

## **COMPTE RENDU DE L'ARVO 2010**

**Professeur Christian HAMEL**

**Directeur de l'Inserm U583 Montpellier Génétique et Thérapies des Cécités Rétiniennes**

**Membre du Comité Scientifique de SOS Rétinite France**

**Le congrès de l'association américaine de recherche en ophtalmologie et en vision est la réunion scientifique annuelle incontournable pour tous les chercheurs et médecins de la planète qui travaillent dans le domaine de la vision, que ce soit parce que la recherche est leur métier, ou simplement pour s'informer des avancées biomédicales en ophtalmologie.**

**Cette année, 6457 présentations ont été données, soit sous forme d'affiche, soit sous forme de conférence.**

Ce compte rendu est le fruit d'un travail en commun de l'équipe de recherche de l'Institut des Neurosciences de Montpellier et de l'École des Mines d'Alès. Pour une lecture plus facile, il est subdivisé en paragraphes qui recouvrent les grands domaines de la recherche.

### **Description de maladies**

#### **Rétinite pigmentaire**

Eliot Berson a fait un historique de la rétinite pigmentaire et des grandes étapes qui ont jalonné la caractérisation de cette maladie. Il a déclaré que le taux de déclin de l'ERG cônes est très semblable quelque soit le type de gène en cause. Il a établi des abaques qui permettent de prédire le rythme de progression de la perte des cônes au cours du temps. On peut ainsi théoriquement estimer les capacités de déplacement des patients plusieurs années après un examen. Ces estimations présentent un intérêt pour suivre l'évolution de la maladie avec de nouveaux traitements. Eliot Berson prône toujours l'utilisation de la vitamine A à raison de 5 000 unités par jour de l'âge de 5 à 9 ans, 10 000 unités de 10 à 14 ans, et 15 000 unités au dessus. La DHA doit être donnée à raison de 1200 mg/jour (on peut aussi prendre 1 à 2 cuillères d'huile de poisson par semaine à la place) et la lutéine à raison de 12 mg/jour. Elle a une action protectrice chez les patients qui ont un taux bas dans le sérum.

Jayasundera, d'Ann Harbor aux USA (abs 4793) a présenté les rétinites pigmentaires liées à l'X dues au gène RP2. L'atteinte maculaire est très fréquente (91 % des cas) et précoce (avant 12 ans), et la myopie présente dans 4 cas sur 5. L'acuité visuelle est de 1/10 ou moins à 30 ans. Deux sur 16 patients ont un fond d'oeil qui ressemble à la choroïdérémie. Les 3 femmes de ce groupe de patients ont une maladie sévère, avec une asymétrie importante (œil droit très atteint, œil gauche beaucoup moins dans un cas).

#### **Choroïdérémie**

Il n'y avait qu'une seule présentation concernant la choroïdérémie, du laboratoire de Miguel Seabra à Londres. Son équipe fait des études de thérapie génique sur le modèle murin de la choroïdérémie en utilisant des vecteurs non viraux, appelés « scaffold/matrix attachment régions » (S/MARs).

Ce laboratoire a montré qu'avec un vecteur S/MAR codant le gène CHM on peut restaurer un phénotype normal dans des fibroblastes de patients. Un vecteur s/MAR codant une protéine fluorescente a été également administré dans l'œil de souris par injection sous-rétinienne et de la fluorescence a été observée jusqu'à 4 mois après injection dans l'épithélium pigmentaire de la rétine. L'expression est restée localisée au site de l'injection

### **Neuropathie optique héréditaire de Leber**

Dans la neuropathie optique héréditaire de Leber, les hommes sont 3 à 4 fois plus touchés que les femmes, suggérant qu'un effet hormonal puisse contrôler le déclenchement de la maladie. Une étude de l'effet des oestrogènes sur des cellules cybrides présentant la mutation 11778 montre que cette hormone féminine protège en effet les cellules de la mort en améliorant la physiologie mitochondriale. Par ailleurs, un nouveau locus de susceptibilité pour cette maladie sur le chromosome Xq25 Xq27.2 de 21 cM, incluant 184 gènes, a été identifié dans la famille brésilienne suivie par A. Sadun et V. Carelli. Ce locus est différent de celui identifié précédemment par Chinnery. Cela fait donc beaucoup d'hypothèses pour expliquer la prédominance masculine dans la maladie

### **Atrophie optique dominante**

Chez les souris modèles pour l'atrophie optique dominante, il y a au niveau des corps cellulaire; des cellules ganglionnaires de la rétine une altération du réseau de leurs dendrites détectable uniquement après l'âge de 12 mois. Une diminution du champ d'extension des dendrites et de leur longueur totale est observée uniquement dans les cellules dites ON.

### **Thérapie génique**

Suite aux essais cliniques de thérapie génique de l'amaurose congénitale de Leber (ACL) effectués depuis 2008, deux études ont approfondi ces résultats. Le laboratoire du Dr Robin Ali à Londres a examiné l'effet de doses plus fortes de vecteur AAV2 codant le gène RPE65. Une amélioration des tests visuels a été notée après l'administration du vecteur sans pour l'instant d'effets secondaires chez les patients. Le laboratoire du Dr Eric Pierce à Philadelphie (USA) a montré que l'amélioration visuelle est meilleure chez l'enfant que chez l'adulte, ce qui confirme que plus les patients sont jeunes, meilleures sont les chances de restaurer la vision. Il y avait également une étude effectuée par l'équipe de Dr Petersen-Jones à Michigan (USA) sur le modèle canin de l'ACL. Ces auteurs cherchaient à déterminer si une première injection d'un vecteur AAV2 portant le gène RPE65 dans l'un des deux yeux chez le chien génère une réponse immunitaire qui interférerait avec une deuxième injection plus tard dans l'autre œil. Les auteurs ont détecté des anticorps contre le vecteur AAV2 après traitement du premier œil, mais ces anticorps n'ont pas empêché l'amélioration de la vision dans le deuxième œil. Ce travail suggère ainsi qu'il est possible d'injecter les deux yeux des patient; à des temps différents.

Il y avait également quelques études de thérapie génique dans divers modèles de souris de dystrophies rétiniennes que nous résumons brièvement.

Pour l'ACL - l'administration d'un vecteur AAV8 codant pour le gène RPGRIP1 chez des souris déficientes pour ce gène a permis l'expression de RPGRIP1 dans les photorécepteurs et la localisation de la protéine codée au niveau du cil connecteur. Les souris ainsi traitées ont montré une amélioration de la fonction des photorécepteurs et un ralentissement de leur dégénérescence.

Pour la RP de la souris modèle rd10 - l'administration d'un vecteur AAV8 avec une capsid modifiée codant pour le gène PDE chez des souris déficientes pour ce gène a permis l'expression de la protéine dans les segments externes des photorécepteurs sur toute la surface rétinienne. La dégénérescence rétinienne a ainsi cessé d'évoluer pendant toute la période d'observation de 6 mois.

Pour le syndrome de Usher de type II - Les gènes Whirlin, USH2A et VLGR1 sont responsables du syndrome de Usher de type II et les 3 protéines correspondantes forment un complexe protéique. Il a été démontré que l'introduction du gène Whirlin par un vecteur AAV2 dans la rétine de souris déficientes pour ce gène permet l'expression de la protéine Whirlin au niveau du complexe de la membrane périciliaire des photorécepteurs. De plus, l'expression de la Whirlin a également augmenté l'expression des protéines USH2A et VLGR1 qui sont normalement diminuées chez ces animaux et a relocalisé ces protéines au niveau du cil connecteur. Ceci suggère la possibilité de traiter des patients du syndrome Usher de type II du à des mutations dans le gène Whirlin par thérapie génique.

Dans la neuropathie optique héréditaire de Leber, il est proposé l'administration optimisée d'un transgène nucléaire de la protéine ND4 pour traiter les cas dus à la mutation primaire 11778. Une nouvelle innovation consiste à intégrer une séquence d'adressage mitochondriale à la capsid du vecteur pour transduire de l'ADN thérapeutique dans la mitochondrie. L'idée séduisante reste à démontrer formellement.

Les études de thérapie génique avec des vecteurs non viraux se poursuivent. L'expression des transgènes ne semble pas aussi durable (abs 2528). Des essais sont aussi faits avec des vecteurs viraux intégratifs dont l'intégration serait contrôlée (abs 2529).

Enfin, l'expression de microARNs est étudiée car ces derniers pourraient révéler des mécanismes de maladies particuliers. Ainsi, chez la souris Cpfl1 atteint d'une dystrophie des cônes, deux microARNs sont exprimés différenciellement entre les souris normales et les souris mutées : miRNA 183 et 376a. Leur expression peut être corrélée avec respectivement 4 et 8 ARN messagers qui sont réprimés (5989)

### **Cellules souches adultes**

Les cellules souches adultes obtenues à partir de la peau, ce qu'on appelle les iPS, continuent à faire l'objet de nombreux travaux. En effet, on peut théoriquement dériver à partir de ces cellules des photorécepteurs ou de l'EPR, qui pourraient ensuite être greffées sans provoquer de réaction immunologique puisqu'elles proviendraient du patient lui-même.

Il est toutefois peu vraisemblable qu'elles soient utilisées dans ce but parce que l'on n'est pas certain que leur patrimoine génétique n'est pas été altéré par le processus de dé-différenciation. A Harvard notamment, (Schepens Institute, abs 1233), des iPS adultes ont été implantées chez la souris. 25 ; 30 % des cellules expriment la rhodopsine (bâtonnets). Beaucoup des cellules forment des tumeurs (tératomes) lorsqu'elles sont greffées avant leur différenciation terminale. Par contre, greffées après leur différenciation, elles ne forment pas de tumeurs. En fait, ce qui fait tout leur intérêt, c'est de les utiliser soit pour valider une approche thérapeutique (c'est ce que nous faisons en ce moment dans notre laboratoire de Montpellier), soit pour rechercher des médicaments efficaces. C'est dans ce but que la firme Kobe medical industry au Japon (abs 447) a fait des cellules souches iPS à partir de patients souffrant de rétinite pigmentaire (RP) et ayant des mutations des gènes RHO, RDS, PAPI e RP1. Ces cellules souches sont ensuite dérivées en épithélium pigmentaire de la rétine (EPR). Les cellules souches iPS représentent donc un outil très puissant pour trouver de nouveaux médicaments

### **Cellules souches embryonnaires**

Les cellules souches embryonnaires, qui sont plus sûres, sont celles qui seraient plus volontiers utilisées pour produire des photorécepteurs à greffer. Le laboratoire d'Yvan Arsenijevic, à Lausanne Suisse, travaille sur l'utilisation de plusieurs facteurs afin de donner un environnement favorable à la différenciation de cellules souches.

### **Autres cellules souches**

Par ailleurs, des chercheurs étudient le follicule pileux (abs 1232) qui contient un bourgeon de cellules souches, à côté de la glande sébacée. Ce sont des cellules souches adultes qui peuvent se différencier en photorécepteurs en utilisant de l'acide rétinoïque et de la taurine, ou encore du milieu conditionné de photorécepteurs qui donne préférentiellement des cônes plutôt que des bâtonnets.

### **Thérapie cellulaire**

Le Dr Susan Binder poursuit ses expériences de transplantation d'EPR autologue (abs 449). Cela produit après transplantation des paquets de cellules pigmentées. Donc le contrôle du positionnement des cellules n'est pas acquis. Néanmoins, il semblerait qu'il y ait une amélioration dans 50 % des cas. A cause du mauvais état de la membrane de Bruch, le Dr Binder a aussi expérimenté une transplantation d'un patch comprenant la choroïde et l'EPR, cousu au laser et tamponné au silicone, ce dernier enlevé après 3 mois. Au final les résultats fonctionnels ne sont pas meilleurs et de plus il y a des complications liées à la fibrose et à la prolifération des bords du transplant. Les recherches sont faites sur une membrane de Bruch de remplacement, notamment à partir de nanofibres.

Le Dr Francis de Portland aux USA a implanté 47000 cellules dérivées de sang de cordon ombilical (qui contient des cellules souches) chez 7 patients ayant une RP très évoluée. Il n'y a pas eu de réaction immunogénique, mais aucun résultat n'a été donné. Deux patients sur 7 ont fait un décollement de rétine.

## **Thérapie pharmacologique**

Dans l'amaurose de Leber liée à des gènes du cycle visuel

Robert Koenekoop à Montréal a administré du rétinol 9-cis (nom de code QLT091001) à trois patients âgés de 5 à 14 ans qui ont la même mutation du gène LRAT, et dont l'acuité visuelle était de moins de 1/10. Ce gène code une protéine qui agit dans le même métabolisme que RPE65. Le rétinol 9-cis est un composé qui permet de remplacer le rétinol 11-cis absent en cas de mutation de RPE65 ou de LRAT. Il pourrait donc s'agir d'une solution alternative à la thérapie génique en cours d'essai actuellement pour RPE65.

Patient 1 : 10 ans. A partir du 2<sup>e</sup> jour, sa vision est passée à 2/10. Le champ visuel est passé de 30° à 70° 1 mois après, et 4 mois après le champ visuel était normal.

Patient 2 : 12 ans. Garçon ayant une maculopathie modérée avec quelques débris. L'acuité visuelle est montée à 1/20.

Patient 3 : Son acuité visuelle est passée de « voit la main bouger » à 1 lettre. Son champ visuel était indétectable et est devenu détectable, mais il reste en tunnel.

Ces résultats sont très encourageants, mais il faut néanmoins noter qu'aucun des patients n'a eu de modification de l'ERG au 7<sup>e</sup>me jour après le début du traitement. L'essai doit donc être enrichi d'examen objectifs avant de se prononcer sur l'efficacité de cette approche.

## **Dans les réduites pigmentaires**

Peter Humphries a introduit une idée novatrice. Les rétinites pigmentaires ont des causes génétiques extrêmement diverses. On commence à identifier des molécules à potentiel thérapeutique spécifiques de chaque gène, ou de chaque mécanisme physiopathologique, mais le problème est d'amener ces molécules au contact des photorécepteurs. On ne peut en effet les injecter de manière répétée dans l'œil car ces injections itératives représentent un traumatisme et un risque infectieux d'une part, et d'autre part on ne peut souvent pas les administrer par voie orale car ils ne franchissent pas la barrière hématorétinienne. L'idée de P. Humphries est donc de perméabiliser transitoirement la barrière avec un ARN contre la Claudine (un des composants des jonctions entre les cellules). Dans le modèle de la rétinite pigmentaire RP10 due à une enzyme déficiente pour la synthèse du GTP, l'ouverture de la barrière et l'administration d'AAG GTP permet de restaurer la fonction. L'ouverture répétée de la barrière pourrait ainsi être contrôlée par l'utilisation d'un shRNA contre la Claudine 5 transduit par un AAV2/9 inducible par la doxycycline.

## **Dans la maladie de Stargardt**

Des recherches visent à limiter la formation de lipofuscine dans l'EPR pour préserver la survie des cellules avec l'âge ou chez les patients atteints de dégénérescence maculaire avec accumulation de lipofuscine comme dans la maladie de Stargardt par exemple. Dans une étude pré-clinique, l'équipe du Dr. Schraermeyer à Tuebingen en Allemagne, a montré que le traitement de singes pendant un an avec du tetrahydro-pyridoether (THPE) par voie orale aboutit à une quasi élimination de la lipofuscine dans l'EPR que l'on retrouve dans des macrophages au voisinage de la membrane de Bruch.

compte des mouvements de l'œil. Cela indiquerait que la stimulation sous rétinienne est plus intéressante que la stimulation épi rétinienne.

### **Projet Boston Retinal Implant**

La version actuelle de l'implant a été testée chez le porc. La version suivante est développée en vue d'une implantation chez l'homme, elle permettra d'augmenter les capacités de mesures et de diagnostic sur l'implant (état du contact électrode/tissu, température locale) et le nombre d'électrodes. L'utilisation d'une couche de passivation en carbure de silicium amorphe est testée pour améliorer la biocompatibilité de l'implant.

Les cellules ganglionnaires de la rétine semblent réagir plus facilement à une stimulation au niveau du début de l'axone, que sur le soma ou sur la longueur de l'axone. D'autre part, il semble que pour un signal de stimulation de forme sinusoïdale, la valeur de la fréquence ait une influence directe sur le type de cellules stimulables : les cellules bipolaires répondent à une fréquence inférieure à 25 Hz, les cellules ganglionnaires de la rétine à 100 Hz. Cela est peut être une piste pour améliorer la sélectivité de la stimulation électrique.

Y.A Chow (Rush University, Illinois) observe l'existence d'un effet neurotrophique pendant plus de 7 ans chez les patients implantés par un réseau de photodiodes (sans alimentation extérieure). Le projet EPIRET3 (RWTH University, Aachen ; University of Duisburg-Essen, Essen (Allemagne) a permis l'implantation pendant 4 semaines de 6 patients. Après explantation, les examens de l'œil ne révèlent pas d'anomalies, ce qui permet de valider la technique d'implantation et de fixation sur la rétine.

### **Autres approches**

#### **L'approche par génie génétique est toujours activement étudiée :**

- La photosensibilisation des cellules ganglionnaires de la rétine par une nouvelle génération de neuromodulateurs optiques (excitateurs et inhibiteurs) est étudiée. Les résultats in vitro montrent de performances meilleures en termes de seuil de sensibilité (par exemple, le seuil de stimulation pour oChIEf est atteint pour une intensité lumineuse 10 fois plus faible que pour hChR2 (soit  $0.2\text{mW}/\text{cm}^2$ )), de dynamique et de temps de réponse.
- Certaines équipes se concentrent sur la possibilité de cibler précisément un type de cellules rétinienne lors de la transfection.
- L'expression de la eNpHR dans les cônes altérés par la rétinite pigmentaire permet de redonner à ces cônes une sensibilité à la lumière rouge, ce qui conduit à un traitement de l'information dans la rétine proche du traitement naturel des essais sur deux souris modèles de rétinite pigmentaire on montré des voies ON et OFF au niveau des cellules ganglionnaires de la rétine, et l'activité au niveau du cortex sensible à la direction du stimulus lumineux.

Des explants de rétines humaines ont également montré une photosensibilisation. Cependant, les niveaux de seuil de stimulation restent très élevés ( $10^{12}$  photons  $\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

La photosensibilisation d'une cellule rétinienne peut aussi se faire en couplant une molécule photoisomérisable à un canal ionique naturellement présent : c'est le cas de la molécule AAQ, couplée à un canal  $\text{K}^+$ , qui permet d'obtenir des réponses à la lumière (380 nm pour les cellules ganglionnaires de la rétine ON et 500 nm pour les cellules ganglionnaires de la rétine OFF), lié à la fois à l'excitation des cellules ganglionnaires de la rétine CGR et à celles des neurones pré-synaptiques. Les souris modèles de rétinite pigmentaire retrouvent le réflexe pupillaire, cet effet durant pendant environ 24 h.

La stimulation des neurones par voie thermique est également étudiée : une équipe d'Israël propose de déposer des particules de carbone (diamètre 10 nm) sur une culture de cellules ganglionnaires de la rétine et de chauffer ces particules par des impulsions laser dans le visible : une augmentation localisée de  $5^{\circ}\text{C}$  entraîne l'apparition de réponses calciques.

Nous constatons que les Recherches sont de plus en plus nombreuses et dans tous les pays du monde. Ce n'est pas le moment de baisser les bras.

Ne perdons ni courage ni espoir, au contraire, redoublons d'efforts, d'initiatives, faites des actions.

Nous rappelons que des timbres auto collants sont disponibles par planche de 24.

Achetez des planches, vendez des timbres.

**C'est l'union qui fait la force.**

Merci également aux bénévoles qui ont la gentillesse d'apporter leur concours chaque fois que nous avons fait appel à eux.