optic nerve injury alters basic fibroblast growth factor localization in the retina and optic tract. J Neurosci 14:1441-1449.

Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R (2005) Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. Trends Neurosci 7:7.

Kremer I, Levitt A, Goldberg G, Wilunsky E, Merlob P, Nissenkorn I (1992) The effect of light on oxygen-induced vasoproliferative retinopathy in newborn kittens. Invest Ophthalmol Vis Sci 33:1595-1598.

Kubota R, Hokoc JN, Moshiri A, McGuire C, Reh TA (2002) A comparative study of neurogenesis in the retinal ciliary marginal zone of homeothermic vertebrates. Brain Res Dev Brain Res 134:31-41.

Kutty RK, Kutty G, Wiggert B, Chader GJ, Darrow RM, Organisciak DT (1995) Induction of heme oxygenase 1 in the retina by intense visible light: suppression by the antioxidant dimethylthiourea. Proc Natl Acad Sci U S A 92:1177-1181.

Kuwabara T (1970) Retinal recovery from exposure to light. Am J Ophthalmol 70:187-198.

Kuwabara T, Gorn RA (1968) Retinal damage by visible light. An electron microscopic study. Arch Ophthalmol 79:69-78.

Kuwabara T, Funahashi M (1976) Light damage in the developing rat retina. Arch Ophthalmol 94:1369-1374.

La Vail MM, Rapaport DH, Rakic P (1991) Cytogenesis in the monkey retina. J Comp Neurol 309:86-114.

Lachapelle P (1994) The human suprathreshold photopic oscillatory potentials: method of analysis and clinical application. Doc Ophthalmol 88:1-25.

Lachapelle P (sous presse) The Oscillatory Potentials of the Electroretinogram. In: Principles and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision (Heckenlively JR, Arden GB, eds). St. Louis, Baltimore, Boston, Chicago, London, Philadelphia, Sydney, Toronto: Mosby Year Book.

Lachapelle P, Benoit J (1994) Interpretation of the filtered 100- to 1000-Hz electroretinogram. Doc Ophthalmol 86:33-46.

Lachapelle P, Benoit J, Guité P (1996) The effect of in vivo retinal cooling on the electroretinogram of the rabbit. Vision Res 36:339-344.

Lachapelle P, Benoit J, Guité P, Tran CN, Molotchnikoff S (1990) The effect of iodoacetic acid on the electroretinogram and oscillatory potentials in rabbits. Doc Ophthalmol 75:7-14.

Lam TT, Abler AS, Kwong JM, Tso MO (1999) N-methyl-D-aspartate (NMDA)--induced apoptosis in rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 40:2391-2397.

Lau D, Flannery J (2003) Viral-mediated FGF-2 treatment of the constant light damage model of photoreceptor degeneration. Doc Ophthalmol 106:89-98.

LaVail MM (1976) Survival of some photoreceptor cells in albino rats following long-term exposure to continuous light. Investigative Ophthalmology 15:64-70.

LaVail MM (1980) Eye pigmentation and constant light damage in the rat retina. In: The effects of constant light on visual processes (Williams TP, Baker BN, eds), pp 357-387. New York: Plenum Press.

LaVail MM, Matthes MT, Yasumura D, Steinberg RH (1997) Variability in rate of cone degeneration in the retinal degeneration (rd/rd) mouse. Exp Eye Res 65:45-50.

LaVail MM, Gorrin GM, Repaci MA, Thomas LA, Ginsberg HM (1987) Genetic regulation of light damage to photoreceptors. Invest Ophthalmol Vis Sci 28:1043-1048.

LaVail MM, Unoki K, Yasumura D, Matthes MT, Yancopoulos GD, Steinberg RH (1992) Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. Proc Natl Acad Sci U S A 89:11249-11253.

LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Lau-Villacorta C, Unoki K, Sung CH, Steinberg RH (1998) Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. Invest Ophthalmol Vis Sci 39:592-602.

LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Drenser KA, Flannery JG, Lewin AS, Hauswirth WW (2000) Ribozyme rescue of photoreceptor cells in P23H transgenic rats: long-term survival and late-stage therapy. Proc Natl Acad Sci U S A 97:11488-11493.

Lee FL, Yu DY, Tso MO (1990) Effect of continuous versus multiple intermittent light exposures on rat retina. Curr Eye Res 9:11-21.

Leveillard T, Mohand-Said S, Lorentz O, Hicks D, Fintz AC, Clerin E, Simonutti M, Forster V, Cavusoglu N, Chalmel F, Dolle P, Poch O, Lambrou G, Sahel JA (2004) Identification and characterization of rod-derived cone viability factor. Nat Genet 36:755-759.

Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor 35 years later. Science 237:1154-1162.

Levi-Montalcini R, Hamburger V (1951) Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. J Exp Zool 116:321-361.

Lewis GP, Linberg KA, Geller SF, Guerin CJ, Fisher SK (1999) Effects of the neurotrophin brain-derived neurotrophic factor in an experimental model of retinal detachment. Invest Ophthalmol Vis Sci 40:1530-1544.

Li F, Cao W, Anderson RE (2001) Protection of photoreceptor cells in adult rats from light-induced degeneration by adaptation to bright cyclic light. Exp Eye Res 73:569-577.

Li F, Cao W, Anderson RE (2003) Alleviation of constant-light-induced photoreceptor degeneration by adaptation of adult albino rat to bright cyclic light. Invest Ophthalmol Vis Sci 44:4968-4975.

Li T (2001) Disease model: photoreceptor degenerations. Trends Mol Med 7:133-135.

Liang FQ, Aleman TS, Dejneka NS, Dudus L, Fisher KJ, Maguire AM, Jacobson SG, Bennett J (2001a) Long-term protection of retinal structure but not function using RAAV.CNTF in animal models of retinitis pigmentosa. Mol Ther 4:461-472.

Liang FQ, Dejneka NS, Cohen DR, Krasnoperova NV, Lem J, Maguire AM, Dudus L, Fisher KJ, Bennett J (2001b) AAV-mediated delivery of ciliary neurotrophic factor prolongs photoreceptor survival in the rhodopsin knockout mouse. Mol Ther 3:241-248.

Lyubarsky AL, Lem J, Chen J, Falsini B, Iannaccone A, Pugh EN, Jr. (2002) Functionally rodless mice: transgenic models for the investigation of cone function in retinal disease and therapy. Vision Res 42:401-415.

Machida S, Chaudhry P, Shinohara T, Singh DP, Reddy VN, Chylack LT, Jr., Sieving PA, Bush RA (2001) Lens epithelium-derived growth factor promotes photoreceptor survival in light-damaged and RCS rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 42:1087-1095.

Madan A, Penn JS (2003) Animal models of oxygen-induced retinopathy. Front Biosci 8:d1030-1043.

Malik S, Cohen D, Meyer E, Perlman I (1986) Light damage in the developing retina of the albino rat: an electroretinographic study. Invest Ophthalmol Vis Sci 27:164-167.

Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ (1994) Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. Proc Natl Acad Sci U S A 91:1632-1636.

Marc RE, Jones BW, Watt CB, Strettoi E (2003) Neural remodeling in retinal degeneration. Prog Retin Eye Res 22:607-655.

Marcheselli VL, Hong S, Lukiw WJ, Tian XH, Gronert K, Musto A, Hardy M, Gimenez JM, Chiang N, Serhan CN, Bazan NG (2003) Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. J Biol Chem 278:43807-43817.

Marmor MF, Zrenner E (1998) Standard for clinical electroretinography (1999 update). International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. Doc Ophthalmol 97:143-156.

Mashima T, Naito M, Noguchi K, Miller DK, Nicholson DW, Tsuruo T (1997) Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. Oncogene 14:1007-1012.

Maslim J, Valter K, Egensperger R, Hollander H, Stone J (1997) Tissue oxygen during a critical developmental period controls the death and survival of photoreceptors. Invest Ophthalmol Vis Sci 38:1667-1677.

Massey SC, Redburn DA, Crawford ML (1983) The effects of 2-amino-4-phosphonobutyric acid (APB) on the ERG and ganglion cell discharge of rabbit retina. Vision Res 23:1607-1613.

Masuda K, Watanabe I (2000) Short wavelength light-induced retinal damage in rats. Jpn J Ophthalmol 44:615-619.

Masuda K, Watanabe I, Unoki K, Ohba N, Muramatsu T (1995) Functional Rescue of photoreceptors from the damaging effects of constant light by survival-promoting factors in the rat. Invest Ophthalmol Vis Sci 36:2142-2146.

McGee Sanftner LH, Abel H, Hauswirth WW, Flannery JG (2001) Glial cell line derived neurotrophic factor delays photoreceptor degeneration in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa. Mol Ther 4:622-629.

McGinness J, Proctor P (1973) The importance of the fact that melanin is black. J Theor Biol 39:677-678.

McLeod DS, Brownstein R, Lutty GA (1996a) Vaso-obliteration in the canine model of oxygen-induced retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 37:300-311.

McLeod DS, Crone SN, Lutty GA (1996b) Vasoproliferation in the neonatal dog model of oxygen-induced retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 37:1322-1333.

Mervin K, Stone J (2002a) Regulation by oxygen of photoreceptor death in the developing and adult C57BL/6J mouse. Exp Eye Res 75:715-722.

Mervin K, Stone J (2002b) Developmental death of photoreceptors in the C57BL/6J mouse: association with retinal function and self-protection. Exp Eye Res 75:703-713.

Mey J, Thanos S (1993) Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo. Brain Res 602:304-317.

Milam AH, Li ZY, Fariss RN (1998) Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. Prog Retin Eye Res 17:175-205.

Miller RF (1973) Role of K^+ in generation of b-wave of electroretinogram. J Neurophysiol 36:28-38.

Miller RF, Dowling JE (1970) Intracellular responses of the Muller (glial) cells of mudpuppy retina: their relation to b-wave of the electroretinogram. J Neurophysiol 33:323-341.

Mohand-Said S, Hicks D, Dreyfus H, Sahel JA (2000) Selective transplantation of rods delays cone loss in a retinitis pigmentosa model. Arch Ophthalmol 118:807-811.

Mohand-Said S, Deudon-Combe A, Hicks D, Simonutti M, Forster V, Fintz AC, Leveillard T, Dreyfus H, Sahel JA (1998) Normal retina releases a diffusible factor stimulating cone survival in the retinal degeneration mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 95:8357-8362.

Molday RS (1998) Photoreceptor membrane proteins, phototransduction, and retinal degenerative diseases. The Friedenwald Lecture. Invest Ophthalmol Vis Sci 39:2491-2513.

Moshiri A, Close J, Reh TA (2004) Retinal stem cells and regeneration. Int J Dev Biol 48:1003-1014.

Mukherjee PK, Marcheselli VL, Serhan CN, Bazan NG (2004) Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. Proc Natl Acad Sci U S A 101:8491-8496.

Nakazawa T, Shimura M, Tomita H, Akiyama H, Yoshioka Y, Kudou H, Tamai M (2003) Intrinsic activation of PI3K/Akt signaling pathway and its neuroprotective effect against retinal injury. Curr Eye Res 26:55-63.

Narfstrom K, Bragadottir R, Redmond TM, Rakoczy PE, van Veen T, Bruun A (2003) Functional and structural evaluation after AAV.RPE65 gene transfer in the canine model of Leber's congenital amaurosis. Adv Exp Med Biol 533:423-430.

Nelson R, Famiglietti EV, Jr., Kolb H (1978) Intracellular staining reveals different levels of stratification for on- and off-center ganglion cells in cat retina. J Neurophysiol 41:472-483.

Neophytou C, Vernallis AB, Smith A, Raff MC (1997) Muller-cell-derived leukaemia inhibitory factor arrests rod photoreceptor differentiation at a postmitotic pre-rod stage of development. Development 124:2345-2354.

Newman E, Reichenbach A (1996) The Muller cell: a functional element of the retina. Trends Neurosci 19:307-312.

Newman EA (1979) B-wave currents in the frog retina. Vision Res 19:227-234.

Newman EA (1980) Current source-density analysis of the b-wave of frog retina. J Neurophysiol 43:1355-1366.

Noell WK (1980a) Possible mechanisms of photoreceptor damage by light in mammalian eyes. Vision Res 20:1163-1171.

Noell WK (1980b) There are different kinds of retinal light damage in the rat. In: The effects of constant light on visual processes (Williams TP, Baker BN, eds), pp 3-28. New York: Plenum Press.

Noell WK, Walker VS, Kang BS, Berman S (1966) Retinal damage by light in rats. Invest Ophthalmol 5:450-473.

Nykjaer A, Willnow TE, Petersen CM (2005) $p75^{NTR}$--live or let die. Curr Opin Neurobiol 15:49-57.

O'Steen WK, Shear CR, Anderson KV (1972) Retinal damage after prolonged exposure to visible light. A light and electron microscopic study. Am J Anat 134:5-21.

O'Steen WK, Anderson KV, Shear CR (1974) Photoreceptor degeneration in albino rats: dependency on age. Invest Ophthalmol 13:334-339.

Ohira A, Tanito M, Kaidzu S, Kondo T (2003) Glutathione peroxidase induced in rat retinas to counteract photic injury. Invest Ophthalmol Vis Sci 44:1230-1236.

Okoye G, Zimmer J, Sung J, Gehlbach P, Deering T, Nambu H, Hackett S, Melia M, Esumi N, Zack DJ, Campochiaro PA (2003) Increased expression of brain-derived neurotrophic factor preserves retinal function and slows cell death from rhodopsin mutation or oxidative damage. J Neurosci 23:4164-4172.

Oraedu AC, Voaden MJ, Marshall J (1980) Photochemical damage in the albino rat retina: morphological changes and endogenous amino acids. J Neurochem 35:1361-1369.

Organisciak DT, Winkler BS (1994) Retinal light damage: Practical and theoretical considerations. Progress in Retinal and Eye Research 13:1-29.

Organisciak DT, Darrow RM, Barsalou LS (2003) Light-induced retinal degeneration. In: Ocular Neuroprotection (Levin LA, Di Polo A, eds), pp 85-107. New York Basel: Marcel Dekker, Inc.

Organisciak DT, Darrow RM, Noell WK, Blanks JC (1995) Hyperthermia accelerates retinal light damage in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 36:997-1008.

Organisciak DT, Jiang YL, Wang HM, Pickford M, Blanks JC (1989) Retinal light damage in rats exposed to intermittent light. Comparison with continuous light exposure. Invest Ophthalmol Vis Sci 30:795-805.

Organisciak DT, Darrow RM, Barsalou L, Kutty RK, Wiggert B (2000) Circadian-dependent retinal light damage in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 41:3694-3701.

Organisciak DT, Darrow RM, Barsalou L, Darrow RA, Kutty RK, Kutty G, Wiggert B (1998) Light history and age-related changes in retinal light damage. Invest Ophthalmol Vis Sci 39:1107-1116.

Palmer EA, Patz A, Phelps DL, Spencer R (1998) Retinopathy of prematurity. In: Retina (Ryan SJ, ed), pp 1472-1499. St. Louis: Ogden TE, Hinton DR.

Pang JJ, Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Davisson MT, Li J, Noorwez SM, Malhotra R, McDowell JH, Kaushal S, Hauswirth WW, Nusinowitz S, Thompson DA, Heckenlively JR (2005a) Retinal degeneration 12 (rd12): a new, spontaneously arising mouse model for human Leber congenital amaurosis (LCA). Mol Vis 11:152-162.

Pang JJ, Chang B, Kumar A, Nusinowitz S, Noorwez SM, Li J, Rani A, Foster TC, Chiodo VA, Doyle T, Li H, Malhotra R, Tusner J, McDowell JH, Min SH, Li Q, Kaushal S, Hauswirth WW (2005b) Gene Therapy Restores Vision-Dependent Behavior as Well as Retinal Structure and Function in a Mouse Model of RPE65 Leber Congenital Amaurosis. Mol Ther 10:10.

Patz A (1969) Retrolental fibroplasia. Surv Ophthalmol 14:1-29.

Payne BR, Lomber SG (2002) Plasticity of the visual cortex after injury: what's different about the young brain? Neuroscientist 8:174-185.

Penn JS (1998) Early studies of the photostasis phenomenon- Retinal adaptation to the light environment. In: Photostasis and Related Phenomena (Williams TP, Thistle AB, eds), pp 1-. New York London: Plenum Press.

Penn JS, Williams TP (1986) Photostasis: regulation of daily photon-catch by rat retinas in response to various cyclic illuminances. Exp Eye Res 43:915-928.

Penn JS, Anderson RE (1987) Effect of light history on rod outer-segment membrane composition in the rat. Exp Eye Res 44:767-778.

Penn JS, Thum LA (1987) A comparison of the retinal effects of light damage and high illuminance light history. Prog Clin Biol Res 247:425-438.

Penn JS, Naash MI, Anderson RE (1987) Effect of light history on retinal antioxidants and light damage susceptibility in the rat. Exp Eye Res 44:779-788.

Penn JS, Thum LA, Naash MI (1989) Photoreceptor physiology in the rat is governed by the light environment. Exp Eye Res 49:205-215.

Penn JS, Tolman BL, Henry MM (1994) Oxygen-induced retinopathy in the rat: relationship of retinal nonperfusion to subsequent neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci 35:3429-3435.

Penn JS, Tolman BL, Thum LA, Koutz CA (1992) Effect of light history on the rat retina: timecourse of morphological adaptation and readaptation. Neurochem Res 17:91-99.

Phelps DL (1992) Retinopathy of prematurity. N Engl J Med 326:1078-1080.

Pierce EA (2001) Pathways to photoreceptor cell death in inherited retinal degenerations. Bioessays 23:605-618.

Pittler SJ, Baehr W (1991) Identification of a nonsense mutation in the rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene of the rd mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 88:8322-8326.

Pollock GS, Vernon E, Forbes ME, Yan Q, Ma YT, Hsieh T, Robichon R, Frost DO, Johnson JE (2001) Effects of early visual experience and diurnal rhythms on BDNF mRNA and protein levels in the visual system, hippocampus, and cerebellum. J Neurosci 21:3923-3931.

Portera-Cailliau C, Sung CH, Nathans J, Adler R (1994) Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. Proc Natl Acad Sci U S A 91:974-978.

Proctor P, McGinness J, Corry P (1974) A hypothesis on the preferential destruction of melanized tissues. J Theor Biol 48:19-22.

Racine J, Joly S, Rufiange M, Rosolen S, Casanova C, Lachapelle P (2005) The photopic ERG of the albino guinea pig (Cavia porcellus): a model of the human photopic ERG. Doc Ophthalmol 110:67-77.

Raff MC (1992) Social controls on cell survival and cell death. Nature 356:397-400.

Rakoczy PE, Yu MJT, Nusinowitz S, Chang B, Heckenlively JR (2006) Mouse models of age-related macular degeneration. Experimental Eye Research.

Rapaport DH, Wong LL, Wood ED, Yasumura D, LaVail MM (2004) Timing and topography of cell genesis in the rat retina. J Comp Neurol 474:304-324.

Rapp LM (1995) Retinal Phototoxicity. In: Handbook of Neurotoxicology (Chang LW, Dyer RS, eds), pp 963-1003. New York: Marcel Dekker.

Rapp LM, Williams TP (1980) A parametric study of retinal light damage in albino and pigmented rats. In: The effects of constant light on visual processes (Williams TP, Baker BN, eds), pp 135-159. New York: Plenum Press.

Rapp LM, Smith SC (1992) Morphologic comparisons between rhodopsin-mediated and short-wavelength classes of retinal light damage. Invest Ophthalmol Vis Sci 33:3367-3377.

Rapp LM, Naash MI, Wiegand RD, Joel CD, Nielson JC, Anderson RE (1985) Morphological and biochemical comparisons between retinal regions having differing susceptibility to photoreceptor degeneration. In: Retinal degeneration: Experimental and clinical studies (Liss AR, ed), pp 421-437.

Reichenbach A, Eberhardt W (1988) Cytotopographical specialization of enzymatically isolated rabbit retinal Muller (glial) cells: K+ conductivity of the cell membrane. Glia 1:191-197.

Remé CE (2005) The dark side of light: rhodopsin and the silent death of vision the proctor lecture. Invest Ophthalmol Vis Sci 46:2671-2682.

Remé CE, Grimm C, Hafezi F, Marti A, Wenzel A (1998a) Apoptotic cell death in retinal degenerations. Prog Retin Eye Res 17:443-464.

Remé CE, Bush R, Hafezi F, Wenzel A, Grimm C (1998b) Photostasis and beyond-Where adaptation ends. In: Photostasis and Related Phenomena (Williams, Thistle, eds), pp 199-206. New York: Plenum Press.

Remé CE, Wolfrum U, Imsand C, Hafezi F, Williams TP (1999) Photoreceptor autophagy: effects of light history on number and opsin content of degradative vacuoles. Invest Ophthalmol Vis Sci 40:2398-2404.

Remé CE, Grimm C, Hafezi F, Wenzel A, Williams TP (2000) Apoptosis in the Retina: The Silent Death of Vision. News Physiol Sci 15:120-124.

Reuter JH, Hobbelen JF (1977) The effect of continuous light exposure on the retina in albino and pigmented rats. Physiol Behav 18:939-944.

Ricci B, Lepore D, Iossa M, Santo A, D'Urso M, Maggiano N (1990) Effect of light on oxygen-induced retinopathy in the rat model. Light and OIR in the rat. Doc Ophthalmol 74:287-301.

Robinson J, Bayliss SC, Fielder AR (1991) Transmission of light across the adult and neonatal eyelid in vivo. Vision Res 31:1837-1840.

Roca A, Shin KJ, Liu X, Simon MI, Chen J (2004) Comparative analysis of transcriptional profiles between two apoptotic pathways of light-induced retinal degeneration. Neuroscience 129:779-790.

Rodieck RW (1972) Components of the electroretinogram--a reappraisal. Vision Res 12:773-780.

Rodieck RW (1998) Retinas. In: The First Steps in Seeing (Rodieck RW, ed), pp 37-55. USA: Sinauer Associates Inc.

Rodriguez de Turco EB, Parkins N, Ershov AV, Bazan NG (1999) Selective retinal pigment epithelial cell lipid metabolism and remodeling conserves photoreceptor docosahexaenoic acid following phagocytosis. J Neurosci Res 57:479-486.

Rolling F (2004) Recombinant AAV-mediated gene transfer to the retina: gene therapy perspectives. Gene Ther 11:S26-32.

Rosolen SG, Rigaudiere F, LeGargasson JF, Chalier C, Rufiange M, Racine J, Joly S, Lachapelle P (2004) Comparing the photopic ERG i-wave in different species. Vet Ophthalmol 7:189-192.

Rothermel A, Layer PG (2003) GDNF regulates chicken rod photoreceptor development and survival in reaggregated histotypic retinal spheres. Invest Ophthalmol Vis Sci 44:2221-2228.

Rotstein NP, Aveldano MI, Barrantes FJ, Politi LE (1996) Docosahexaenoic acid is required for the survival of rat retinal photoreceptors in vitro. J Neurochem 66:1851-1859.

Rotstein NP, Politi LE, German OL, Girotti R (2003) Protective effect of docosahexaenoic acid on oxidative stress-induced apoptosis of retina photoreceptors. Invest Ophthalmol Vis Sci 44:2252-2259.

Rotstein NP, Aveldano MI, Barrantes FJ, Roccamo AM, Politi LE (1997) Apoptosis of retinal photoreceptors during development in vitro: protective effect of docosahexaenoic acid. J Neurochem 69:504-513.

Rousseau S, Lachapelle P (1999) The electroretinogram recorded at the onset of dark-adaptation: understanding the origin of the scotopic oscillatory potentials. Doc Ophthalmol 99:135-150.

Roux PP, Barker PA (2002) Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. Prog Neurobiol 67:203-233.

Sapieha PS, Peltier M, Rendahl KG, Manning WC, Di Polo A (2003) Fibroblast growth factor-2 gene delivery stimulates axon growth by adult retinal ganglion cells after acute optic nerve injury. Mol Cell Neurosci 24:656-672.

Sarna T (1992) Properties and function of the ocular melanin--a photobiophysical view. J Photochem Photobiol B 12:215-258.

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

Segal RA, Greenberg ME (1996) Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. Annu Rev Neurosci 19:463-489.

Seki M, Nawa H, Fukuchi T, Abe H, Takei N (2003) BDNF is upregulated by postnatal development and visual experience: quantitative and immunohistochemical analyses of BDNF in the rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 44:3211-3218.

Semple-Rowland SL, Dawson WW (1987) Retinal cyclic light damage threshold for albino rats. Lab Anim Sci 37:289-298.

Shen J, Yang X, Dong A, Petters RM, Peng YW, Wong F, Campochiaro PA (2005) Oxidative damage is a potential cause of cone cell death in retinitis pigmentosa. J Cell Physiol 203:457-464.

Shimazaki H, Karwoski CJ, Proenza LM (1984) Aspartate-induced dissociation of proximal from distal retinal activity in the mudpuppy. Vision Res 24:587-595.

Siliprandi R, Canella R, Carmignoto G, Schiavo N, Zanellato A, Zanoni R, Vantini G (1992) N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the adult rat retina. Vis Neurosci 8:567-573.

Sisson TRC, Glauser EM, Chan G, Romayahanda N (1984) Effects of light and various concentrations of oxygen on the retina of the newborn pig. In: Oxygen Neonatal Jaundice: New Trends in Phototherapy (Rubaltelli FF, Jori G, eds), pp 277-290. New York: Plenum Press.

Slaughter MM, Miller RF (1981) 2-amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retina research. Science 211:182-185.

Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R, D'Amore PA (1994) Oxygen-induced retinopathy in the mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci 35:101-111.

Stockton RA, Slaughter MM (1989) B-wave of the electroretinogram. A reflection of ON bipolar cell activity. J Gen Physiol 93:101-122.

Stone J, Maslim J, Valter-Kocsi K, Mervin K, Bowers F, Chu Y, Barnett N, Provis J, Lewis G, Fisher SK, Bisti S, Gargini C, Cervetto L, Merin S, Peer J (1999) Mechanisms of photoreceptor death and survival in mammalian retina. Prog Retin Eye Res 18:689-735.

Stone WL, Farnsworth CC, Dratz EA (1979) A reinvestigation of the fatty acid content of bovine, rat and frog retinal rod outer segments. Exp Eye Res 28:387-397.

Strettoi E, Porciatti V, Falsini B, Pignatelli V, Rossi C (2002) Morphological and functional abnormalities in the inner retina of the rd/rd mouse. J Neurosci 22:5492-5504.

Strettoi E, Pignatelli V, Rossi C, Porciatti V, Falsini B (2003) Remodeling of second-order neurons in the retina of rd/rd mutant mice. Vision Res 43:867-877.

Suber ML, Pittler SJ, Qin N, Wright GC, Holcombe V, Lee RH, Craft CM, Lolley RN, Baehr W, Hurwitz RL (1993) Irish setter dogs affected with rod/cone dysplasia contain a nonsense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene. Proc Natl Acad Sci U S A 90:3968-3972.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature 397:441-446.

Szél A, Rohlich P, Caffe AR, Juliusson B, Aguirre G, Van Veen T (1992) Unique topographic separation of two spectral classes of cones in the mouse retina. J Comp Neurol 325:327-342.

Tanito M, Masutani H, Nakamura H, Ohira A, Yodoi J (2002) Cytoprotective effect of thioredoxin against retinal photic injury in mice. Invest Ophthalmol Vis Sci 43:1162-1167.

Terry T (1942) Extreme prematurity and fibroblastic overgrowth of persistent vascular sheath behind each crystalline lens. I. Preliminary report. Am J Ophthalmol 25:203-204.

Tessier-Lavigne M (2000) Visual Processing by The Retina. In: Principles of Neural Science (Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, eds), pp 507-522: McGraw-Hill Companies.

Tomita T (1950) Studies on the intraretinal action potential. Part I. Relation between the localization of micropipette in the retina and the shape of the intraretinal action potential. Jpn J Physiol 1:110-117.

Tomita T, Funaishi A (1952) Studies on intraretinal action potential with low-resistance microelectrode. J Neurophysiol 15:75-84.

Treisman JE, Morabito MA, Barnstable CJ (1988) Opsin expression in the rat retina is developmentally regulated by transcriptional activation. Mol Cell Biol 8:1570-1579.

Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, van der Kooy D (2000) Retinal stem cells in the adult mammalian eye. Science 287:2032-2036.

Tso MO, Zhang C, Abler AS, Chang CJ, Wong F, Chang GQ, Lam TT (1994) Apoptosis leads to photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy of RCS rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2693-2699.

Turner DL, Cepko CL (1987) A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. Nature 328:131-136.

Valter K, Bisti S, Stone J (2003) Location of CNTFRalpha on outer segments: evidence of the site of action of CNTF in rat retina. Brain Res 985:169-175.

Valter K, Bisti S, Gargini C, Di Loreto S, Maccarone R, Cervetto L, Stone J (2005) Time course of neurotrophic factor upregulation and retinal protection against light-induced damage after optic nerve section. Invest Ophthalmol Vis Sci 46:1748-1754.

van Loo G, Schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R, Vandenabeele P (2001) Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. Cell Death Differ 8:1136-1142.

Vaughan DK, Coulibaly SF, Darrow RM, Organisciak DT (2003) A morphometric study of light-induced damage in transgenic rat models of retinitis pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci 44:848-855.

Vaughan DK, Nemke JL, Fliesler SJ, Darrow RM, Organisciak DT (2002) Evidence for a circadian rhythm of susceptibility to retinal light damage. Photochem Photobiol 75:547-553.

Vecino E, Hernandez M, Garcia M (2004) Cell death in the developing vertebrate retina. Int J Dev Biol 48:965-974.

Vihtelic TS, Hyde DR (2000) Light-induced rod and cone cell death and regeneration in the adult albino zebrafish (Danio rerio) retina. J Neurobiol 44:289-307.

Vihtelic TS, Soverly JE, Kassen SC, Hyde DR (2006) Retinal regional differences in photoreceptor cell death and regeneration in light-lesioned albino zebrafish. Exp Eye Res 82:558-575.

Wachtmeister L (1998) Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. Prog Retin Eye Res 17:485-521.

Wachtmeister L, Dowling JE (1978) The oscillatory potentials of the mudpuppy retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 17:1176-1188.

Wahlin KJ, Campochiaro PA, Zack DJ, Adler R (2000) Neurotrophic factors cause activation of intracellular signaling pathways in Muller cells and other cells of the inner retina, but not photoreceptors. Invest Ophthalmol Vis Sci 41:927-936.

Walsh N, Valter K, Stone J (2001) Cellular and subcellular patterns of expression of bFGF and CNTF in the normal and light stressed adult rat retina. Exp Eye Res 72:495-501.

Wang S, Lu B, Lund RD (2005) Morphological changes in the Royal College of Surgeons rat retina during photoreceptor degeneration and after cell-based therapy. J Comp Neurol 491:400-417.

Wang Y, Smith SB, Ogilvie JM, McCool DJ, Sarthy V (2002) Ciliary neurotrophic factor induces glial fibrillary acidic protein in retinal Muller cells through the JAK/STAT signal transduction pathway. Curr Eye Res 24:305-312.

Wasowicz M, Morice C, Ferrari P, Callebert J, Versaux-Botteri C (2002) Long-term effects of light damage on the retina of albino and pigmented rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 43:813-820.

Webster MJ, Rowe MH (1991) Disruption of developmental timing in the albino rat retina. J Comp Neurol 307:460-474.

Weidman TA, Kuwabara T (1968) Postnatal development of the rat retina. An electron microscopic study. Arch Ophthalmol 79:470-484.

Wellard J, Lee D, Valter K, Stone J (2005) Photoreceptors in the rat retina are specifically vulnerable to both hypoxia and hyperoxia. Vis Neurosci 22:501-507.

Wen R, Song Y, Cheng T, Matthes MT, Yasumura D, LaVail MM, Steinberg RH (1995) Injury-induced upregulation of bFGF and CNTF mRNAS in the rat retina. J Neurosci 15:7377-7385.

Wen R, Cheng T, Song Y, Matthes MT, Yasumura D, LaVail MM, Steinberg RH (1998) Continuous exposure to bright light upregulates bFGF and CNTF expression in the rat retina. Curr Eye Res 17:494-500.

Wenzel A, Grimm C, Samardzija M, Remé CE (2005) Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. Prog Retin Eye Res 24:275-306.

Wheatley CM, Dickinson JL, Mackey DA, Craig JE, Sale MM (2002) Retinopathy of prematurity: recent advances in our understanding. Br J Ophthalmol 86:696-700.

Wiechmann AF, O'Steen WK (1992) Melatonin increases photoreceptor susceptibility to light-induced damage. Invest Ophthalmol Vis Sci 33:1894-1902.

Wiegand RD, Giusto NM, Rapp LM, Anderson RE (1983) Evidence for rod outer segment lipid peroxidation following constant illumination of the rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 24:1433-1435.

Williams TP (1998) Light history and photostasis- What is a "normal"rat retina? In: Photostasis and Related Phenomena (Williams TP, Thistle AB, eds), pp 17-32. New York: Plenum Press.

Williams TP, Henrich S, Reiser M (1998) Effect of eye closures and openings on photostasis in albino rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 39:603-609.

Williams TP, Howell WL (1983) Action spectrum of retinal light-damage in albino rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 24:285-287.

Xu J, Dodd RL, Makino CL, Simon MI, Baylor DA, Chen J (1997) Prolonged photoresponses in transgenic mouse rods lacking arrestin. Nature 389:505-509.

Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, Daugas E, Garrido C, Kroemer G, Wu H (2002) DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. Nat Struct Biol 9:680-684.

Young RW (1967) The renewal of photoreceptor cell outer segments. J Cell Biol 33:61-72.

Young RW (1976) Visual cells and the concept of renewal. Invest Ophthalmol Vis Sci 15:700-725.

Yu X, Rajala RV, McGinnis JF, Li F, Anderson RE, Yan X, Li S, Elias RV, Knapp RR, Zhou X, Cao W (2004) Involvement of insulin/phosphoinositide 3-kinase/Akt signal pathway in 17 beta-estradiol-mediated neuroprotection. J Biol Chem 279:13086-13094.

Yusifov EY, Kerimova AA, Atalay M, Kerimov TM (2000) Light exposure induces antioxidant enzyme activities in eye tissues of frogs. Pathophysiology 7:203-207.

Zahir T, Klassen H, Young MJ (2005) Effects of ciliary neurotrophic factor on differentiation of late retinal progenitor cells. Stem Cells 23:424-432.

Zhang C, Lei B, Lam TT, Yang F, Sinha D, Tso MO (2004a) Neuroprotection of photoreceptors by minocycline in light-induced retinal degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 45:2753-2759.

Zhang C, Shen JK, Lam TT, Zeng HY, Chiang SK, Yang F, Tso MO (2005a) Activation of microglia and chemokines in light-induced retinal degeneration. Mol Vis 11:887-895.

Zhang SS, Liu MG, Kano A, Zhang C, Fu XY, Barnstable CJ (2005b) STAT3 activation in response to growth factors or cytokines participates in retina precursor proliferation. Exp Eye Res 81:103-115.

Zhang SS, Wei J, Qin H, Zhang L, Xie B, Hui P, Deisseroth A, Barnstable CJ, Fu XY (2004b) STAT3-mediated signaling in the determination of rod photoreceptor cell fate in mouse retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 45:2407-2412.

Zhuang S, Demirs JT, Kochevar IE (2000) p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. J Biol Chem 275:25939-25948.

ANNEXE 1

BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR GENE DELIVERY TO MÜLLER GLIA PRESERVES STRUCTURE AND FUNCTION OF LIGHT-DAMAGED PHOTORECEPTORS

Investigative Ophthalmology and Visual Science, 2005 46: 3383-3392

BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR GENE DELIVERY TO MÜLLER GLIA PRESERVES STRUCTURE AND FUNCTION OF LIGHT-DAMAGED PHOTORECEPTORS

Rosemarie Gauthier[1,†], Sandrine Joly[2,†], Vincent Pernet[1], Pierre Lachapelle[2] and Adriana Di Polo[1,*].

Department of Pathology and Cell Biology[1], University of Montreal, Montreal H3T 1J4; Department of Ophthalmology[2], McGill University, Montreal Children's Hospital Research Institute, Montreal H3H 1P3, Quebec, Canada.

Running Title: BDNF gene transfer protects light-damaged photoreceptors
Word count:

† These authors contributed equally to this work

*** Corresponding Author:** **Adriana Di Polo, Ph.D.**
Department of Pathology and Cell Biology
University of Montreal
2900, Boul. Edouard-Montpetit
Pavillon Principal, Room N-535
Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada
Phone: (514) 343-6109
Fax: (514) 343-5755
[redacted]

Supported by a Young Investigator Award from the Foundation Fighting Blindness (A.D.P.), Canadian Institutes of Health Research (A.D.P. and P.L.) and Réseau Vision Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). A.D.P. is a scholar of FRSQ.

ABSTRACT

Purpose: To test the hypothesis that Adenovirus (Ad)-mediated gene delivery of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) to Müller cells can protect photoreceptors from light-induced retinal degeneration.

Methods: Adult Sprague-Dawley rats received an intraocular injection of Ad.BDNF, control Ad containing the green fluorescent protein (GFP) gene, or BDNF recombinant protein. Animals were then exposed to 5, 10 or 16 days of constant light. The effect of Ad.BDNF on photoreceptor survival was examined histologically, by measuring the outer nuclear layer (ONL) thickness, and functionally, by measuring the electroretinographic (ERG) response.

Results: Ad.BDNF mediated sustained expression of bioactive neurotrophin by Müller cells that lasted for at least 30 days after viral vector administration. BDNF gene delivery to Müller glia markedly increased the survival and structural integrity of light-damaged photoreceptors. For example, after 10 days of light exposure, the average percentage of ONL preservation in the superior central retina of eyes that received Ad.BDNF was 71% compared to 46% in eyes that received a control Ad.GFP or 15% in contralateral eyes. Importantly, retinas exposed to Ad.BDNF had more photoreceptor nuclei than retinas that received a single intraocular injection of BDNF recombinant protein. The neuroprotective effect of Ad.BDNF was accompanied by preservation of the ERG response of the treated eyes.

Conclusions: These data provide proof of concept that BDNF gene transfer into Müller cells is an effective strategy to preserve structure and function of photoreceptors in retinal degeneration.

INTRODUCTION

The death of photoreceptors is the final event that leads to blindness in diseases such as macular degeneration and retinitis pigmentosa (RP). In recent years, considerable progress has been made to determine the genetic basis of inherited retinal disorders [1-4]. As of March 2005, 110 retinal disease genes had been cloned and 48 additional genes had been assigned to chromosomal regions (Retinal Information Network, www.sph.uth.tmc.edu/RetNet). This information has led to great interest in the use of gene therapy to correct mutant photoreceptor phenotypes by direct supplementation of a functional gene or destruction of defective mRNA species. Recent studies in several animal models of retinal degeneration provide evidence in support of these strategies [5-8], but nonetheless there are important limitations to this approach. For example, the vast majority of the genetic defects underlying prevalent forms of retinal disorders remain unknown. Furthermore, retinal diseases that arise from mutations in many genes, several mutations in a single gene or a combination of genetic and environmental factors, are a challenge for gene therapy approaches. Thus, strategies that do not rely on knowledge of specific gene defects but that target a common cell death pathway may provide a means of delaying photoreceptor degeneration.

Apoptosis is a conserved mechanism of photoreceptor death in inherited or injury-induced retinal degeneration [9-12]. The use of neurotrophic factors to block apoptosis and promote photoreceptor cell survival is an alternative form of therapy with potential applicability to human retinal diseases. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a member of the neurotrophin family, has been identified as a potent survival factor for retinal neurons. For example, intraocular administration of BDNF protein has been shown to protect photoreceptors from inherited and light-induced retinal degeneration [13, 14], and promotes photoreceptor survival after retinal detachment [15]. In addition, photoreceptor loss caused by a rhodopsin mutation or oxidative damage was delayed in transgenic mice engineered to overexpress BDNF [16]. Of interest, the BDNF receptor, TrkB, is expressed by several cell types, including a subset of cone photoreceptors [17], amacrine cells [18], Müller glia [19] and retinal ganglion cells [20-22].

An important disadvantage of using a bolus intravitreal injection of BDNF protein is that the short *in vivo* half-life of this neurotrophin [23] and rapid extrusion from the eye

lessen its neuroprotective effect. To overcome these limitations, we used recombinant adenovirus (Ad) to deliver the BDNF coding sequence to the adult retina. We previously demonstrated that intravitreal injection of Ad vectors results in successful transgene expression by Müller cells [24], the main glial cell type in the mammalian retina. Müller cells play critical roles in the maintenance and function of retinal neurons. They provide direct metabolic support, regulate the neuronal microenvironment, and participate in retinal information processing [25]. Müller cells span the entire thickness of the retina and have specialized processes in close contact with photoreceptor cell bodies.

The hypothesis tested in this study was whether BDNF gene transfer to Müller cells served as a strategy to protect photoreceptors from light-induced retinal degeneration. The light-damage rat model was chosen because it allows control over the onset as well as rate of degeneration and, unlike inherited disorders, photoreceptor cell death is independent of the age of the experimental animals. Our data demonstrate that BDNF gene transfer to Müller glia is an efficient strategy to promote both structural and functional protection of injured photoreceptor cells.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Recombinant Ad Vectors

A mouse BDNF cDNA containing a human c-myc 9E10 epitope tag was inserted into an Ad5 shuttle vector [26] under control of the cytomegalovirus (CMV) promoter. The resulting plasmid, Ad5-BDNF, was used to generate recombinant Ad vectors as previously described [24]. Briefly, Ad5-BDNF was cotransfected into low-passage human 293 cells with E1-deleted Ad5 DNA. The resulting replication-deficient virus, Ad.BDNF, was plaque purified, propagated in 293 cells and concentrated on cesium chloride gradients following standard procedures [27]. The titer of the concentrated Ad.BDNF stock, determined by direct plaque assay, was 5×10^{11} plaque forming units (pfu)/ml. An Ad control vector carrying the green fluorescent protein (GFP) gene, but lacking the BDNF gene, was generated in identical fashion and its titer was 6×10^{11} pfu/ml. Absence of wild-type Ad was verified by titration using HeLa cells and by PCR as described [28].

In Vivo Gene Delivery, Immunosuppression and Light-Induced Retinal Degeneration

Animal procedures were performed in accordance with the ARVO statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and the Canadian Council on Animal Care [29]. Surgical procedures were performed in female Sprague-Dawley rats (180-200 g) under general anesthesia (2% Isoflurane/oxygen mixture, 0.8 liters/min). Ad.BDNF (5 µl total volume: ~10^9 pfu) or recombinant human BDNF protein (5 µg, Regeneron Pharmaceuticals, Tarrytown, NY) were injected into the vitreous chamber in the dorsal hemisphere of the left eye using a 10-µl Hamilton syringe fitted with a 32-gauge needle. The tip of the needle was inserted through the sclera and retina into the vitreous chamber using a posterior approach. This route of administration avoided injury to structures of the eye, such as the iris or lens, which have been shown to promote survival of retinal neurons [30, 31]. A group of animals injected with Ad.GFP served as control for the injury effect caused by intraocular injection [32-34] as well as for any effect due to viral infection. The right, contralateral eye was never operated and served as internal control for light-induced photoreceptor degeneration in each animal. Animals received a daily dose of the immunosuppressant FK-506 (0.8 mg/kg body weight; Fujisawa Pharmaceuticals, Osaka) that started two days prior to Ad injection and lasted throughout the duration of the study. FK-506 was dispensed using an osmotic minipump (Alzet, Cupertino, CA) implanted subcutaneously. Rats were maintained in a cyclic light environment (12 hr on, 12 hr off) at an in-cage illuminance of less than 25 footcandles (ft-c). Two days after intravitreal injection of the viral vectors, rats were exposed to 5, 10 or 16 days of constant light at an illuminance level of ~175-200 ft-c (1 ft-c=10.76 lux) provided by two 25W fluorescent lamps (General Electric, BIAX Electronics, Burnsville, MN) placed at ~40 cm above each cage. During light exposure, animals were maintained in transparent wire top cages and the food was placed on the bedding in the cage.

Structural Analysis of Photoreceptor Neuroprotection

For analysis of retinal histology, rats were sacrificed by intracardial perfusion with a mixture of 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer and the eyes were immediately enucleated. The anterior part of the eye and the lens were removed, and the remaining eye cup was embedded in Epon/Araldite resin. Histological 1-µm-thick sections of the retina were prepared along the dorsal-ventral plane of the eye, and serial

sections that passed through the optic nerve head, used as reference, were analyzed. Photoreceptor protection was assessed by measuring the thickness of the outer nuclear layer (ONL) in the superior and inferior hemispheres of the eye as previously described [35]. Six to eight serial sections per eye were quantified for each experimental animal. Data analysis and statistics were performed using the GraphPad Instat software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) by a one-way analysis of variance (ANOVA) test or Student's t-test.

Electroretinographic recordings

All electroretinogram (ERG) recordings were performed by the same experimenter (S.J.), who was blind to the treatment applied to each eye. Immediately after constant light exposure and prior to ERG recordings, female adult rats were dark-adapted for a 12-hour period. Under dim red light illumination, the animals were anesthetized with a mixture of ketamine hydrochloride (80 mg/kg) and xylazine (6 mg/kg) and the pupils were dilated with cyclopentolate hydrochloride 1%. Rats were placed in a light tight recording chamber, which housed the rod desensitising background light source as well as the photostimulator (Grass photostimulator, model PS22; Grass Instruments, Quincy, MA, USA). ERGs were recorded with a DTL fiber electrode (27/7X-Static, silver coated conductive nylon yarn, Sauquoit Industries, Scranton, PA, USA) that was positioned and maintained on the cornea using a drop of 1% methylcellulose. A 6-mm silver disc electrode (Grass E5 disc electrode, Grass Instruments, Quincy, MA, USA) inserted in the mouth of the rat served as reference, and a platinum subdermal needle electrode (Grass E2 subdermal electrode, Grass Instruments, Quincy, MA, USA) inserted into the tail served as ground. The ERG (bandwidth: 1-1,000 Hz; × 10,000; Grass, P511 amplifier) and oscillatory potentials (bandwidth: 100-1000 Hz; × 50,000) were recorded simultaneously with the Acknowledge data acquisition system (Biopac MP 100 WS, BIOPAC System Inc., Goleta, CA, USA).

Scotopic (rod) ERGs were generated with flashes of white light at intensities ranging from -6.3 log cd.s.m^{-2} to 0.6 log cd.s.m^{-2} in steps of 0.3 log unit. Each ERG response represents the average of 5 flashes delivered at an inter-stimulus interval of 10 sec. Photopic (cone) ERGs were evoked to flashes of white light of 0.9 log cd.sec.m^{-2} in intensity delivered against a rod desensitizing background light of 30 cd.m^{-2}. To avoid the light adaptation effect previously reported [36], the photopic ERGs were obtained following a

light adaptation period of 20 min. Each cone ERG response represents an average of 20 flashes delivered at a rate of 1 flash/sec. For ERG waveform analysis, the amplitude of the a-wave was measured from the pre-stimulus baseline to the trough, whereas the amplitude of the b-wave was measured from the a-wave trough to the most positive peak of the evoked response. Peak times were measured from the flash onset to the peak of the corresponding wave. Results are expressed as the mean ± S.E.M. and statistical analysis was performed using a One Way Analysis of Variance (ANOVA). At the end of the ERG recording session, animals were euthanatized and the eyes were collected and processed for histological analysis.

Immunohistochemistry and Quantification of Müller Cells Transduced by Ad.BDNF

Rats were perfused intracardially with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) and the eyes were immediately enucleated. Following removal of the anterior structures of the eye and the lens, the remaining eye cup was immersed in the same fixative for 2 hr at 4°C. Eye cups were equilibrated in graded sucrose solutions (10-30%) for several hours at 4°C, embedded in O.C.T. compound (Tissue-Tek, Miles Laboratories, Elkhart, IN) and frozen in a 2-methylbutane/liquid nitrogen bath. Radial cryosections (6-12 μm) were collected onto gelatin-coated slides and processed. Sections were incubated in 10% normal goat serum (NGS), 0.2% Triton X-100 (Sigma) in PBS for 30 min at room temperature to block non-specific binding, followed by addition of anti-c-myc antibody (2 μg/ml, Oncogene Research Products, Cambridge, MA) in 2% NGS in PBS for 14-18 hr at 4°C. Sections were further processed with biotinylated anti-mouse Fab fragment (2 μg/ml, Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA), avidin-biotin-peroxidase reagent (ABC Elite Vector Labs, Burlingame, CA), followed by reaction in a solution containing 0.05% diaminobenzidine tetrahydrochloride and 0.06% hydrogen peroxide (pH 7.4) for 5-10 min. To estimate the number of cells expressing the BDNF transgene, radial sections were generated from the entire retina (n=4), processed for anti-c-myc immunocytochemistry as described above, and c-myc-positive Müller cell processes were counted. Every other retinal section was counted to avoid duplicate quantification of the same cell.

Western Blot Analysis

Fresh retinas were rapidly dissected and homogenized with an electric pestle (Kontes, Vineland, NJ) in ice-cold lysis buffer: 20 mM Tris (pH 8.0), 135 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS and 10% glycerol supplemented with protease inhibitors (1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride, 10 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml leupeptin, and 0.5 mM sodium orthovanadate). After incubation for 30 min on ice, homogenates were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min, the supernatants were removed and resedimented for an additional 10 min to yield solubilized extracts. Alternatively, 200-300 μg of protein was immunoprecipitated with anti-pan Trk 203 as described [37]. Retinal extracts (75-100 μg) or immunoprecipitated samples were resolved on 15% or 8% SDS polyacrylamide gels, respectively, and transferred to nitrocellulose filters (Bio-Rad Life Science, Mississauga, ON). To block non-specific binding, filters were placed in 10 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.2% Tween-20 (TBST) and 5% dry skim milk for 1 hr at room temperature. Blots were then incubated for 16-18 hrs at 4°C with each of the following primary antibodies: anti-human c-myc (2 μg/ml, Oncogene Research), anti-phosphotyrosine (4G10, 1 μg/ml, Upstate Biotechnology, Waltham, MA), anti-rat $TrkB_{in}$ (3 μg/ml) or anti-actin (10 μg/ml, Chemicon, Temecula, CA). Membranes were washed in TBST and incubated in peroxidase-linked secondary antibodies (0.5 μg/ml, Amersham Pharmacia, Baie d'Urfé, Quebec, Canada) for 1 hr at room temperature. Blots were developed with a chemiluminescence reagent (ECL; GE Healthcare) and exposed to autoradiograph film (X-OMAT; Eastman Kodak, Rochester, NY).

RESULTS

Sustained Delivery of Bioactive BDNF to the Adult Retina by Ad-Infected Müller Glia

We previously demonstrated that Ad.BDNF gene expression in the retina reached a peak at 5-7 days after administration of the vector and rapidly declined thereafter to become undetectable at 14 days after virus inoculation [24]. The transient transgene expression mediated by Ad has been attributed to an early immune response that may lead to T-cell mediated destruction of tranduced cells [38, 39]. To prevent the immune response triggered by Ad vectors, animals received the immunosuppressant FK-506 throughout the duration of the study as described previously [24]. FK-506 was delivered using a small osmotic

minipump implanted subcutaneously. All animals used in this study, both experimental and control groups, were treated with FK-506. We did not observe any adverse effects or behavioural changes induced by FK-506 at the concentration used in this study (0.8 mg/kg body weight).

Intravitreal injection of Ad.BDNF in immunosuppressed animals resulted in strong transgene expression in the adult rat retina that lasted for at least 30 days after vector administration (Fig. 1). Staining of retinal sections using an anti-c-myc antibody demonstrated that Ad-mediated BDNF was localized preferentially in Müller cells (Fig. 1A). Positive immunoreactivity in infected Müller cells was clearly observed along the radial processes from the basal end-feet to the apical region in the outer nuclear layer (ONL), where photoreceptor nuclei are located. Robust, but diffuse, c-myc immunostaining at the level of the ONL was always found in association with infected Müller cells (Fig. 1A and 1B). An average of ~3,000 Müller cells per retina were estimated to express the BDNF transgene at 30 days after Ad vector administration. Labeling of retinal pigment epithelium (RPE) was occasionally observed, but infection of RPE cells was always restricted to the injection site, particularly along the needle track (not shown). We did not detect expression of the BDNF transgene in any other retinal cells. There was no evidence of a cellular immune reaction in immunesuppressed animals following intraocular injection of Ad vectors in any of the retinas analyzed.

The ability of Müller cells to express Ad-mediated BDNF at 30 days after intravitreal injection of the viral vector was investigated by western blots. Analysis of protein homogenates from Ad.BDNF-infected retinas demonstrated the presence of a single 14.2 kDa protein corresponding to the fully processed BDNF/c-myc monomer (Fig. 1C) in agreement with the predicted relative molecular mass of recombinant BDNF. Neurotrophins are synthesized as high molecular weight precursors (proforms) that are then cleaved intracellularly to generate mature, secreted ligands [40]. The absence of detectable amounts of BDNF/c-myc proform suggests that Ad-mediated BDNF is efficiently processed and secreted by infected Müller cells *in vivo*. BDNF/c-myc protein was never detected in protein homogenates from retinas infected with the control virus Ad.GFP (Fig. 1C).

The biological activity of Ad-mediated BDNF *in vivo* was examined by its ability to phosphorylate TrkB, its high affinity receptor. TrkB phosphorylation, which is considered the first step for transduction of survival signals following BDNF binding, is a good indicator of receptor activation. Western blot analysis of immunoprecipitated Trk proteins using an antibody against phosphotyrosine demonstrated robust TrkB tyrosine phosphorylation at 30 days after intravitreal injection of Ad.BDNF (Fig. 1D). Injection of control Ad.GFP did not have any effect on TrkB activation. These data indicate that Ad.BDNF mediates sustained expression of bioactive BDNF protein in the adult rat retina.

Ad.BDNF Promotion of Structural Protection of Light-Damaged Photoreceptors

To test the effect of BDNF gene transfer into Müller glia on the survival of photoreceptors, we performed a single intravitreal injection of Ad.BDNF two days prior to the onset of constant light. Retinal injury during intraocular injection has been shown to increase fibroblast growth factor and ciliary neurotrophic factor mRNA levels in the retina [32-34] that may promote cell survival, thus we included a group of animals that received a single injection of Ad.GFP as control for this injury effect. In addition, Ad.GFP-injected eyes served as control for any effect caused by viral infection. Contralateral eyes were left uninjected and served as internal, non-operated controls for light-induced cell death in each individual rat.

Ad.BDNF treatment markedly protected photoreceptors from light injury at all times examined (Fig. 2). The ONL of retinas exposed to Ad.BDNF was substantially thicker, throughout the superior and inferior hemispheres, than retinas from control eyes injected with Ad.GFP or contralateral, untreated eyes. For example, after 10 days of light exposure, the average percentage of ONL preservation in the superior central retina of eyes that received Ad.BDNF (n=12) was 71% compared to 46% in eyes that received Ad.GFP (n=12) or 15% in contralateral eyes (n = 14) (ANOVA: $p < 0.001$) (Fig. 2B). This neuroprotective effect, although reduced, was still significant at 16 days of constant illumination, resulting in a thicker ONL (Fig. 2C) (Ad.BDNF: n=12; Ad.GFP: n=10; untreated: n=10; ANOVA: $p < 0.001$).

Ad-mediated BDNF resulted in substantial protection of photoreceptor cellular structure, most notably following 5 and 10 days of constant light exposure, as indicated by

a higher degree of nuclei organization and the integrity of outer and inner segments (Fig. 3). Interestingly, the control vector Ad.GFP had a moderate survival effect, at 5 and 10 days of light damage, compared to untreated eyes (Figs. 2A and 2B). However, Ad.GFP-treated retinas showed marked disorganization of the ONL and outer and inner segments were severely degenerated (Fig. 3C and 3F) with respect to Ad.BDNF-treated retinas. Given that all animals in experimental (Ad.BDNF-injected) and control (Ad.GFP-injected) groups received an identical small puncture injury during intraocular injection, the survival effect of Ad.BDNF cannot be attributed solely to the reported injury effect [32-34]. Moreover, all experimental and control animals were treated with FK-506, including animals kept in cyclic light and untreated animals exposed to constant light. Thus the neuroprotective effect of Ad.BDNF cannot be due to this immunosuppressant.

We then compared the survival effect of Ad.BDNF with that of a single injection of recombinant BDNF protein (Fig. 4). At all times examined, retinas exposed to Ad.BDNF had more photoreceptor nuclei, consequently thicker ONL, than retinas that received BDNF protein. The difference in the neuroprotective effect of Ad.BDNF or BDNF was apparent in both the superior (Fig. 4A) and inferior (Fig. 4B) hemispheres, and was particularly striking following 10 and 16 days of exposure to constant light. These data indicate that BDNF gene delivery to Müller cells is a more efficient strategy to promote structural protection of light-damaged photoreceptors than BDNF protein administration.

Ad.BDNF Treatment and Functional Protection of Injured Photoreceptors

The photoreceptor protection provided by Ad.BDNF prompted us to test its effect on the preservation of retinal function. For this purpose, *in vivo* ERG recordings were performed on Ad.BDNF- and Ad.GFP-treated rats at 5 or 10 days of exposure to constant light. Representative tracings and group data analyses of scotopic (rod-mediated) and photopic (cone-mediated) responses are shown in Figure 5 and group data analyses comparing the effect of treatment on scotopic and photopic b-waves are shown in Figure 6. Data obtained from the non-injected (contralateral) eyes were pooled and reported as non-treated eyes.

After 5 days of constant light exposure, the amplitude of the scotopic b-wave was considerably reduced (Figs. 5C, 5E) compared to control animals maintained in a cyclic

light environment (Fig. 5A), indicative of a rapid, light-induced deterioration of the rod response. The deleterious effect of light was markedly reduced following Ad.BDNF injection (Figs. 5B and 6A). For example, the amplitude of the scotopic b-wave was on average 123% (Fig. 6, ANOVA: $p < 0.01$) larger than that measured from non-treated eyes, and 75% larger than that measured from control eyes treated with Ad.GFP (Fig. 6, ANOVA: $p < 0.05$). Importantly, intravitreal injection of Ad.GFP did not result in significant protection of the scotopic responses compared to non-treated eyes (Figs. 5D and 6A).

The protective effect of Ad.BDNF on the scotopic response was maintained even after 10 days of light exposure (Fig. 5F), but the effect was no longer statistically significant (Figs. 5G and 6A, ANOVA: $p > 0.05$). While 2 out of the 6 rats (33%) treated with Ad.BDNF had non-recordable scotopic responses (Fig. 6A), extinguished scotopic responses were obtained in 4 out of 6 rats (66%) that received Ad.GFP injections and in 6 out of 12 (50%) control, non-injected eyes. The latter observation indicates that, after 10 days of constant light, Ad.BDNF protected retinal function in at least 66% of the treated animals, a value superior to that found in the other experimental groups. However, the amplitudes measured in all groups at 10 days of light exposure were markedly reduced compared to those measured after 5 days of constant light, confirming the tight correlation between duration of light exposure and severity of retinal degeneration.

Photopic ERG b-waves were also significantly attenuated at 5 and 10 days of constant light exposure (Fig. 5K-R and 6B) compared to responses measured from control eyes (Fig. 5J). At 5 days of light exposure, neither Ad.BDNF nor Ad.GFP injections altered the normal course of ERG attenuation: both treatments yielded b-wave amplitudes that were not significantly different from each other (Figs. 5K, 5M and Fig. 6B, ANOVA: $p > 0.05$) or from control (Fig. 5L, 5N and 6B, ANOVA: $p > 0.05$). However, following 10 days of light exposure there was a noticeable protective effect of Ad.BDNF treatment (Figure 5O) that resulted in significant preservation of the photopic b-wave compared to Ad.GFP (Fig. 5Q and 6B, ANOVA: $p < 0.001$) or absence of treatment (Fig. 5P and 6B, ANOVA: $p < 0.001$).

DISCUSSION

Most gene therapy strategies tested in animal models of retinal degeneration have relied on direct delivery of therapeutic genes to the affected cell type, such as photoreceptors [5-7, 41-46] or retinal pigment epithelium [8, 47, 48]. Here we explored a novel, alternative approach based on delivery of the BDNF gene to Müller cells. Our goal was to evaluate the efficacy of Müller glia, modified to act as an endogenous source of neurotrophin, to protect photoreceptors from light-induced death. The rationale behind this strategy was three-fold. First, we took advantage of the natural tropism of recombinant Ad for infection of Müller cells following intraocular administration of this viral vector. Secondly, the cytoarchitecture of Müller cells, with their apical processes in intimate contact with photoreceptor cell bodies, presupposes direct delivery of survival factors close to the neurons. Furthermore, BDNF, unlike other neurotrophic factors, has not been associated with problems of neovascularization, inflammation, cellular proliferation or reduced retinal function [13, 46, 49, 50].

Our data demonstrate that BDNF gene transfer to Müller cells leads to structural and functional protection of light-damaged photoreceptors. What is the mechanism by which BDNF-producing Müller cells protect photoreceptors? Our results strongly suggest that Ad.BDNF promoted the survival of rods and cones, an effect that was particularly evident at 5 and 10 days of constant light exposure. This is a paradoxical finding considering that only green-red cones, which represent <1% of all photoreceptors in the rat retina [51], are known to express the BDNF receptor TrkB [17]. One possibility is that Ad-infected Müller cells produce BDNF that stimulates the survival of green-red cones, which then secrete other diffusible factors that signal rods to stay alive. Müller cells have also been shown to express TrkB [52], thus it is also possible that these cells respond in an autocrine fashion to Ad-mediated BDNF by secreting other neurotrophic factors or molecules that induce rod and cone survival. There is increasing evidence in support of an active role for Müller cells in the regulation of photoreceptor cell death. Intraocular administration of BDNF or ciliary neurotrophic factor (CNTF) resulted in exclusive activation of Müller cells, but not photoreceptors [53]. Of interest, exogenous administration of neurotrophin-3 increased the production of basic fibroblast growth factor, which in turn protected photoreceptors from light-induced death [54]. More recently, factors secreted by

activated microglial cells, which migrate to the outer retina during light-induced degeneration, boosted the production of secondary trophic factors by Müller cells thus increasing photoreceptor survival [55]. Together, these data highlight the importance of Müller cells in the regulation of photoreceptor survival and death. More specifically, our data suggest that neurotrophic factor gene transfer into Müller cells is an effective strategy to deliver a survival factor in the microenvironment surrounding photoreceptors to delay retinal degeneration.

An interesting finding that stems from our study is that BDNF gene transfer resulted in more prolonged photoreceptor protection than administration of BDNF protein. These results suggest that Ad-infected Müller cells provide a more sustained source of BDNF within the retina than a single, bolus intravitreal administration of human recombinant BDNF protein. It is also likely that the biological activity of Ad-mediated BDNF, which is synthesized *in situ*, is higher than that of the recombinant protein. In contrast, our previous study showed that a single intraocular injection of Ad.BDNF or BDNF protein conferred similar protection of axotomized retinal ganglion cells [24]. This finding suggests that the retinal ganglion cell response to injury, including marked downregulation of the TrkB receptor after optic nerve axotomy [56], may limit the neuroprotective effect of BDNF gene transfer.

The ultimate goal of cell survival therapies is to protect photoreceptor function, which is essential for the preservation of vision. It is becoming increasingly clear, however, that structural protection of photoreceptors does not necessarily correlate with functional recovery. In an earlier study, a herpes simplex virus containing the fibroblast growth factor gene resulted in significant protection against light-induced photoreceptor loss, but did not preserve functional ERG responses [57]. More recently, CNTF gene transfer using adeno-associated virus (AAV) mediated photoreceptor survival in animal models of inherited retinal degeneration, but this neurotrophic factor had deleterious effects on visual function as assessed by electroretinography [46, 50]. In our study, the delay in photoreceptor cell death in the presence of Ad.BDNF was accompanied by partial protection of the b-wave, suggesting that the function of surviving photoreceptors was preserved. Our data is supported by other studies showing that a single injection of BDNF protein also conferred some protection of the ERG b-wave response after short periods of exposure to constant

light [58]. Moreover, transgenic mice overexpressing BDNF displayed delayed photoreceptor loss induced by a rhodopsin mutation that correlated with preservation of the ERG [16]. Together, these data demonstrate the potential of BDNF as a therapeutic agent for the treatment of retinal degeneration.

In this study, the BDNF gene was delivered using Ad because of the natural ability of this vector to infect Müller cells when injected into the vitreous chamber of the eye [24]. Thus, Ad was clearly the ideal vector to investigate the potential of Müller glia as a delivery route for neurotrophic factors during retinal degeneration. Ad vectors have many attractive features suitable for ocular gene therapy such as the ability to efficiently infect post-mitotic cells, large cloning capacity, high expression levels and ease of manufacture [59]. Our data show that treatment with an immunosuppressant completely abolished Ad-mediated inflammation and allowed for sustained transgene expression. From a clinical perspective, however, it is likely that newer generation of Ad vectors, such as gutless Ad, that lack all viral sequences and do not evoke an immune reaction [60, 61] will be better suited for therapeutic use. In support of this, several recent studies have demonstrated the potential of gutless Ad for gene transfer to the retina [62-64], and clinical trials for the treatment of age-related macular degeneration using this vector system have been proposed [65].

In summary, here we provide proof of concept that Müller glia are ideal cellular targets for neurotrophin gene delivery by Ad vectors, and that BDNF production by these cells effectively delays photoreceptor degeneration and preserves retinal function.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. David Kaplan (Hospital for Sick Children, University of Toronto) for providing the anti-panTrk 203 and $TrkB_{in}$ antibodies and Dr. Timothy E. Kennedy (Montreal Neurological Institute, McGill University) for helpful comments on the manuscript.

REFERENCES

1. Rattner A, Sun H, Nathans J. Molecular genetics of human retinal disease. *Ann. Rev. Genet.* 1999; 33: 89-131.
2. Farrar GJ, Kenna PF, Humphries P. On the genetics of retinitis pigmentosa and on mutation-independent approaches to therapeutic intervention. *EMBO J.* 2002; 21: 857-864.
3. Rivolta C, Sharon D, DeAngelis MM, Dryja TP. Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance patterns. *Hum. Mol. Genet.* 2002; 11: 1219-1227.
4. Michaelides M, Hunt DM, Moore AT. The genetics of inherited macular dystrophies. *J Med Genet* 2003; 40: 641-650.
5. Lewin AS, Drenser KA, Hauswirth WW, et al. Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat. Med.* 1998; 4: 967-971.
6. Takahashi M, Miyoshi H, Verma IM, Gage FH. Rescue from photoreceptor degeneration in the rd mouse by human immunodeficiency virus vector-mediated gene transfer. *J. Virol.* 1999; 73: 7812-7816.
7. Ali RR, Sarra GM, Stephens C, et al. Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nat. Genet.* 2000; 25: 306-310.
8. Acland GM, Aguirre GD, Ray J, et al. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat. Genet.* 2001; 28: 92-95.
9. Chang GQ, Hao Y, Wong F. Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice. *Neuron* 1993; 11: 595-605.
10. Portera-Cailliau C, Sung CH, Nathans J, Adler R. Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 974-978.
11. Cook BE, Lewis GP, Fisher SK, Adler R. Apoptotic photoreceptor degeneration in experimental retinal detachment. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1995; 36: 990-996.
12. Abler AS, Chang CJ, Ful J, Tso MO, Lam TT. Photic injury triggers apoptosis of photoreceptor cells. *Res. Comm. Mol. Pathol. & Pharmacol.* 1996; 92: 177-189.

13. LaVail MM, Unoki K, Yasumura D, et al. Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 11249-11253.

14. LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, et al. Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998; 39: 592-602.

15. Lewis GP, Linberg KA, Geller SF, Guerin CJ, Fisher SK. Effects of the neurotrophin brain-derived neurotrophic factor in an experimental model of retinal detachment. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999; 40: 1530-1544.

16. Okoye G, Zimmer J, Sung J, et al. Increased Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor Preserves Retinal Function and Slows Cell Death from Rhodopsin Mutation or Oxidative Damage. *J. Neurosci.* 2003; 23: 4164-4172.

17. Di Polo A, Cheng L, Bray GM, Aguayo AJ. Co-localization of TrkB and brain-derived neurotrophic factor proteins in green/red- sensitive cone outer segments. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000; 41: 4014-4021.

18. Cellerino A, Kohler K. Brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin-4 receptor trkb is localized on ganglion cells and dopaminergic amacrine cells in the vertebrate retina. *J. Comp. Neurol.* 1997; 386: 149-160.

19. Rohrer B KJ, LaVail MM, Reichardt LF, Xu B. Role of neurotrophin receptor TrkB in the maturation of rod photoreceptors and establishment of synaptic transmission to the inner retina. *J. Neurosci.* 1999; 19: 8919-8930.

20. Jelsma TN, Hyman Friedman H, Berkelaar M, Bray GM, Aguayo AJ. Different forms of the neurotrophin receptor trkB mRNA predominate in rat retina and optic nerve. *J. Neurobiol.* 1993; 24: 1207-1214.

21. Pérez MTR, Caminos E. Expression of brain-derived neurotrophic factor and its functional receptor in neonatal and adult rat retina. *Neurosci. Lett.* 1995; 183: 96-99.

22. Rickman DW, Brecha NC. Expression of the proto-oncogene, trk, receptors in the developing rat retina. *Vis. Neurosci.* 1995; 12: 215-222.

23. Castren E, Berninger B, Leingartner A, Lindholm D. Regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA levels in hippocampus by neuronal activity. *Prog. Brain Res.* 1998; 117: 57-64.

24. Di Polo A, Aigner LJ, Dunn RJ, Bray GM, Aguayo AJ. Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Müller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 3978-3983.

25. Bringmann A, Skatchkov SN, Pannicke T, et al. Muller glial cells in anuran retina. *Microsc. Res. Tech.* 2000; 50: 384-393.

26. Hardy S, Kitamura M, Harris-Stansil T, Dai Y, Phipps ML. Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. *J. Virol.* 1997; 71: 1842-1849.

27. Csaky KG. Preparation of recombinant adenoviruses. In: *Methods in Molecular Medicine, Vision Research Protocols*, P.E. Rakoczy, editor. Humana Press Inc. Totowa, NJ; 2001: 141-155.

28. Lochmüller H, Jani A, Huard J, et al. Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (delta E1 + delta E3) during multiple passages in 293 cells. *Hum. Gene Ther.* 1994; 5: 1485-1491.

29. Olfert ED, Cross BM, McWilliams AA. *The Guide to the Care and Use of Experimental Animals.* 2nd ed.Ottawa, ON, Canada: Canadian Council on Animal Care; 1993.

30. Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang Y-C, Bray GM, Aguayo AJ. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 1632-1636.

31. Leon S, Yin Y, Nguyen J, Irwin N, Benowitz LI. Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. *J. Neurosci.* 2000; 20: 4615-4626.

32. Wen R, Song Y, Cheng T, et al. Injury-induced upregulation of bFGF and CNTF mRNAS in the rat retina. *J Neurosci* 1995; 15: 7377-85.

33. Cao W, Wen R, Li F, Lavail MM, Steinberg RH. Mechanical injury increases bFGF and CNTF mRNA expression in the mouse retina. *Exp Eye Res* 1997; 65: 241-8.

34. Cao W, Li F, Steinberg RH, Lavail MM. Development of normal and injury-induced gene expression of aFGF, bFGF, CNTF, BDNF, GFAP and IGF-I in the rat retina. *Exp. Eye Res.* 2001; 72: 591-604.

35. Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM. Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat. *J. Neurosci.* 1992; 12: 3554-3567.

36. Lachapelle P. Analysis of the photopic electroretinogram recorded before and after dark adaptation. *Can. J. Ophthalmol.* 1987; 22: 354-361.

37. Stephens RM, Loeb DM, Copeland TD, et al. Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-γ1 to mediate NGF responses. *Neuron* 1994; 12: 691-705.

38. Wood MJ, Charlton HM, Wood KJ, Kajiwara K, Byrnes AP. Immune responses to adenovirus vectors in the nervous system. *Trends Neurosci.* 1996; 19: 497-501.

39. Acsadi G, Lochmuller H, Jani A, et al. Dystrophin expression in muscles of mdx mice after adenovirus-mediated in vivo gene transfer. *Hum. Gene Ther.* 1996; 7: 129-140.

40. Edwards RH, Selby MJ, Garcia PD, Rutter WJ. Processing of the native nerve growth factor precursor to form biologically active nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 6810-6815.

41. Bennett J, Tanabe T, Sun D, et al. Photoreceptor cell rescue in retinal degeneration (rd) mice by in vivo gene therapy. *Nat. Med.* 1996; 2: 649-654.

42. Jomary C, Vincent K, Grist J, Neal M, Jones S. Rescue of photoreceptor function by AAV-mediated gene transfer ina mouse model of inherited retinal degeneration. *Gene Ther.* 1997; 4: 683-690.

43. Bennett J, Zeng Y, Bajwa R, et al. Adenovirus-mediated delivery of rhodopsin-promoted bcl-2 results in a delay in photoreceptor cell death in the rd/rd mouse. *Gene Ther.* 1998; 5: 1156-1164.

44. Lau D, McGee LH, Zhou S, et al. Retinal Degeneration Is Slowed in Transgenic Rats by AAV-Mediated Delivery of FGF-2. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000; 41: 3622-3633.

45. McGee Sanftner LH, Abel H, Hauswirth WW, Flannery JG. Glial cell line derived neurotrophic factor delays photoreceptor degeneration in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa. *Mol. Ther.* 2001; 4: 622-629.

46. Bok D, Yasumura D, Matthes MT, et al. Effects of adeno-associated virus-vectored ciliary neurotrophic factor on retinal structure and function in mice with a P216L rds/peripherin mutation. *Exp. Eye Res.* 2002; 74: 719-735.

47. Li T, Davidson BL. Phenotype correction in retinal pigment epithelium in murine mucopolysaccharidosis VII by adenovirus-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 7700-7704.

48. Vollrath D, Feng W, Duncan JL, et al. Correction of the retinal dystrophy phenotype of the RCS rat by viral gene transfer of Mertk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 12584-12589.

49. Steinberg RH. Survival factors in retinal degenerations. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1994; 4: 515-524.

50. Schlichtenbrede FC, MacNeil A, Bainbridge JW, et al. Intraocular gene delivery of ciliary neurotrophic factor results in significant loss of retinal function in normal mice and in the Prph2Rd2/Rd2 model of retinal degeneration. *Gene Ther.* 2003; 10: 523-527.

51. Szél Á, Röhlich P. Two cone types of rat retina detected by anti-visual pigment antibodies. *Exp. Eye Res.* 1992; 55: 47-52.

52. Rohrer B, Korenbrot JI, LaVail MM, Reichardt LF, Xu B. Role of Neurotrophin Receptor TrkB in the Maturation of Rod Photoreceptors and Establishment of Synaptic Transmission to the Inner Retina. *J. Neurosci.* 1999; 19: 8919-8930.

53. Wahlin KJ, Campochiaro PA, Zack DJ, Adler R. Neurotrophic factors cause activation of intracellular signaling pathways in Müller cells and other cells of the inner retina, but not photoreceptors. *Invest. Opthalmol. Vis. Sci.* 2000; 41: 927-936.

54. Harada T, Harada C, Nakayama N, et al. Modification of Glial-Neuronal Cell Interactions Prevents Photoreceptor Apoptosis during Light-Induced Retinal Degeneration. *Neuron* 2000; 26: 533-541.

55. Harada T, Harada C, Kohsaka S, et al. Microglia-Muller Glia Cell Interactions Control Neurotrophic Factor Production during Light-Induced Retinal Degeneration. *J. Neurosci.* 2002; 22: 9228-9236.

56. Cheng L, Sapieha P, Kittlerová P, Hauswirth WW, Di Polo A. TrkB gene transfer protects retinal ganglion cells from axotomy-induced death in vivo. *J. Neurosci.* 2002; 22: 3977-3986.

57. Spencer B, Agarwala S, Gentry L, Brandt CR. HSV-1 Vector-Delivered FGF2 to the Retina Is Neuroprotective but Does Not Preserve Functional Responses. *Molecular Therapy* 2001; 3: 746-756.

58. Ikeda K, Tanihara H, Tatsuno T, Noguchi H, Nakayama C. Brain-derived neurotrophic factor shows a protective effect and improves recovery of the ERG b-wave response in light-damage. *J Neurochem* 2003; 87: 290-296.

59. Sapieha PS, Di Polo A. Recombinant viral vectors. In: *Ocular Neuroprotection*, L.A. Levin and A. Di Polo, editors. Marcel Dekker, Inc. New York; 2003: 167-187.

60. Schiedner G, Morral N, Parks RJ, et al. Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreases toxicity. *Nat. Genet.* 1998; 18: 180-183.

61. Morsy MA, Gu M, Motzel S, et al. An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 7866-7871.

62. Oshima Y, Takahashi K, Oshima S, et al. Intraocular gutless adenoviral-vectored VEGF stimulates anterior segment but not retinal neovascularization. *J. Cell Physiol.* 2004; 199: 399-411.

63. Rex TS, Tsui I, Hahn P, et al. Adenovirus-mediated delivery of catalase to retinal pigment epithelial cells protects neighboring photoreceptors from photo-oxidative stress. *Hum. Gene Ther.* 2004; 15: 960-967.

64. Imai D, Yoneya S, Gehlbach PL, Wei LL, Mori K. Intraocular gene transfer of pigment epithelium-derived factor rescues photoreceptors from light-induced cell death. *J. Cell Physiol.* 2005; 202: 570-578.

65. Rasmussen H, Chu KW, Campochiaro P, et al. Clinical protocol. An open-label, phase I, single administration, dose-escalation study of ADGVPEDF.11D (ADPEDF) in neovascular age-related macular degeneration (AMD). *Hum. Gene Ther.* 2001; 12: 2029-2032.

FIGURES

Figure 1. (A) BDNF transgene expression in Müller cells was detected at 30 days after viral vector administration by immunostaining using an antibody against the c-myc epitope tag. Scale bar: 50 μm (B) A single Müller cell infected with Ad.BDNF clearly shows diffuse c-myc staining at the level of the outer nuclear layer (ONL) suggesting that the BDNF transgene product was produced close to photoreceptor cell bodies. Scale bar: 20 μm (C) Western blot analysis of protein homogenates from retinas treated with Ad.BDNF or control Ad.GFP collected 30 days after viral injection. A single intraocular injection of Ad.BDNF, but not Ad.GFP, resulted in production of c-myc tagged BDNF protein detected using a c-myc antibody. Lower panel shows the same blot reprobed with actin used as control for equal protein loading. (D) Tyrosine phosphorylation of retinal TrkB at 30 days after a single Ad.BDNF or Ad.GFP injection was examined by immunoprecipitation of 300 μg of retinal protein with an anti-pan Trk antibody followed by Western blot analysis using anti-phosphotyrosine antibody. The bottom panel shows the same blot probed with an antibody that recognizes the intracellular domain of TrkB ($TrkB_{in}$). RPE: retinal pigment epithelium; OS: outer segment; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer.

Figure 2. Measurements of the ONL thickness were taken along the dorsal-ventral plane of the eye in rats exposed to 5 days (A), 10 days (B) or 16 days (C) of constant light and treated with Ad.BDNF (filled circles), Ad.GFP (filled triangles), or untreated (open squares). Rats maintained in a cyclic light environment (12 hr on, 12 hr off) served as normal, untreated controls. ONL thickness was measured in six to eight serial sections per eye for each experimental animal. The data shows mean ONL thickness ± S.E.M. In all cases, treatment with Ad.BDNF led to ONL thickness that was significantly higher than that of Ad.GFP or untreated controls both in the superior and inferior central retinas (ANOVA: * = $p < 0.001$).

Figure 3. Light micrographs of intact retinas from rats kept in cyclic light (A, A') or exposed to 5 (B-D) or 10 (E-G) days of constant light. A single intraocular injection of Ad.BDNF (B, E) led to better structural preservation of photoreceptor cellular structure than treatment with Ad.GFP (C, F) or untreated eyes (D, G). Scale bar : 20 μm.

Figure 4. Analysis of ONL thickness in the superior (A) or inferior (B) retinal hemisphere of rat eyes treated with Ad.BDNF (solid bars) or BDNF recombinant protein (gray bars) after 5, 10 or 16 days of exposure to constant light. In all cases, treatment with Ad.BDNF led to better preservation of ONL thickness than BDNF protein (Student's t test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.001$).

Figure 5. Representative examples of scotopic (A-I) and photopic (J-R) ERG responses obtained from control rats kept in cyclic light (A and J) and rats treated with Ad.BDNF or Ad.GFP and then exposed to 5 or 10 days of constant light. Horizontal and vertical calibrations: 40 msec and 100 μV (scotopic recordings, B-I) or 20 μV (photopic recordings, K-R). A 20-msec prestimulus baseline is included at the beginning of each tracing. The black arrow indicates flash onset.

Figure 6. Group data comparing the scotopic (A) and photopic (B) b-wave amplitudes measured in eyes that received a single intravitreal injection of Ad.BDNF or Ad.GFP, and in contralateral, non-treated eyes from rats exposed to 5 or 10 days of constant light. Each bar represents the mean ± S.E.M. Given that contralateral eyes from animals that received Ad.BDNF or Ad.GFP injection had identical amplitudes at 5 days of light exposure (41 ± 21.6 μvolts vs. 41.5 ± 23.1 μvolts, respectively; Student's t test, $p > 0.05$), these values were grouped together. In order to better appreciate data dispersion, individual data points are illustrated within each bar graph. Statistical analysis was performed using ANOVA followed by a Tukey test (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$).

FIGURE 1

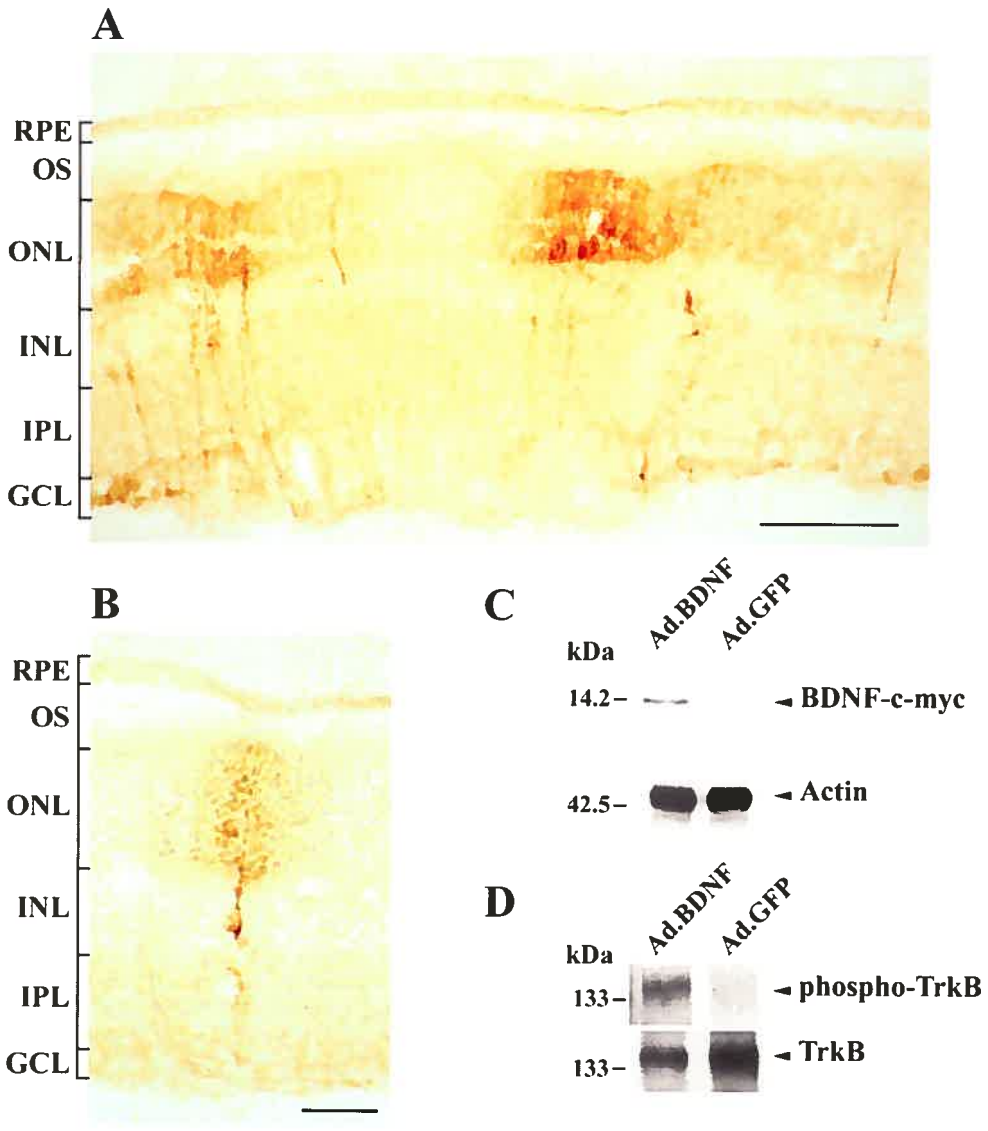
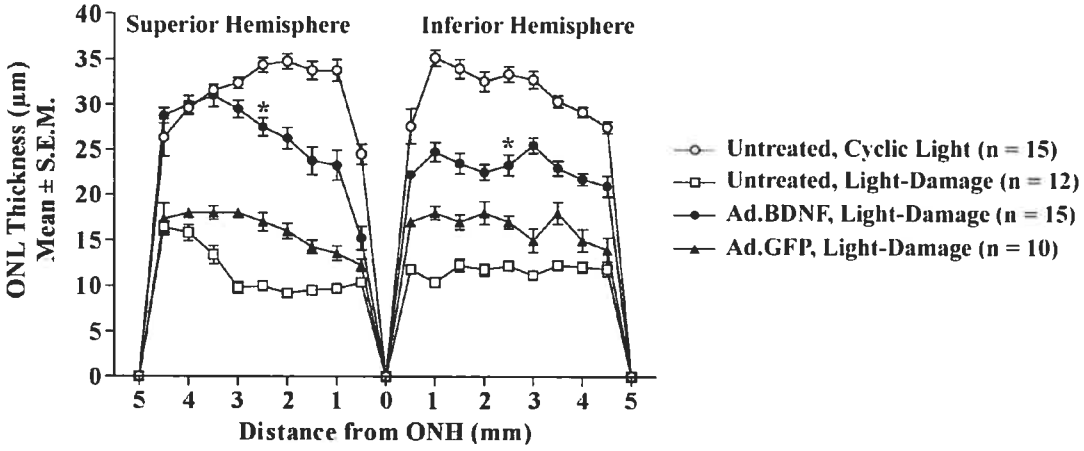
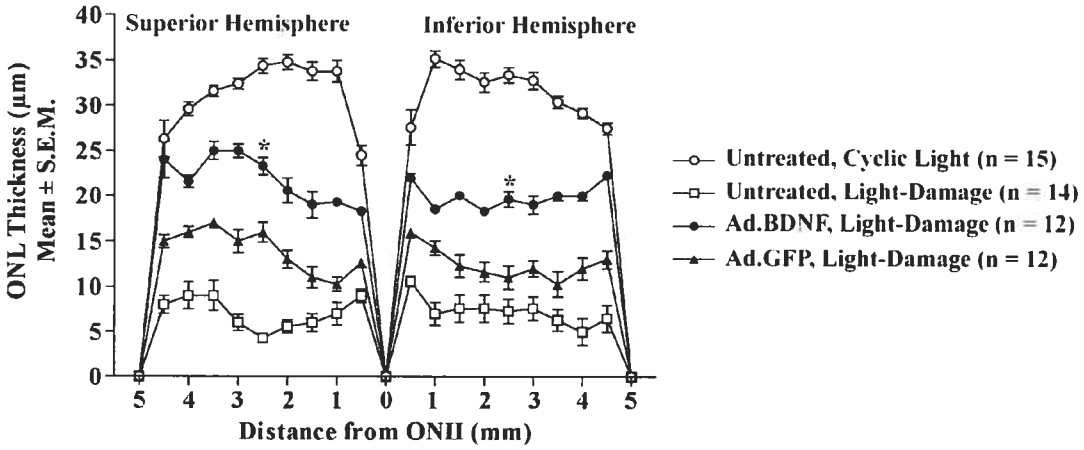

A
RPE
OS
ONL
INL
IPL
GCL
B
RPE
OS
ONL
INL
IPL
GCL
C
Ad.BDNF
Ad.GFP
kDa
14.2–
BDNF-c-myc
42.5–
Actin
D
Ad.BDNF
Ad.GFP
kDa
133–
phospho-TrkB
133–
TrkB

FIGURE 2

A CONSTANT LIGHT: 5 days



B CONSTANT LIGHT: 10 days



C CONSTANT LIGHT: 16 days

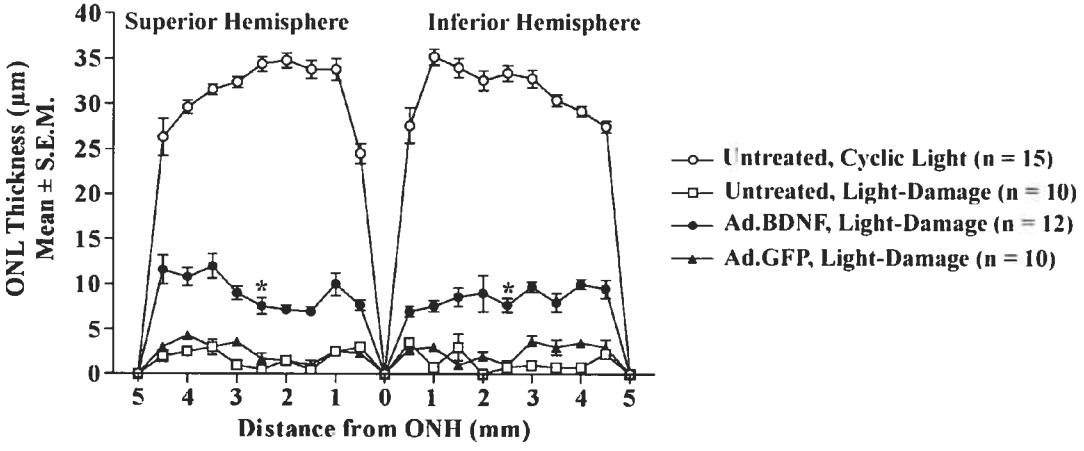


FIGURE 3

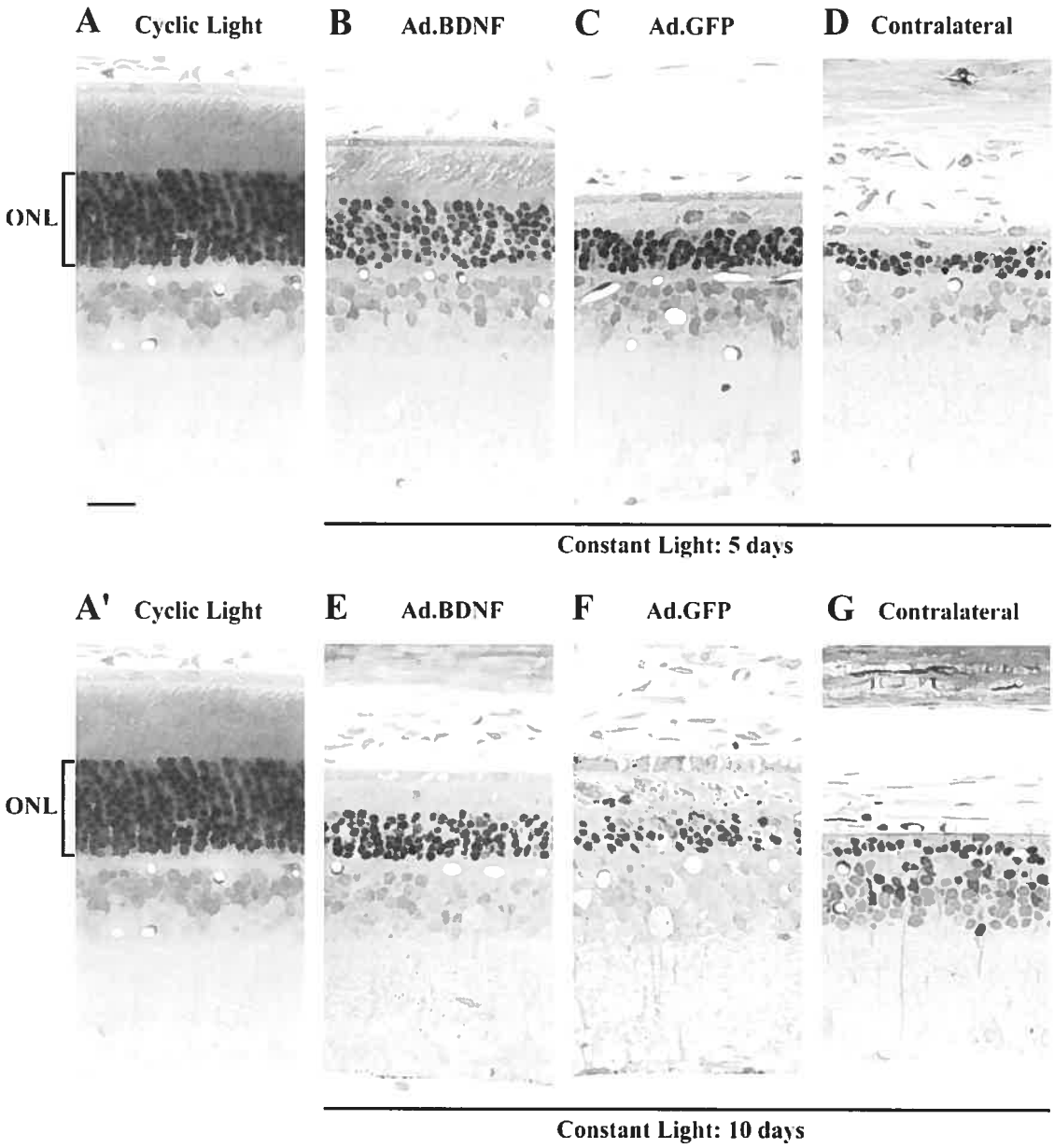

A Cyclic Light
B Ad.BDNF
C Ad.GFP
D Contralateral
ONL
Constant Light: 5 days
A' Cyclic Light
E Ad.BDNF
F Ad.GFP
G Contralateral
ONL
Constant Light: 10 days

FIGURE 4

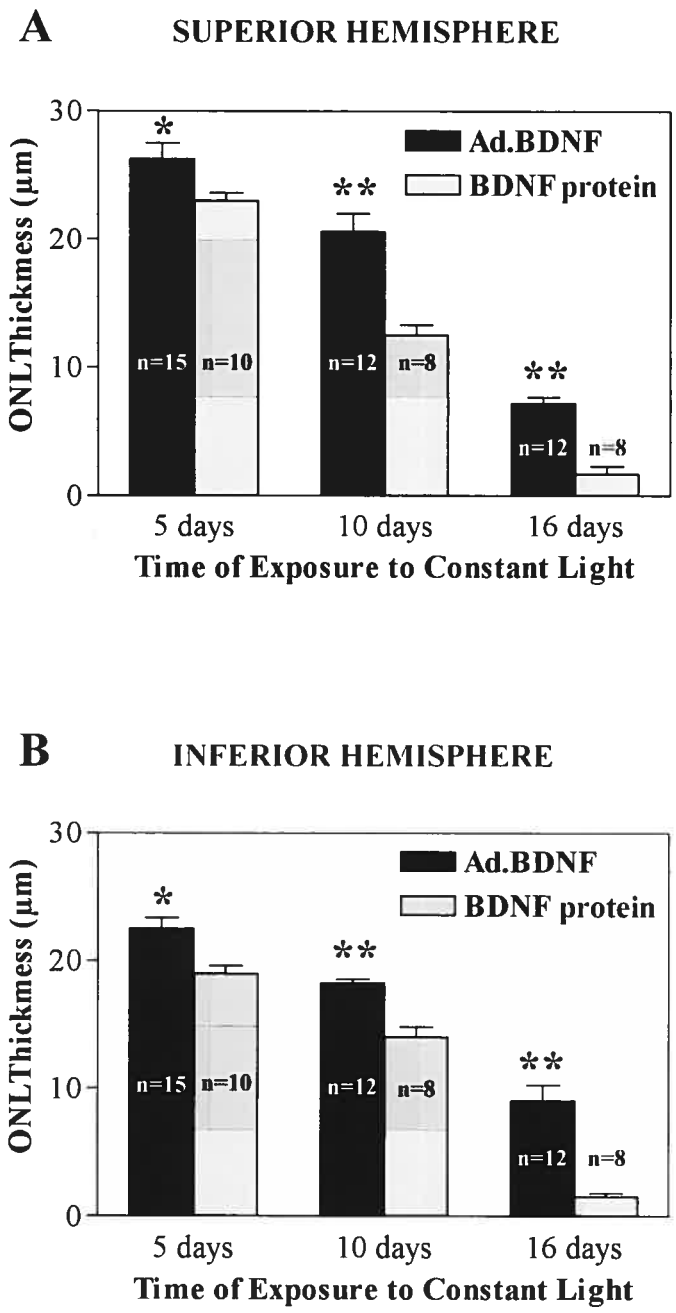

A
SUPERIOR HEMISPHERE
ONLThickmess (µm)
30
20
10
0
*
**
**
Ad.BDNF
BDNF protein
n=15
n=10
n=12
n=8
n=12
n=8
5 days
10 days
16 days
Time of Exposure to Constant Light
B
INFERIOR HEMISPHERE
ONLThickmess (µm)
30
20
10
0
*
**
**
Ad.BDNF
BDNF protein
n=15
n=10
n=12
n=8
n=12
n=8
5 days
10 days
16 days
Time of Exposure to Constant Light

FIGURE 5

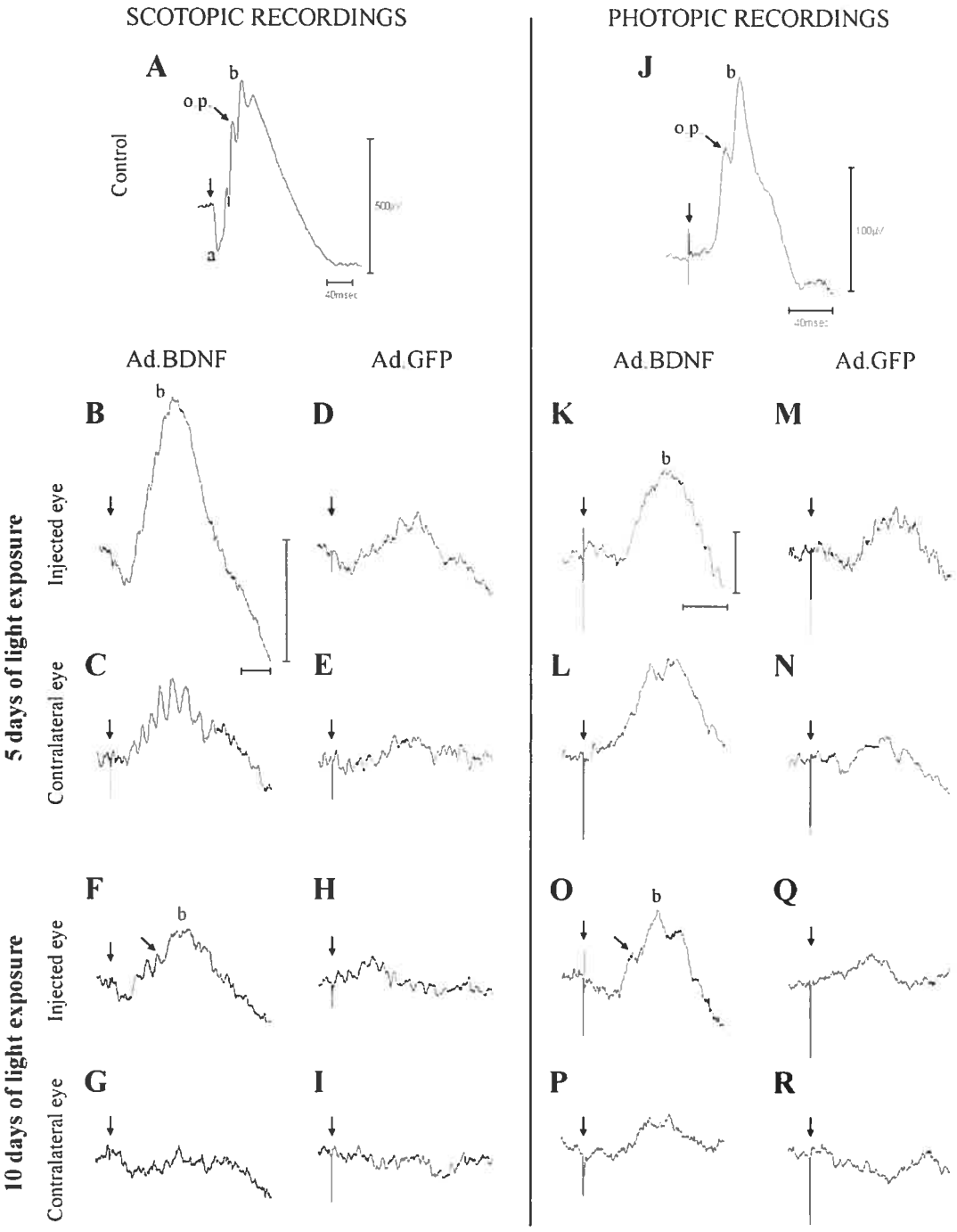
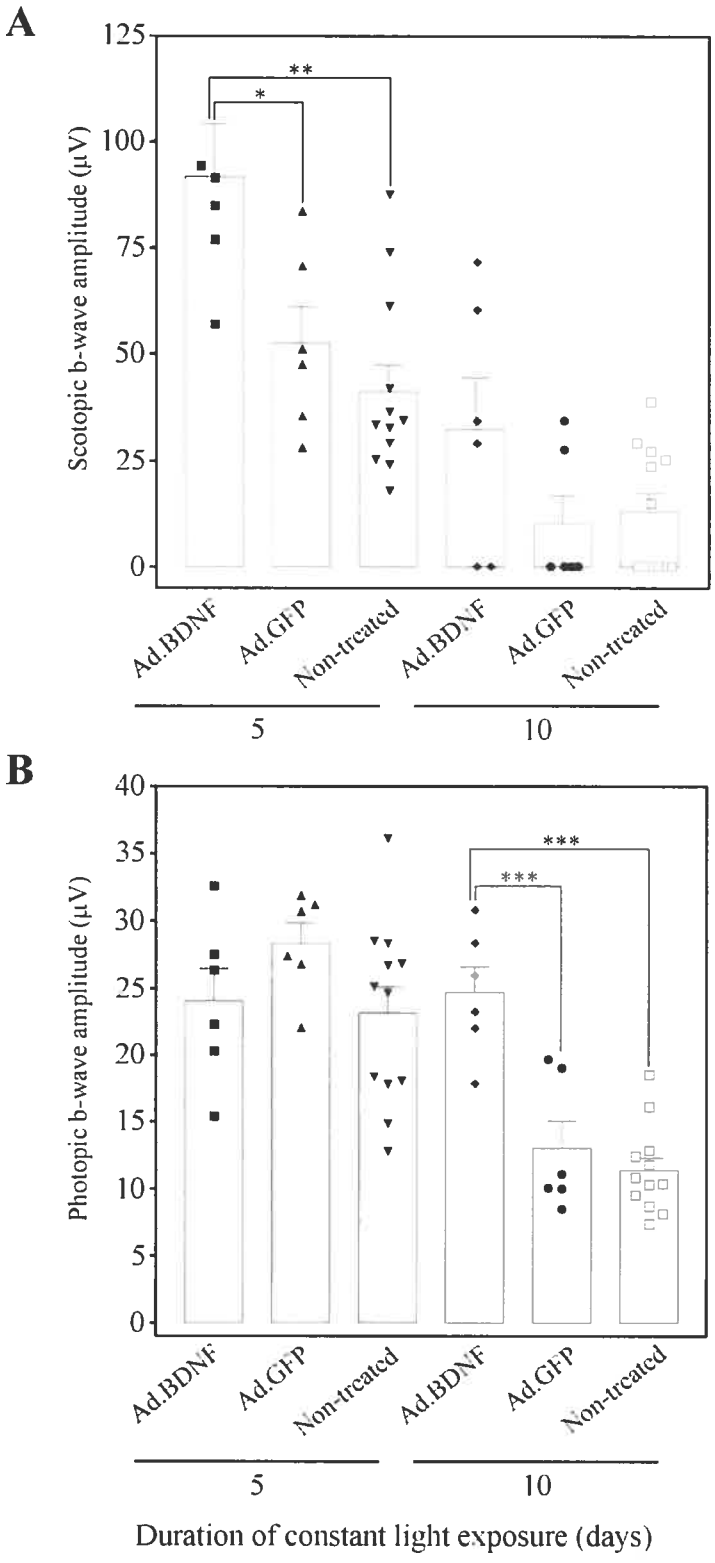

SCOTOPIC RECORDINGS
PHOTOPIC RECORDINGS
A
b
o p
Control
a
500µV
40msec
J
b
o p
100µV
40msec
Ad.BDNF
Ad.GFP
Ad.BDNF
Ad.GFP
B
D
K
M
b
5 days of light exposure
Injected eye
C
E
L
N
Contralateral eye
F
H
O
Q
b
b
10 days of light exposure
Injected eye
G
I
P
R
Contralateral eye

FIGURE 6


A
125
100
75
50
25
0
Scotopic b-wave amplitude (μV)
**
*
Ad.BDNF
Ad.GFP
Non-treated
Ad.BDNF
Ad.GFP
Non-treated
5
10
B
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Photopic b-wave amplitude (μV)
***
***
Ad.BDNF
Ad.GFP
Non-treated
Ad.BDNF
Ad.GFP
Non-treated
5
10
Duration of constant light exposure (days)

ANNEXE 2

CONTRIBUTION AUX ARTICLES

En tant que premier auteur de l'article **"Structural and functional consequences of bright light exposure on the retina of neonatal rats" (Chapitre 2)**, j'ai réalisé la totalité des manipulations expérimentales. La rédaction du manuscrit a été faite en collaboration avec ma directrice de recherche, la Dre Hakima Moukhles et mon codirecteur, le Dr Pierre Lachapelle.

En tant que premier auteur de l'article **"Light-induced retinopathy: comparison between adults and juvenile rats" (Chapitre 3)**, j'ai réalisé la totalité des manipulations expérimentales. La rédaction du manuscrit a été faite en collaboration avec mon directeur de recherche, le Dr Pierre Lachapelle.

En tant que premier auteur de l'article **" Evidence suggesting FGF-2 and CNTF neuroprotection in the juvenile rat model of light-induced retinopathy" (Chapitre 4)**, j'ai réalisé la totalité des manipulations expérimentales et la rédaction du manuscrit en collaboration avec mon directeur de recherche, le Dr Pierre Lachapelle et conjointement avec la Dre Adriana Di Polo.

En tant que co-premier auteur de l'article **"Brain-derived neurotrophic factor gene delivery to Müller glia promotes structural and functional protection of light-damaged photoreceptors" (Annexe 1),** j'ai réalisé tous les enregistrements électrophysiologiques. J'ai analysé l'ensemble des données concernant cette partie de l'étude (électrophysiologie) et j'ai rédigé les parties *méthodologie* et *résultats* du manuscrit en collaboration avec mon directeur de recherche, le Dr Pierre Lachapelle et conjointement avec la Dre Adriana Di Polo.