

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR  
CAROLINE LUPIEN

MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE CULTURE  
DES CELLULES DE MÜLLER DE RÉTINES HUMAINES  
ET RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DU GÈNE  
DE LA GFAP DANS CES CELLULES

SEPTEMBRE 2000

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## REMERCIEMENTS

**Youppi!** Enfin terminé, et oui cette maîtrise n'a pas été des plus faciles, un certain nombre d'imbroglis, de malchances et bien sûr la lenteur de notre matériel biologique à se diviser ont tous contribué à ralentir ma capacité à produire des résultats. Maintenant que j'ai réussi, le temps est venu de remercier ceux qui ont contribué de près ou de loin à la concrétisation de ce mémoire.

En premier lieu, je désire remercier mes parents qui m'ont toujours supporté dans mes choix, malgré qu'ils se demandent parfois pourquoi je choisis toujours les chemins les plus sinueux. Probablement parce que la science est parsemée d'embûches et que je suis à me former un caractère en vue de ma future carrière en recherche.

Je voudrais également dire un merci spécial à mon directeur de recherche, le Dr. Christian Salesse. Il a cru en mon potentiel et également en la faisabilité de ce projet de recherche que j'avais imaginé au cours de mon projet de fin d'étude lors de mon baccalauréat. De plus, il a toujours été présent pour me remonter le moral. Lors de mes creux les plus bas ses encouragements et son expérience m'ont aidé à reprendre confiance. Je suis heureuse de poursuivre un doctorat sous sa direction.

Je veux également profiter de l'occasion pour remercier mon co-directeur de recherche, le Dr. Sylvain Guérin ainsi que toute son équipe de recherche et en particulier son assistant de recherche, Steeve Leclerc qui m'a appris toutes les techniques de biologie moléculaire nécessaires à la réalisation de ce projet de recherche.

De plus, je désire remercier la Banque d'Yeux Nationale du CHUL qui nous a permis d'obtenir les yeux des donneurs, ainsi que le Dr. Alain Rousseau pour sa participation au projet sur le mélanome uvéal.

Je remercie aussi tous mes collègues de laboratoire pour leurs coups de pouce et leurs encouragements.

**MERCI!**

## RÉSUMÉ

Les cellules de Müller sont le type prédominant de cellules gliales dans la rétine. Ces cellules servent de soutien à la rétine en plus d'être très impliquées dans le développement et la survie des neurones. Lors de blessures ou de pathologies oculaires, les cellules de Müller vont s'hypertrophier et proliférer pour former des cicatrices gliales. Une protéine de la classe des filaments intermédiaires, la protéine acide fibrillaire de la glie (GFAP), est présente dans les cellules de Müller lors de la formation de ces cicatrices. Toutefois, en absence de blessures ou de pathologies, cette protéine est absente ou localisée en faible quantité à la base des cellules de Müller.

La GFAP est une protéine qui a été étudiée surtout au niveau des astrocytes du cerveau chez plusieurs espèces animales, dont l'homme. Plusieurs études ont porté sur la régulation transcriptionnelle de cette protéine. Cependant, dans les cellules de Müller humaines, seules des études de biologie cellulaire ont été réalisées.

Le but de ce travail a été d'étudier la régulation transcriptionnelle de la GFAP dans les cellules de Müller humaines. Pour ce faire, nous avons élaboré un protocole de mise en culture de ces cellules chez l'homme. Nous avons par la suite procédé à la caractérisation

du phénotype de ces cellules par immunofluorescence indirecte, à l'aide de marqueurs spécifiques des cellules de Müller. Ces expériences nous ont permis d'identifier les cellules en culture comme étant des cellules de Müller. Par cette méthode, nous avons aussi observé la présence de la GFAP dans les cellules de Müller humaines. Par la technique d'immunobuvardage de type Western, nous avons localisé la GFAP comme étant associée aux membranes des cellules de Müller. La technique de RT-PCR nous a permis d'observer l'augmentation de l'expression de l'ARNm de la GFAP dans les cellules de Müller suite à différents passages en culture. Par la suite, à l'aide de différentes constructions de plasmides comportant différents fragments du promoteur de la GFAP, nous avons procédé à des études de transfections transitoires. Les résultats obtenus nous permettent d'observer trois zones de régulation importantes pour l'activité du promoteur GFAP dans les cellules de Müller humaines. Ces zones correspondent aux régions suivantes : -132pb à -205pb, -205pb à -2163pb et +47pb à +88pb. Ces régions sont différentes de celles qui ont été observées pour l'activité de la GFAP dans les astrocytes.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ii
RÉSUMÉ.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiv
CHAPITRE 1 .....	1
INTRODUCTION.....	1
1.1 L’œil .....	1
1.1.1 Anatomie du globe oculaire .....	1
1.2 La rétine .....	4
1.2.1 Emplacement et fonctions de la rétine .....	4
1.2.2 Les différentes couches de la rétine et leur contenu.....	7
1.2.2.1 La rétine nerveuse .....	9
1.2.3 Les relations entre les différentes couches de la rétine .....	9
1.3 Les cellules de Müller.....	10
1.3.1 Rôles et emplacement des cellules de Müller .....	10
1.3.2 Implication des cellules de Müller dans les pathologies rétinienne .....	15
1.4 Le cytosquelette et les filaments intermédiaires .....	17
1.4.1 Le cytosquelette .....	17
1.4.2 Les filaments intermédiaires .....	18
1.4.2.1 Les différentes classes de filaments intermédiaires .....	19
1.4.2.2 Les différents constituants des filaments intermédiaires.....	21
1.4.2.3 L’assemblage des filaments intermédiaires .....	23
1.4.2.4 Les différentes fonctions des filaments intermédiaires .....	25
1.5 La protéine acide fibrillaire de la glie.....	26
1.5.1 La structure de la GFAP .....	27
1.5.2 Le promoteur de la GFAP.....	28

1.5.2.1 Les régions régulatrices du gène de la GFAP .....	31
1.5.3 Les différents rôles de la GFAP .....	33
1.5.4 Expression de la GFAP dans les cellules de Müller.....	34
1.6 Implication de la GFAP dans certaines pathologies rétinienne.....	37
1.6.1 Le décollement de la rétine.....	37
1.6.1.1 La GFAP et le décollement de rétine .....	39
1.6.2 La rétinopathie diabétique .....	42
1.6.2.1 La GFAP et la rétinopathie diabétique .....	45
1.6.3 Le mélanome uvéal .....	47
1.6.3.1 La GFAP et le mélanome uvéal .....	49
1.7 Objectifs spécifiques des travaux de recherche de ce mémoire .....	50
CHAPITRE 2 .....	51
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	51
2.1 Produits utilisés .....	51
2.2 Cultures cellulaires .....	52
2.2.1 Prélèvement et culture des cellules de Müller chez le rat.....	52
2.2.2 Prélèvement et culture des cellules de Müller chez l'humain .....	54
2.2.3 Culture de lignées cellulaires.....	54
2.3 Caractérisation des cultures cellulaires.....	55
2.3.1 Principe de la technique d'immunofluorescence indirecte .....	55
2.3.2 Préparation des cellules pour les mesures d'immunofluorescence indirecte....	55
2.4 Immunohistochimie de coupes de rétine de patients souffrant de mélanome uvéal.....	57
2.4.1 Préparation des coupes de rétine pour l'immunohistochimie .....	58
2.5 Détection de la protéine GFAP dans différents types cellulaires.....	59
2.5.1 Principe de la méthode d'immunobuvardage de type Western.....	59
2.5.2 Préparation des extraits pour l'immunobuvardage de type Western.....	59
2.5.3 Électrophorèse et immunobuvardage de type Western.....	61
2.6 Mesure semi-quantitative de l'ARNm de la GFAP par RT-PCR.....	62
2.6.1 Préparation des extraits d'ARNm pour la réaction RT-PCR.....	63



2.6.2	La réaction RT .....	63
2.6.3	La réaction PCR .....	64
2.7	Préparation des plasmides de la GFAP pour les transfections transitoires.....	65
2.7.1	Maxipréparation de plasmides sur un gradient de concentration de CsCl .....	65
2.8	Transfections transitoires des plasmides de la GFAP dans les cellules de Müller .....	68
2.8.1	Transfections transitoires par la méthode du précipité de phosphate de calcium.....	69
2.8.1.1	Dosage de l'activité CAT par extraction en phase organique.....	72
2.8.1.2	Dosage de l'hormone de croissance humaine .....	74
CHAPITRE 3 .....		75
RÉSULTATS ET DISCUSSION.....		75
3.1	Cultures des cellules de Müller de rats .....	75
3.2	Cultures des cellules de Müller humaines .....	77
3.3	Caractérisation des cultures cellulaires.....	81
3.4	Présence de la GFAP dans les cellules de Müller humaines .....	83
3.5	Présence de la GFAP dans d'autres types cellulaires.....	83
3.6	La localisation cellulaire de la GFAP dans les cellules de Müller par immunobuvardage de type Western .....	85
3.7	Mesure semi-quantitative de l'ARNm de la GFAP par RT-PCR.....	88
3.8	Transfections transitoires avec les cellules de Müller humaines .....	89
CHAPITRE 4 .....		99
PERSPECTIVES DE RECHERCHE.....		99
4.1	Présence de la GFAP dans le mélanome uvéal .....	99
4.2	Étude de l'expression de la GFAP dans les cellules de Müller humaines .....	101
4.2.1	Identification des protéines nucléaires se liant au promoteur de la GFAP... ..	101
4.2.2	Les différents facteurs qui influencent l'expression de la GFAP.....	102
4.3	Implication de la GFAP dans la rétinopathie diabétique .....	105
4.4	Effet du VEGF et des Maps kinases sur l'expression de la GFAP au cours de la rétinopathie diabétique.....	108

4.4.1 Effet du VEGF .....	108
4.4.2 Effet des Maps kinases .....	111
4.5 Implication du glutamate dans la régulation de l'expression de la GFAP.....	114
BIBLIOGRAPHIE.....	118

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. Coupe transversale du globe oculaire.....	2
FIGURE 2. La rétine.....	5
FIGURE 3. Les différentes couches de la rétine.....	8
FIGURE 4. Cellules de Müller.....	11
FIGURE 5. Structure des filaments intermédiaires.....	22
FIGURE 6. Assemblage d'un filament intermédiaire.....	24
FIGURE 7. Éléments qui activent l'expression d'un gène.....	30
FIGURE 8. Expression de la GFAP dans les cellules de Müller.....	35
FIGURE 9. Les étapes menant à un décollement de rétine .....	38
FIGURE 10. La rétinopathie diabétique .....	44
FIGURE 11. Les différentes constructions de plasmides GFAP fournis par le Dr. M. Brenner.....	66
FIGURE 12. Principe de transfection transitoire par la méthode du précipité de phosphate de calcium.....	71

FIGURE 13. Photographies en contraste de phase de cellules de Müller de rat prises avec un objectif de 10X.....	76
FIGURE 14. Photographies en contraste de phase de cellules de Müller humaines prises avec un objectif de 10X.....	78
FIGURE 15. Comparaison entre les cellules de Müller de rats et humaines.....	79
FIGURE 16. Caractérisation du phénotype des cellules de Müller en culture par la technique d'immunofluorescence indirecte.....	82
FIGURE 17. Présence de la GFAP dans les cellules de Müller humaines détectée par immunofluorescence indirecte.....	84
FIGURE 18. Présence de la GFAP dans les différentes lignées cellulaires utilisées.....	86
FIGURE 19. Résultats en immunobuvardage de type Western.....	87
FIGURE 20. Mesure semi-quantitative de l'ARNm de la GFAP par RT-PCR.....	90
FIGURE 21. Résultats des transfections des cellules de Müller humaines avec les plasmides pGfaCAT.....	94
FIGURE 22. Résultats des transfections des cellules 293T avec les plasmides pGfaCAT.....	96
FIGURE 23. Résultats des transfections des cellules GH <sub>4</sub> C <sub>1</sub> avec les plasmides pGfaCAT .....	97

FIGURE 24. Détection de la GFAP par immunohistochimie sur une coupe de rétine provenant d'un patient atteint de mélanome uvéal versus une coupe de rétine non pathologique.....	100
FIGURE 25. Photographies en contraste de phase avec un objectif de 10X, de cellules de Müller de patients normaux et de patients diabétiques.....	107

## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. Les différentes classes de filaments intermédiaires.....	20
TABLEAU 2. Compilation des résultats des valeurs CAT/hGH obtenues en transfection transitoire pour les plasmides pGfaCAT dans les cellules de Müller ainsi que deux lignées cellulaires.....	93

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

APS : ammonium persulfate

bFGF : « basic fibroblast growth factor »

CAT : chloramphénicol acétyl transférase

CNTF : « ciliary neurotrophic growth factor »

CRE : élément de réponse à l'AMPc

DAG : diacylglycérol

DMEM : « dulbecco's modified eagle medium »

DTT : dithiothréitol

ERK : « extracellular signal regulated kinases »

FBS : « fetal bovine serum »

GFAP : protéine acide fibrillaire de la glie

GSH : glutathion

hGH : hormone de croissance humaine

IL-1 : interleukine 1

JNK : « c-Jun N-terminal kinases »

MPP : « massive periretinal proliferation »

NO : oxyde nitrique

p38 : p38 kinases

PCR : « polymerase chain reaction »

PKC : protéine kinase C

PLC $\gamma$  : phospholipase C $\gamma$

PMSF : phénylméthylsulfonyl fluorure

PVP : polyvinylpyrrolidone

RPE : épithélium pigmentaire rétinien

RT-PCR : « reverse transcriptase-polymerase chain reaction »

SDS : sodium dodécyl sulfate

TGF- $\beta$ 1 : « transforming growth factor  $\beta$ 1 »

TNF- $\alpha$  : « tumor necrosis factor »

VEGF : « vascular endothelial growth factor »



## CHAPITRE 1

### INTRODUCTION

#### 1.1 L'œil

L'œil est un des organes les plus complexes et les plus sophistiqués du corps humain. Soixante-dix pourcent des récepteurs sensoriels de l'organisme sont situés dans les yeux (Ali et Klyne, 1986; Dowling, 1987; Marieb et Laurendeau, 1992; Tortora et Grabowski, 1994). Les photorécepteurs captent et encodent, par transduction, les motifs formés par la lumière dans notre environnement. Le tractus optique, qui achemine les messages codés sous forme d'influx nerveux des yeux au cortex cérébral, contient plus d'un million de neurofibres. Seuls les faisceaux cortico-spinaux régissant l'ensemble des muscles volontaires contiennent plus de neurofibres que ce tractus. Le cerveau décode les influx nerveux qui arrivent des yeux et élabore les images du monde qui nous entoure (Marieb et Laurendeau, 1992). Du point de vue anatomique, le globe oculaire peut être divisé en trois couches : la tunique fibreuse (sclérotique), la tunique vasculaire (choroïde, corps ciliaire et iris) et la rétine ou tunique nerveuse (Figure 1).

##### 1.1.1 Anatomie du globe oculaire

La tunique fibreuse est la membrane externe du globe oculaire; elle est formée d'une partie postérieure, la sclérotique, et d'une partie antérieure, la cornée (Figure 1). La cornée est une couche transparente et non vascularisée. En raison de sa forme incurvée, elle contribue à focaliser les rayons lumineux. La sclérotique est une couche blanche de tissu fibreux dense qui enveloppe tout le globe oculaire, sauf la cornée. La sclérotique donne sa forme au globe oculaire; elle le rend plus rigide et protège ses parties internes. Sa face

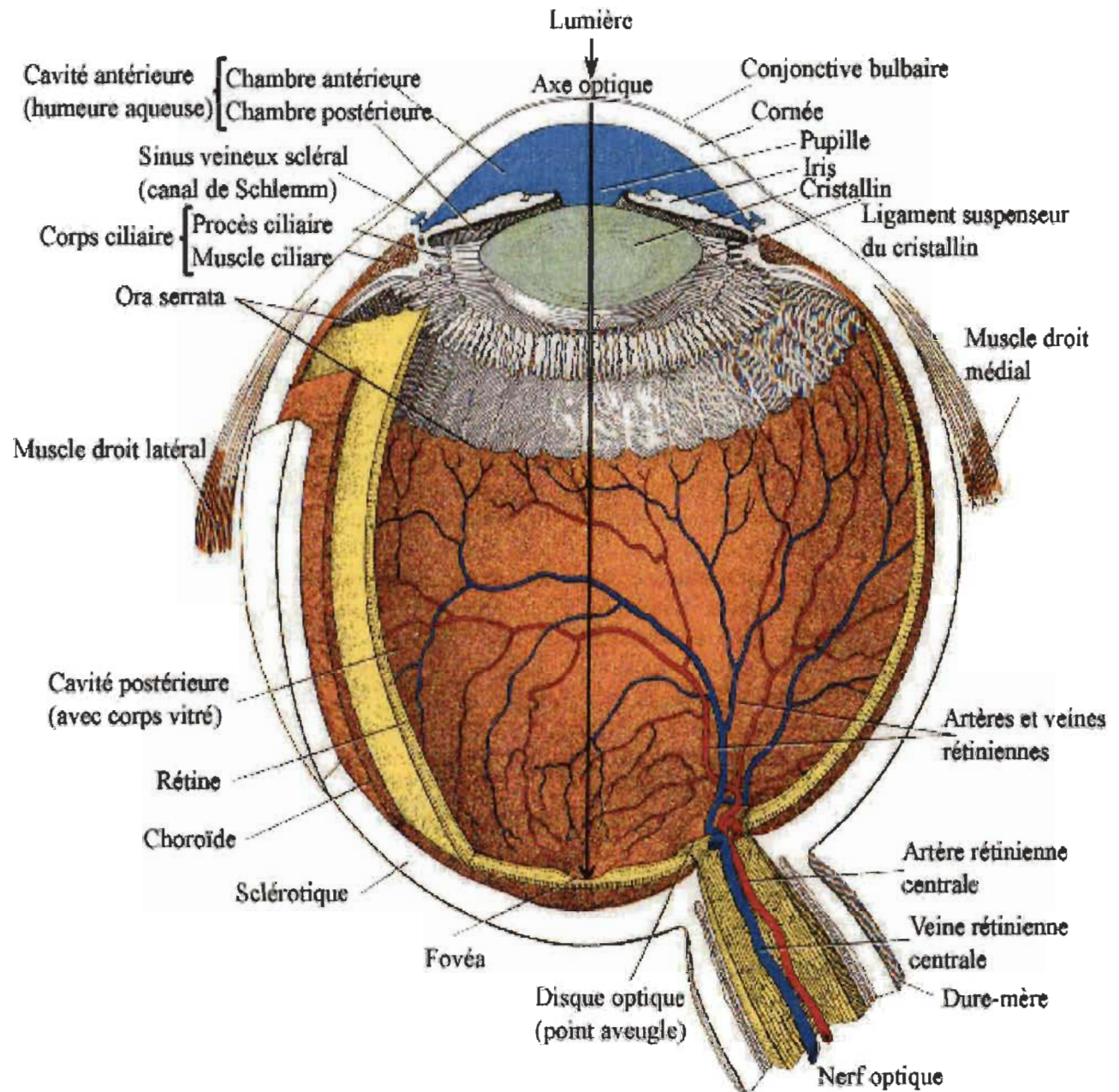


Figure 1. Coupe transversale du globe oculaire (Tortora et Grabowski, 1994).

postérieure est percée par le foramen optique qui encercle le nerf optique (Figure 1) (Marieb et Laurendeau, 1992; Tortora et Grabowski, 1994).

La tunique vasculaire, la couche moyenne du globe oculaire, est appelée uvée. Elle est formée de trois parties : la choroïde, le corps ciliaire et l'iris. La partie postérieure de la tunique vasculaire, la choroïde, est richement vascularisée et tapisse presque toute la face interne de la sclérotique. Ses vaisseaux sanguins nourrissent la surface postérieure de la rétine. Les mélanocytes, qui produisent le pigment foncé appelé mélanine, donnent à la choroïde sa couleur brun foncé. Dans la partie antérieure de la tunique vasculaire, la choroïde donne naissance au corps ciliaire qui est la région la plus épaisse de la tunique vasculaire (Marieb et Laurendeau, 1992; Tortora et Grabowski, 1994). L'iris est la partie colorée du globe oculaire. Il est composé de fibres musculaires lisses radiaires et circulaires qui permettent de régler l'entrée de la lumière dans la cavité postérieure du globe oculaire par la pupille. Lorsque l'œil est soumis à une lumière vive, la stimulation des fibres nerveuses parasympathiques permettent la contraction des muscles circulaires de l'iris pour diminuer le diamètre de la pupille (Berson, 1993; Marieb et Laurendeau, 1992; Tortora et Grabowski, 1994). En revanche, lorsque la lumière est faible, ces fibres nerveuses stimulent la contraction des muscles radiaires de l'iris et accroissent le diamètre de la pupille. Bien que l'on trouve des iris de différentes couleurs, tous ne contiennent qu'un pigment brun. Si le pigment est abondant, les yeux paraissent bruns ou noirs. Si le pigment est peu abondant et circonscrit à la face postérieure de l'iris, les parties non pigmentées diffusent les longueurs d'onde les plus courtes de la lumière et les yeux paraissent bleus, verts ou gris (Marieb et Laurendeau, 1992).

La troisième tunique de l'œil, l'enveloppe la plus interne, la rétine, ne couvre que les trois quarts postérieurs de l'œil et elle correspond au début de la voie nerveuse visuelle (Marieb et Laurendeau, 1992; Tortora et Grabowski, 1994). La rétine sera décrite plus en détail dans la prochaine section de ce mémoire (voir section 1.2).

## 1.2 La rétine

### 1.2.1 Emplacement et fonctions de la rétine

La rétine, qui est considérée comme une extension du cerveau, est un tissu nerveux et délicat qui reçoit les images des objets extérieurs. Sa surface externe est en contact avec le tractus choroïdien tandis que sa surface interne est en contact avec le corps vitré. La rétine tapisse les deux tiers postérieurs du globe oculaire (Figure 1). À l'arrière de l'œil, elle est en continuité avec le nerf optique et elle diminue graduellement en épaisseur, de l'arrière vers l'avant, pour se continuer aussi loin que le corps ciliaire où elle semble se terminer en une bordure dentelée, l'ora serrata (Marieb et Laurendeau, 1992). C'est à cet endroit que la rétine est fermement attachée à la choroïde. C'est la raison pour laquelle les décollements de rétine ne s'étendent pas au-delà de l'ora serrata (Stein et al., 1992). L'autre endroit où la rétine est bien ancrée est la circonférence du nerf optique. La couche postérieure de la rétine est appelée épithélium pigmentaire (RPE) (Figure 2), qui est bien attaché à la choroïde. Les décollements de rétine sont le résultat d'un clivage entre les photorécepteurs et cette couche postérieure d'épithélium pigmentaire (Stein et al., 1992).

La fovéa (tache jaune) est une petite dépression dans la rétine; elle se situe dans l'axe optique de l'œil, ce qui confère une acuité visuelle supérieure (Figure 1). Dans cette

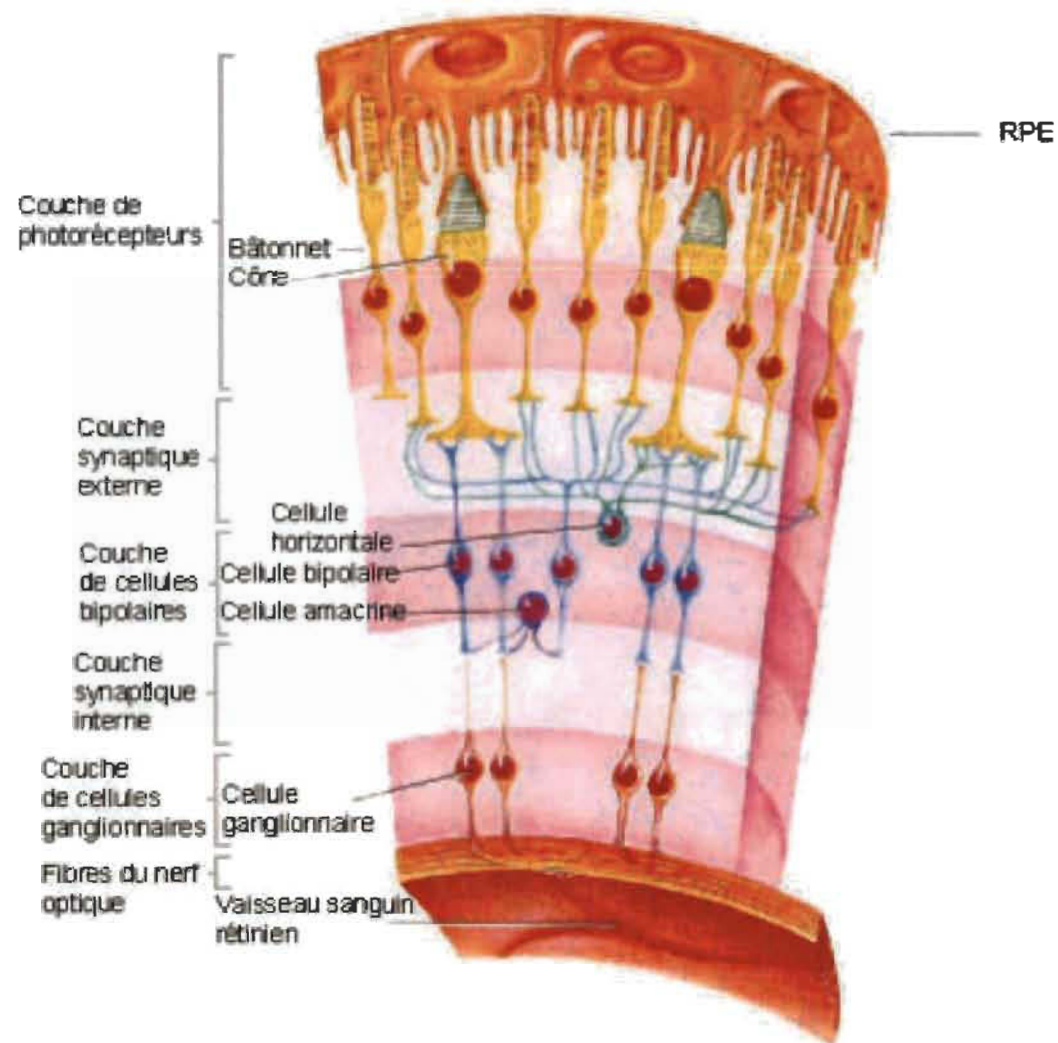


Figure 2. La rétine (Tortora et Grabowski, 1994).

région de la rétine, on retrouve en très grande majorité des cônes et très peu de bâtonnets. La rétine présente une autre région spécialisée, appelée disque optique, qui est l'endroit où le nerf optique émerge de l'oeil. On l'appelle aussi la tache aveugle parce que cette région rétinienne n'est pas sensible à la lumière (Figure 1) (Marieb et Laurendeau, 1992; Tortora et Grabowski, 1994). L'artère rétinienne centrale, une ramification de l'artère ophtalmique, et la veine rétinienne centrale sont rassemblées près du nerf optique. Les ramifications de l'artère rétinienne centrale s'étalent en éventail pour irriguer la surface antérieure de la rétine alors que la veine rétinienne centrale draine le sang de la rétine par le disque optique (Stein et al., 1992).

La rétine est formée de l'épithélium pigmentaire (partie non visuelle) et d'une partie neurale (partie visuelle) (Figure 2). L'épithélium pigmentaire comprend une monocouche de cellules épithéliales qui contiennent de la mélanine. Il se situe entre la choroïde et la partie neurale de la rétine. La mélanine de la choroïde et de l'épithélium pigmentaire absorbe les rayons lumineux épars, ce qui prévient la réflexion et la dispersion de la lumière dans le globe oculaire. Cela permet d'assurer la netteté de l'image produite sur la rétine par la cornée et le cristallin (Marieb et Laurendeau, 1992; Tortora et Grabowski, 1994). La couche nerveuse de la rétine est transparente. On dit souvent qu'elle équivaut en fait à une émergence des cellules nerveuses du cerveau. Elle contient des millions de photorécepteurs (bâtonnets et cônes) qui sont responsables de la transduction de l'énergie lumineuse en influx nerveux. Il est important de noter que la rétine traite largement les données visuelles avant de transmettre des influx nerveux au thalamus qui les transmet ensuite au cortex visuel primaire (Marieb et Laurendeau, 1992; Tortora et Grabowski, 1994).

### 1.2.2 Les différentes couches de la rétine et leur contenu

Au niveau histologique, la rétine est composée de dix couches différentes incluant l'épithélium pigmentaire (Dowling, 1987). Structuellement et fonctionnellement, la rétine se divise en deux parties (Figure 3) :

- 1- Un épithélium pigmentaire qui représente une monocouche de cellules de forme hexagonale liée à la membrane de Bruch.
- 2- Une rétine nerveuse qui est constituée de six types de cellules : des photorécepteurs (bâtonnets et cônes), des cellules bipolaires, amacrines, horizontales, ganglionnaires et interplexiformes. On y retrouve également les cellules de Müller qui sont les principales cellules gliales de la rétine et qui s'étendent de la membrane limitante interne de la rétine à la membrane limitante externe, où elles entourent le segment interne des photorécepteurs (Marieb et Laurendeau, 1992; Tortora et Grabowski, 1994).

La rétine des vertébrés est composée d'un arrangement ordonné de différents types de cellules nerveuses et gliales. Les cellules gliales sont représentées par trois classes principales. Il y a les astrocytes et les cellules de la microglie qui se retrouvent dans la couche de fibres nerveuses, dans la couche plexiforme interne ainsi que dans la couche plexiforme externe. Le troisième type de cellules gliales, appelées cellules de Müller, s'étendent sur toute l'épaisseur de la rétine, de la membrane limitante interne à la membrane limitante externe (Ali et Klyne, 1986; Dowling, 1987).

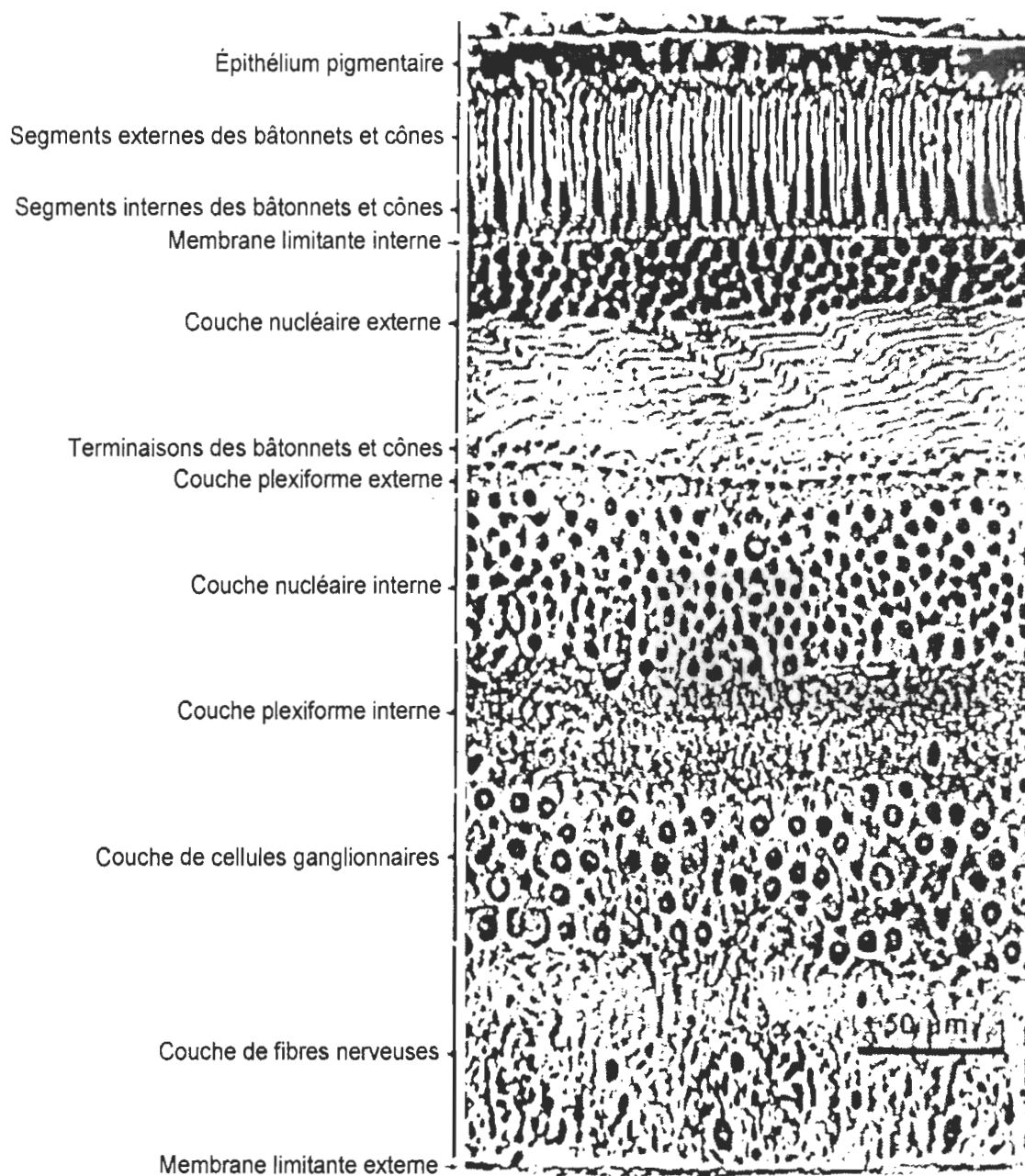


Figure 3. Les différentes couches de la rétine (Dowling, 1987).



### 1.2.2.1 La rétine nerveuse

Cette portion de la rétine est divisée en deux couches. La couche nucléaire externe contient des cellules spécialisées comme les bâtonnets et les cônes qui sont les photorécepteurs (Figure 2). Ces cellules se distinguent morphologiquement des autres types de cellules. En effet, les photorécepteurs se composent d'un segment externe, d'un segment interne, d'un noyau et d'une synapse. Les termes cônes et bâtonnets proviennent initialement de la forme de leurs segments externes. Les segments externes sont particulièrement importants parce que c'est dans leur membrane que loge le pigment visuel. Les bâtonnets opèrent à de faibles intensités lumineuses et les cônes à des intensités lumineuses supérieures, ces derniers étant, de plus, responsables de la vision des couleurs (Berman, 1991).

La couche nucléaire interne est composée de 4 types de cellules. Les cellules bipolaires jouent un rôle important au niveau de l'acuité visuelle. Les cellules horizontales se retrouvent en grand nombre dans la portion de la rétine où le ratio entre les bâtonnets et les cônes est élevé. Les cellules amacrines sont les moins bien connues, elles sont nombreuses et plus diversifiées que les cellules horizontales. C'est dans la catégorie des cellules ganglionnaires qu'on retrouve les cellules de Müller (Figure 2) (Buser et Imbert, 1987; Dowling, 1987).

### 1.2.3 Les relations entre les différentes couches de la rétine

Généralement, les bâtonnets et les cônes se trouvent côte à côte dans la rétine; cependant, il y a des exceptions. Les bâtonnets et les cônes font synapse avec les cellules

bipolaires et celles-ci à leur tour avec les cellules ganglionnaires. Les cellules ganglionnaires donnent naissance aux fibres nerveuses qui parcourent le nerf optique (Figure 2) (Tortora et Grabowski, 1994). Les cellules ganglionnaires constituent le dernier type de cellules auxquelles est transmise l'impulsion nerveuse avant de quitter la rétine. Les dendrites des cellules ganglionnaires et, dans une moindre mesure, des cellules bipolaires, peuvent s'arboriser considérablement, de telle sorte que chaque cellule peut être influencée par l'activité d'un grand nombre de bâtonnets et de cônes. Des interactions latérales importantes ont également lieu grâce aux cellules horizontales et aux cellules amacrines (Figure 2) (Dowling, 1987). Les cellules ganglionnaires et amacrines répondent aux stimuli lumineux par des potentiels d'action de type tout ou rien tandis qu'au niveau des autres cellules de la rétine, les réponses sont des variations lentes et graduées du potentiel membranaire, sans véritable potentiel d'action (Tortora et Grabowski, 1994). Les structures rétinienne sont retenues ensemble par un système de fibres de support connues sous le nom de cellules de Müller (Berman, 1991). Les extrémités de ces fibres forment un réseau criblé au travers duquel passent les photorécepteurs (membrane limitante externe). La partie interne des cellules de Müller se déploie en pyramides dont les bases se trouvent en contact les unes avec les autres et forment une mosaïque continue (membrane limitante interne) (Figure 4A).

### 1.3 Les cellules de Müller

#### 1.3.1 Rôles et emplacement des cellules de Müller

Les cellules de Müller ont été pour la première fois découvertes par Heinrich Müller en 1851 et elles ont été caractérisées en 1892 par Ramón y Cajal (Robinson et Dreher, 1990).

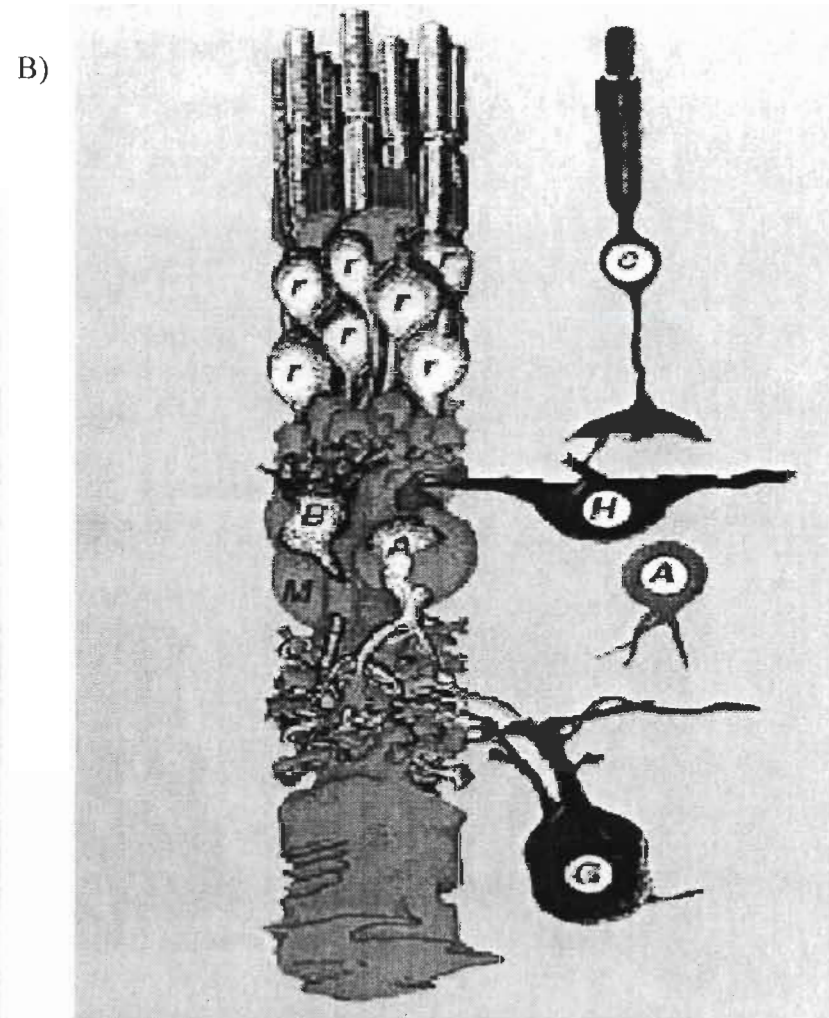
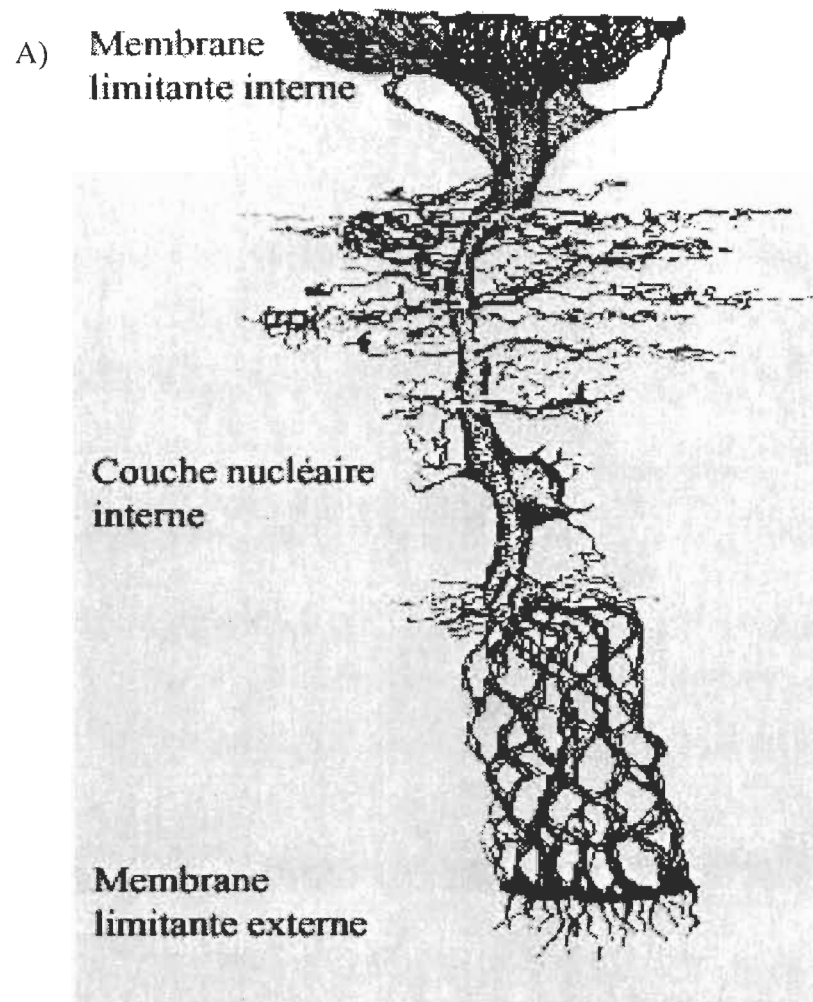


Figure 4. Cellules de Müller. A) Structure d'une cellule de Müller, le noyau se trouve dans la couche nucléaire interne et les deux prolongements s'étendent pour former les membranes limitantes interne et externe. B) La cellule de Müller en relation avec les autres cellules de la rétine : A= cellule amacrine, B= cellule bipolaire, G= cellule ganglionnaire, H= cellule horizontale, M= cellule de Müller et r = bâtonnet (Reichenbach et Robinson, 1995).

Les cellules de Müller sont le type prédominant de cellules gliales dans la rétine des vertébrés. La fonction de ces cellules n'est pas encore entièrement comprise, mais elles serviraient à maintenir l'intégrité structurelle de la rétine. Elles forment le réseau qui supporte l'organisation des différentes couches de la rétine. Leur corps cellulaire a une forme hexagonale et possède une densité plus grande que les autres noyaux. Il est localisé dans la couche nucléaire interne et donne naissance à deux prolongements, l'un s'étendant près de la rétine interne et l'autre à proximité de la rétine externe (Figures 3 et 4A). Ensemble, ces deux prolongements couvrent presque toute l'épaisseur de la rétine et sont étroitement liés à la membrane qui entoure les vaisseaux sanguins (Hollander et al., 1991). En s'étendant, ils forment la membrane limitante interne et la membrane limitante externe qui séparent le corps vitré de l'épithélium pigmentaire. De petites extensions traversent la membrane limitante externe et entourent le segment interne des bâtonnets et des cônes (Figure 4B). En contribuant aux membranes limitantes interne et externe, les cellules de Müller isolent la rétine de l'environnement externe (Figures 4A et B). Les autres points d'entrée dans la rétine pour les nutriments sont liés aux prolongements des cellules de Müller et favorisent le passage de molécules, incluant les ions, entre l'espace sub-rétinien et le vitré. Les cellules de Müller peuvent exercer un degré de contrôle important sur la composition de l'environnement extracellulaire (Reichenbach et Robinson, 1995).

Le fait que les cellules de Müller soient la forme prédominante de cellules gliales dans la rétine externe suggère qu'elles sont requises pour exécuter différentes tâches normalement accomplies par différents types de cellules gliales. En effet, elles assument plusieurs des

fonctions des astrocytes et des oligodendrocytes, qui agissent dans d'autres régions du système nerveux central. De ce fait, les cellules de Müller sont responsables d'un grand nombre de fonctions et, sans elles, la rétine externe ne serait pas fonctionnelle (Reichenbach et Robinson, 1995).

Les cellules de Müller sont impliquées dans de nombreuses interactions, tant au niveau des autres cellules de la rétine que des neurones et des vaisseaux sanguins. Ces cellules sont également impliquées dans des interactions métaboliques avec les photorécepteurs et d'autres cellules de la rétine. En effet, les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires obtiennent tout leur glutamate, le neurotransmetteur le plus fréquent dans la rétine, sous forme de glutamine par l'action de la glutamine synthétase, une enzyme localisée exclusivement dans les cellules de Müller de la rétine (Reichenbach et Robinson, 1995). Une inhibition de cette enzyme chez le lapin cause une perte complète d'activité nerveuse, démontrant ainsi le rôle crucial joué par les cellules de Müller dans la neurotransmission rétinienne (Linser et al., 1984; Newman, 1996; Reichenbach et Robinson, 1995).

Les cellules de Müller reçoivent leurs nutriments de la circulation sanguine rétinienne et nourrissent à leur tour les neurones rétiniens (Shichi, 1983). Elles sont donc des partenaires des neurones. En effet, elles leur fournissent des produits du métabolisme anaérobie pour aider leur métabolisme aérobie. En contrepartie, les cellules de Müller reçoivent des neurones, du dioxyde de carbone et de l'ammonium provenant du cycle tricarboxylique acide. De plus, elles jouent un rôle de protection en éliminant les substances neuroactives qui pourraient modifier la transduction des signaux pour les neurones. Elles sont

impliquées dans le développement et la survie des neurones. Elles permettent également d'isoler les neurones des interférences chimiques et électriques (Reichenbach et Robinson, 1995). De plus, les cellules de Müller sont considérées comme une première source de glycogène pour les neurones de la rétine. En effet, elles convertissent le glucose en glycogène et ce processus est stimulé par l'insuline (Poitry-Yamate et Tsacopoulos, 1991). Ces cellules sont aussi la source principale d'enzymes glycogénolytiques (Pfeiffer et al., 1994). Elles jouent un rôle central pour la capture du glucose, la synthèse et l'entreposage du glycogène et la distribution de métabolites carbohydratés aux neurones (Poitry-Yamate et Tsacopoulos, 1991; Poitry-Yamate et al., 1995; Reichenbach et Robinson, 1995; Schellini et al., 1995). Ce sont donc des cellules très importantes pour le métabolisme rétinien (Reichenbach et Robinson, 1995).

Les cellules de Müller jouent aussi un rôle important dans la régulation du pH car elles possèdent de l'anhydrase carbonique qui est une enzyme qui catalyse l'hydratation du dioxyde de carbone (produit par l'activité neuronale) en acide carbonique (Linser et al., 1984; Newman, 1996). Les membranes des cellules de Müller comportent un co-transporteur  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  et des pompes  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  qui contribuent à l'enlèvement des ions  $\text{K}^+$  de la rétine (Newman et Reichenbach, 1996; Newman, 1991). On y retrouve aussi un système de transport actif qui sert à enlever les surplus d'ions glutamate de l'espace extracellulaire (Newman et Reichenbach, 1996). Les cellules de Müller jouent aussi un rôle important au niveau des cônes : elles lient le rétinol tout-trans et le convertissent en 11-cis rétinol qui est relâché dans l'espace extracellulaire et repris par les cônes (Bridges et al., 1984; Das et al., 1992; Reichenbach et Robinson, 1995). Les cellules de Müller jouent

aussi un rôle dans la phagocytose à l'intérieur de la rétine interne, ayant l'habileté de digérer et d'éliminer les corps résiduels et les substances toxiques (Schellini et al., 1995). Elles possèdent donc une variété d'hydrolase pour digérer les membranes et permettre la phagocytose des débris de neurones (Reichenbach, 1989). Elles assistent les RPE dans la phagocytose des segments externes des photorécepteurs et les cellules microgliales pour la phagocytose des débris provenant de la dégénérescence rétinienne (Caley et al., 1972). Elles jouent aussi un rôle dans le maintien de la clarté du milieu oculaire par la phagocytose des particules que l'on retrouve dans l'humeur vitrée, comme les globules rouges.

### 1.3.2 Implication des cellules de Müller dans les pathologies rétiniennes

L'implication des cellules de Müller dans certaines pathologies de la rétine est très grande. Par exemple, elles sont impliquées dans l'hyperammonémie, où elles jouent un rôle important dans la détoxification de l'espace extracellulaire en ammonium ainsi que dans la rétinopathie hépatique où il y a une augmentation importante de l'expression de la protéine acide fibrillaire de la glie (GFAP) et de la cathepsine D (Reichenbach et Robinson, 1995). De plus, les premiers changements ultrastructuraux au cours de la rétinopathie diabétique sont détectés dans les cellules de Müller (la section 1.6.2 est consacrée à cette pathologie). Les cellules de Müller répondent aussi à un dommage neuronal ou à une dégénérescence au cours des dystrophies rétiniennes par une augmentation de l'expression de la GFAP et de la vimentine (Bignami et Dahl, 1979; Guerin et al., 1990). Dans les processus d'ischémie au niveau de la rétine, l'interruption de l'apport sanguin pendant plus de 30-45 minutes mène souvent à la mort des photorécepteurs qui sont alors phagocytés par les cellules de Müller (Buchi, 1992). L'effet exercé par l'ischémie est indiqué par une

augmentation significative de la GFAP qui persiste dans les cellules de Müller pendant six jours après une occlusion de 24 minutes de l'apport sanguin à la rétine (Osborne et al., 1991). Les cellules de Müller sont aussi impliquées dans les décollements de rétine à la suite desquels il se produit des changements dramatiques dans la forme des cellules de Müller (Anderson et al., 1986; Roque et Caldwell, 1990) et dans leur ultrastructure (Reichenbach et Robinson, 1995). La prolifération des cellules de Müller suivant un dommage est souvent accompagnée par la migration de certaines de ces cellules dans la cavité rétinienne ou l'espace sub-rétinien (Anderson et al., 1986; Erickson et al., 1983; Rentsch et al., 1979). Ces cellules de Müller aberrantes contribuent à la formation de membranes pré- ou sub-réiniennes qui peuvent mener à des décollements ou des dégénérescences réiniennes (Laqua et Machemer, 1975).

Une prolifération gliale sub-rétinienne et pré-rétinienne est retrouvée dans 45% des décollements de rétine qui ont duré 4 semaines et plus. La participation des cellules de Müller aux processus gliaux a été observée et n'est pas surprenante, en considérant que les cellules de Müller sont un type de cellules gliales hautement spécialisées et qu'elles réagissent probablement aux mêmes stimuli que les autres cellules gliales. Cependant, le stimulus exact pour la prolifération et l'excroissance des cellules gliales est cependant inconnu. Les cellules de Müller, réagissent à des stimuli en s'hypertrophiant et en proliférant (Laqua et Machemer, 1975).



En conclusion, la prolifération gliale joue un rôle important dans le développement d'une complication lors des décollements de rétine. On appelle cette complication MPP (massive periretinal proliferation) (Laqua et Machemer, 1975).

#### 1.4 Le cytosquelette et les filaments intermédiaires

##### 1.4.1 Le cytosquelette

La protéine étudiée dans ce mémoire fait partie des filaments intermédiaires. Étant donné que ceux-ci sont associés au cytosquelette, une description de ses éléments est présentée dans ce mémoire. Les composés du cytosquelette comportent des microfilaments d'actine, des filaments intermédiaires et des microtubules avec leurs protéines associées qui sont essentiels pour la croissance, la maturation, la différenciation, l'intégrité et les différentes fonctions des cellules, ainsi que lors des réponses cellulaires suite à des blessures. Ces composés interagissent avec l'environnement intra et extracellulaire et également entre eux. Leur profil d'expression change fréquemment durant le développement, en accord avec les besoins physiologiques. Un stimulus extracellulaire peut induire le cytosquelette à initier une réponse intracellulaire et, par ce fait même, à modifier le système d'ancrage cellulaire et les membranes basales.

Le cytosol des cellules eucaryotes renferme un cytosquelette composé d'au moins trois sortes d'éléments, soit les microfilaments (7 nm de diamètre) à squelette protéique d'actine, les microtubules de dimension plus grande (29 nm de diamètre) et faits de tubuline, ainsi que les filaments intermédiaires (10 nm de diamètre) constitués d'un ou de plusieurs types d'éléments protéiques allongés (Darnell et al., 1993). La résistance et la rigidité cellulaires

sont assurées par ces éléments du cytosquelette, mais ces derniers gouvernent aussi la motilité intracellulaire. Les microtubules et les filaments intermédiaires prennent aussi part au réseau du cytosquelette; souvent, les filaments intermédiaires sont arrimés aux protéines de la membrane plasmique (Darnell et al., 1993).

La microscopie par immunofluorescence indirecte a montré que les filaments intermédiaires sont distribués comme un complexe protéique. En effet, ils forment un réseau filamenteux interconnecté qui entoure le noyau, s'étend à l'intérieur du cytoplasme et se termine à la membrane plasmique. Le système de filaments individuels du cytosquelette apparaît interconnecté et également lié aux structures cellulaires de la membrane par des filaments courts et minces de la matrice cytoplasmique, les microtrabécules. Des études structurales des filaments intermédiaires ont démontré que la propension des sous-unités protéiques à s'agréger en des polymères insolubles est une conséquence de leur structure secondaire distincte qui est presque identique pour tous les filaments intermédiaires. Ceci supporte le concept que la formation d'agréats insolubles est une fonction propre aux filaments intermédiaires, ce qui permet à ces filaments de jouer un rôle structural dans la construction du cytosquelette (Traub, 1985).

#### 1.4.2 Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont des composants majeurs du cytosquelette que possèdent toutes les cellules eucaryotes (Traub, 1985). Il existe cependant une exception pour les photorécepteurs et les cellules bipolaires de la rétine, où l'on ne retrouve pas de filaments intermédiaires (Traub, 1985). Chez l'humain, seulement les cellules horizontales

et amacrines en possèdent dans la rétine. Différents filaments intermédiaires sont présents dans les mêmes cellules durant différents stades de développement et ce profil peut changer suivant la prolifération, le stress et une transformation maligne.

Les filaments intermédiaires ont été décrits pour la première fois par des études en microscopie électronique dans le milieu des années 1960 (Traub, 1985). L'investigation morphologique détaillée a été faite par Holtzer et ses collaborateurs entre 1968 et 1969 (Traub, 1985). Les filaments intermédiaires sont propres aux organismes pluricellulaires et les divers types de cellules différenciées contiennent leur propre jeu de filaments intermédiaires : ceux-ci ont une structure et une fonction semblable bien qu'ils soient composés de divers types d'éléments protéiques. Ces filaments sont souvent arrimés à la membrane plasmique, ce qui en fait les principaux responsables du maintien de la forme et de la motilité cellulaires.

#### 1.4.2.1 Les différentes classes de filaments intermédiaires

Il y a cinq classes de protéines dans les filaments intermédiaires des vertébrés supérieurs : la classe I qui inclut la kératine acide; la classe II qui comprend la kératine basique et neutre; la classe III qui se compose de la desmine, la GFAP, la périphérine et la vimentine; la classe IV qui inclut les neurofilaments; la classe V qui comprend les lamines et des protéines qu'on ne retrouve pas dans le cytoplasme, mais qui sont localisées dans le noyau. Chaque espèce protéique n'est exprimée que dans un seul type de cellule (Tableau 1). Les filaments intermédiaires de certains types de cellules gliales entourant les neurones

Tableau 1

Les différentes classes de filaments intermédiaires (Traub, 1985)

Type	Sous-unités protéiques	Poids moléculaire des sous-unités	Tissus d'origine
Tonofilaments (I et II)	Cyto- ou prékératines	40,000-68,000	Épithélium kératinisé et non kératinisé
Neurofilaments (IV)	Neurofilaments	68,000, 160,000, 200,000	Neurones du système nerveux central et périphérique
Filaments gliaux (III)	Protéine acide fibrillaire de la glie (GFAP)	51,000	Astrocytes et cellules de la glie
Filaments de desmine (III)	Desmine	53,000	Cellules musculaires
Filaments de vimentine (III)	Vimentine	53,500	Cellules mésenchymateuses

contiennent la GFAP. Elle est exprimée dans certains types de cellules de la glie, mais on ne la trouve jamais dans d'autres types cellulaires (Traub, 1985).

#### 1.4.2.2 Les différents constituants des filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires et leurs éléments protéiques ont tous une structure semblable. Les modules protéiques de tous les filaments intermédiaires sont formés d'un motif commun : un domaine N-terminal (domaine de tête) et C-terminal (domaine de queue) propres au type de monomère dont la taille est variable ainsi qu'un domaine central en bâtonnet d'environ 40nm (Figure 5) (Quinlan et al., 1994). Le bâtonnet central consiste en de longs tronçons d'heptades répétées (1A, 1B, 2A et 2B) qui tendent à former des dimères en superhélices  $\alpha$ . Ce domaine central d'heptades est interrompu par trois zones non hélicoïdales (L1, L12 et L2) (Figure 5) (Quinlan et al., 1994). Le domaine en bâtonnet se trouve entre deux domaines qui n'ont pas de structure en hélice, soit le domaine C-terminal et le domaine N-terminal. Ces domaines sont divisés en sous-domaines E1, V1 et H1 dans la région de tête et E2, V2 et H2 dans le domaine de queue. Les sous-domaines E1 et E2 sont les extensions extrêmes de terminaison de la protéine. Les variations dans les régions variables V1 et V2 sont en grande partie responsables de la différence de longueur entre les filaments intermédiaires de même classe. Les domaines H1 et H2 peuvent être variables à travers leur famille multigénique. Plusieurs filaments intermédiaires ont des séquences ayant des sites potentiels pour la phosphorylation dans la région H1 (Quinlan et al., 1994). La phosphorylation joue un rôle important dans la régulation post-transcriptionnelle des filaments intermédiaires qui sont dispersés à travers

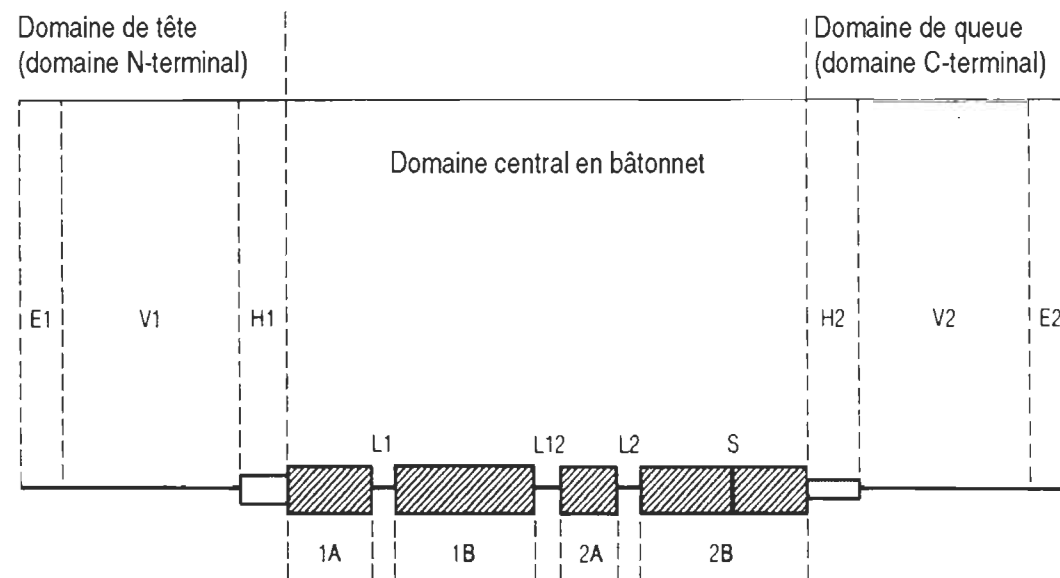


Figure 5. Structure des filaments intermédiaires (Quinlan et al., 1994).

le noyau et le cytoplasme. L'hyperphosphorylation des filaments intermédiaires apparaît naturellement et de façon momentanée durant la division cellulaire (Quinlan et al., 1994). La fonction biologique de la glycosylation des filaments intermédiaires n'est pas encore claire, mais elle serait reliée à la régulation de la polymérisation où elle servirait pour des interactions avec d'autres protéines qui ne sont pas des filaments intermédiaires (Quinlan et al., 1994).

#### 1.4.2.3 L'assemblage des filaments intermédiaires

L'assemblage des monomères de filaments intermédiaires est vraisemblablement dû aux forces d'association des domaines centraux en bâtonnets; les deux monomères polypeptidiques de 48nm s'accolent parallèlement dans la même orientation (Figure 6). Deux dimères s'assemblent en un tétramère de 70nm de long. Ces dimères d'un tétramère sont orientés en sens opposé, c'est-à-dire de façon antiparallèle. Les tétramères s'associent bout à bout en protofilament et huit de ceux-ci s'accolent pour former un filament intermédiaire de 10nm de diamètre (Figure 6) (Darnell et al., 1993; Kivelä et Uusitalo, 1998; Traub, 1985).

Contrairement à celles des microfilaments et des microtubules, les extrémités des filaments intermédiaires ont toutes deux les mêmes caractéristiques en tant que sites de polymérisation. On trouve souvent les filaments intermédiaires associés aux microtubules (Kivelä et Uusitalo, 1998; Traub, 1985). La vimentine, la desmine, la GFAP et le NF1 forment d'emblée des filaments intermédiaires homopolymériques (Kivelä et Uusitalo, 1998; Traub, 1985). Quand des protéines du groupe homopolymérique sont exprimées de

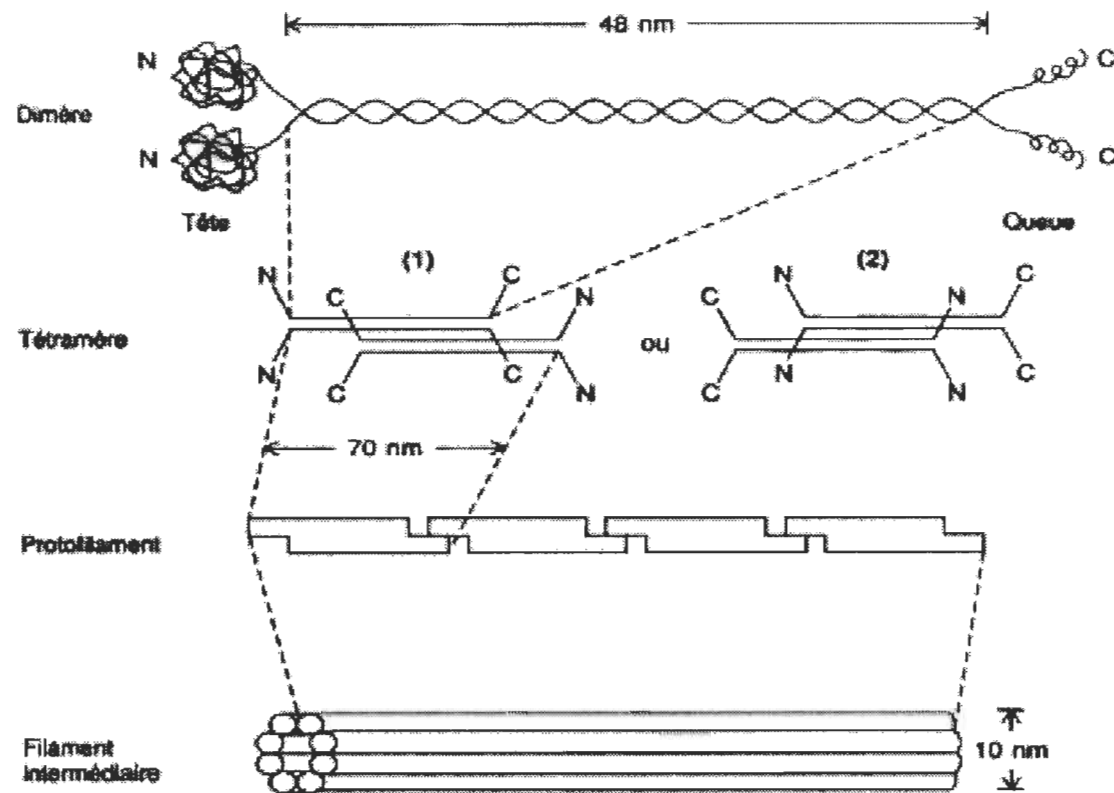


Figure 6. Assemblage d'un filament intermédiaire (Darnell et al., 1993).



concert dans une cellule, elles paraissent former un polymère commun. Plus de 9% des éléments protéiques des filaments intermédiaires restent sous forme polymérisée dans les conditions physiques les plus variées (Kivelä et Uusitalo, 1998).

#### 1.4.2.4 Les différentes fonctions des filaments intermédiaires

La microscopie électronique et l'immunofluorescence ont contribué grandement à nos connaissances actuelles au niveau de la distribution intracellulaire et également sur la dynamique des filaments intermédiaires dans les cellules de vertébrés. Ces méthodes ont permis de détecter de nombreuses interactions physiques des filaments avec d'autres structures cellulaires et organelles. Il a donc été suggéré que les filaments intermédiaires jouent un rôle dans le cytosquelette. Ils agissent souvent en association avec les autres éléments du cytosquelette. Avec les microtubules, ils jouent un rôle actif dans certaines activités cellulaires, comme la formation et le maintien de la forme des cellules ainsi que la polarité, l'adhérence cellulaire, le transport intracellulaire et le positionnement des noyaux et des organelles dans le cytoplasme. Dans les cellules nerveuses, ils sont reconnus pour donner aux axones leur force mécanique et dans les muscles, ils sont impliqués dans les actions contractiles des fibres musculaires (Traub, 1985).

Les protéines des filaments intermédiaires semblent donc remplir des rôles particuliers dans les cellules différenciées, tel celui de maintenir en place noyaux et autres organites. A ce point de vue, leur rôle dans le contrôle des processus cellulaires est moins manifeste que celui de l'actine et de la tubuline qui sont si largement répandues (Quinlan et al., 1994). La

protéine des filaments intermédiaires que nous avons étudié au cours de ce mémoire, la protéine acide fibrillaire de la glie, sera décrite dans la prochaine section.

### 1.5 La protéine acide fibrillaire de la glie

La GFAP fait partie de la catégorie des filaments intermédiaires. Cette section traitera de la structure de la GFAP, de ses différents rôles, de son gène, de sa relation avec les cellules de Müller et de son implication dans certaines pathologies du système visuel.

La GFAP est une protéine qu'on retrouve dans le tissu nerveux (Sarthy et al., 1991). Elle entre dans la fabrication des filaments gliaux qu'on retrouve dans les astrocytes, les cellules épendymales, les cellules de Schwann et les oligodendrocytes en développement. Son activité est augmentée en réponse à différentes sortes de blessures. Sa spécificité tissulaire a été utilisée pour le diagnostic de gliomes à l'aide d'anticorps anti-GFAP (Traub, 1985). Elle est maintenant reconnue comme un marqueur spécifique des astrocytes dans les tissus en développement, différenciés et néoplasiques (Erickson et al., 1992).

La GFAP possède un poids moléculaire de 47-50 kDa (DiLoreto et al., 1995; Ekstrom et al., 1988; Erickson et al., 1987; Guerin et al., 1990; Sarthy et Egal, 1995; Vaughan et al., 1990). Cette protéine du cytosquelette est exprimée à un haut niveau dans les astrocytes du cerveau et de la rétine. Elle est normalement localisée dans les astrocytes du système nerveux central et apparaît habituellement sous la forme caractéristique d'un filament intermédiaire de 10 nm de diamètre (DiLoreto et al., 1995; Erickson et al., 1987; Sarthy et al., 1991; Vaughan et al., 1990). La GFAP a également été détectée faiblement par

immunocytochimie dans les cellules de Müller normales de la rétine chez différentes espèces de vertébrés (Balcarek et Cowan, 1985; Guidry, 1996; Reeves et al., 1989; Roque et al., 1992). Cette protéine est composée d'une chaîne polypeptidique simple. Elle possède un domaine central hautement conservé et une région terminale hypervariable (Brenner, 1994).

Dans la rétine normale des vertébrés, la GFAP est absente ou est exprimée en très faible quantité et se retrouve à la base des cellules de Müller (de Raad et al., 1996; Erickson et al., 1992; Lewis et al., 1995; Vaughan et al., 1990). Son expression change en réponse aux facteurs qui peuvent perturber le microenvironnement des cellules (Guerin et al., 1990). Les facteurs qui régulent l'expression de la GFAP dans le système nerveux incluent les hormones et les facteurs de croissance comme l'EGF et le VEGF (Verderber et al., 1995). La hausse de l'expression de la GFAP résulte de l'activation de la transcription de son gène. Les éléments *cis* qui activent la transcription de la GFAP sont situés à l'intérieur d'une région de 2 kb située dans la région flanquant l'extrémité 5'. Le gène de la GFAP est long de 9.8 kb et contient 9 exons séparés par des introns d'une longueur de 0.2 à 2.5 kb. Il n'y a qu'une seule copie du gène de la GFAP par génome haploïde et il est localisé sur le chromosome 17 au niveau du bras q21 (Brenner, 1994; Sarthy et Egal, 1995; Verderber et al., 1995).

#### 1.5.1 La structure de la GFAP

La séquence en acides aminés de la GFAP comprend une séquence partielle de 28 résidus d'acides aminés qui peut être alignée avec une séquence du domaine N-terminal en

hélice  $\alpha$  de la desmine. Les deux séquences coïncident pour environ 50% des acides aminés et 10% des substitutions sont conservées. Il est à noter que la desmine, la vimentine et la GFAP démontrent une conservation de leurs uniques résidus tryptophane et cystéine. Par ailleurs, une protéolyse limitée sous des conditions natives démontre des similarités structurelles entre la GFAP et la desmine (Traub, 1985).

Le domaine de tête (N-terminal) sans hélice  $\alpha$  de la GFAP est fortement basique et compte 10 résidus arginine et seulement 2 résidus d'acide glutamique. Cette richesse en arginine et la présence de certains feuillets  $\beta$  lui donnent une structure basique permettant d'expliquer la forte susceptibilité du domaine N-terminal de la GFAP à la dégradation par des protéinases activées par le  $\text{Ca}^{+2}$  et d'autres enzymes protéolytiques. Par son analogie avec la desmine et la vimentine, il est probable que les résidus arginine du domaine N-terminal de la GFAP soient essentiels à l'assemblage des filaments gliaux (Traub, 1985).

### 1.5.2 Le promoteur de la GFAP

Avant même que les bases du code génétique ne soient connues, il était évident que des mécanismes moléculaires devaient exister dans les cellules pour leur permettre de contrôler la quantité des différentes protéines. A priori, la cellule peut réaliser cette synthèse de deux façons différentes. La première implique l'existence de signaux moléculaires qui contrôlent le taux de transcription des ARN à partir de la matrice d'ADN (contrôle transcriptionnel). Dans la seconde voie, c'est le taux de traduction des ARNm synthétisés en polypeptides qui serait contrôlé par d'autres signaux moléculaires (contrôle traductionnel) (Watson et al.,

1994). Pour l'étude présentée dans ce mémoire, nous nous sommes attardés à la voie du contrôle transcriptionnel du gène de la GFAP.

Au début, les promoteurs eucaryotiques sont apparus comme une version améliorée des promoteurs procaryotiques, mais néanmoins basée sur les mêmes principes de fonctionnement. En fait, on a découvert qu'il existait en 5' des gènes eucaryotiques, dans des régions situées en amont des séquences codantes, des motifs communs à beaucoup d'entre eux. Le premier de ces motifs, facile à mettre en évidence, est la boîte TATAA, souvent située à 25 ou 30 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. Cette séquence ressemble à l'élément -10 des promoteurs bactériens. On trouve d'autres séquences communes à de nombreux gènes, comme les boîtes CCAAT et GGGCG (boîte GC). Elles se situent à des positions variables, mais toujours en amont de la boîte TATAA. Les séquences qui contrôlent l'expression d'un gène, le promoteur, sont invariablement situées immédiatement en 5' du gène (Figure 7) (Watson et al., 1994).

Il existe des stratégies de mutagenèse rapides et sophistiquées qui permettent de modifier les séquences des promoteurs et de les réintroduire ensuite dans des cellules en culture. Le paramètre mesuré dans ces expériences de transfert de gènes peut être le niveau de transcription du gène, mais il s'agit plus souvent de l'activité d'un gène rapporteur. Ce gène est couplé au promoteur étudié de manière à être transcrit comme l'ARN du gène d'intérêt. Les gènes rapporteurs codent le plus souvent pour une protéine dont la quantité est facilement mesurable (voir la section 2.8 sur la transfection transitoire).

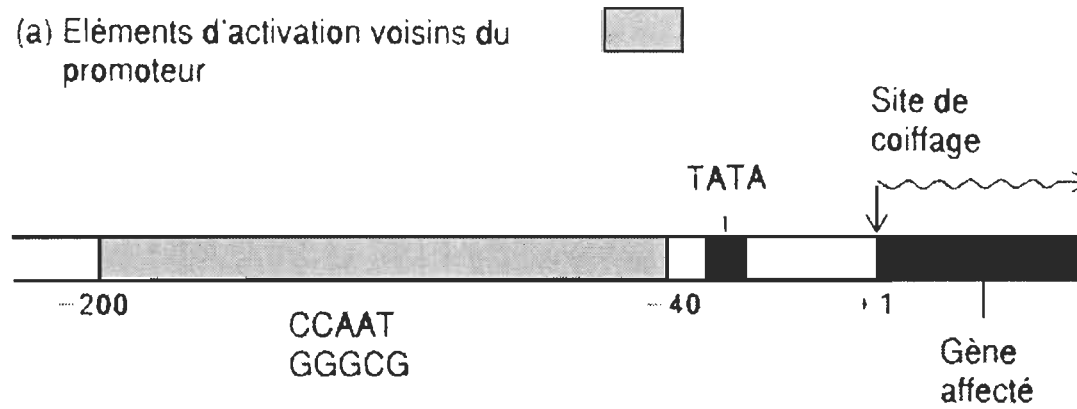


Figure 7. Éléments qui activent l'expression d'un gène (Darnell et al., 1993).

### 1.5.2.1 Les régions régulatrices du gène de la GFAP

Des études sur la régulation du gène de la GFAP ont été effectuées chez le rat, la souris et l'humain. Ces études ont permis d'identifier des zones de régulation ainsi que des sites de liaison pour des facteurs de transcription. Tout d'abord chez le rat, avec la lignée cellulaire gliale C6, une première équipe a identifié trois éléments de régulation cis-actifs (Sarkar et Cowan, 1991). Le premier est un élément distal positif situé entre les positions -1631pb et -1479pb, le deuxième est un élément proximal de régulation situé entre les positions -97pb et -80pb et le troisième est situé à l'intérieur du 1<sup>er</sup> intron entre les positions +1084pb et +1264pb. La délétion de ce troisième élément active l'expression de la GFAP dans les cellules HeLa et affecte la fonction du promoteur dans les cellules de gliome. Sur ces trois éléments de régulation, deux sont situés dans la région 5' et l'autre à l'intérieur du gène lui-même.

Une seconde étude, chez la souris, a porté sur la régulation de la GFAP dans les astrocytes (Miura et al., 1990). Cette équipe a identifié des éléments de régulation différents et des facteurs de transcription. L'élément cis-actif spécifique pour l'expression de la GFAP est situé entre les positions -256 et +1. Par la technique d'empreinte à la DNaseI, ils ont identifié trois facteurs de transcription trans-actifs qu'ils ont nommé : GFI (-104pb à -82pb), GFII (-124pb à -104pb) et GFIII (-163pb à -140pb). Le site de liaison GFI possède le site pour le facteur de transcription AP-2, tandis que le site GFII possède le site pour le facteur de transcription NF-1 et le site GFIII possède quant à lui l'élément de réponse AMPc (CRE). La mutation des éléments cis-actifs sur GFII amène une baisse drastique de l'activité du promoteur.

Les sites de liaison de certains facteurs de transcription sont situés aux endroits suivants : AP-1 (-238pb et -169pb), AP-2 (-339pb et -95pb), AMPc (CRE) (-154pb) et NF-1 (-118pb) (Miura et al., 1990). Des régions de régulation négatives et positives ont également été identifiées. Il s'agit de deux régions de régulation négatives situées à -2567pb/-1980pb et -681pb/-155pb et de deux régions de régulation positives à -1980pb/-1570pb et -155pb/-79pb. Les sites de liaison identifiés au niveau de GFI et GFIII sont homologues à des protéines spécifiques; GFI est homologue à AP-2 et GFIII, à CRE.

Une étude réalisée chez l'humain sur une lignée cellulaire d'astrocytes, soit la U251, a permis d'identifier des séquences régulatrices (Besnard et al., 1991). Ils ont retrouvé une première séquence entre les positions -1660pb et -1511pb. La délétion de cette région entraîne une baisse de l'activité du gène rapporteur CAT de 10 fois. On retrouve également en 5' une région régulatrice entre les positions -152pb et -70pb. En utilisant la technique d'empreinte à la DNase I, ils ont observé deux régions distales protégées, soit de -1636pb à -1614pb et de -1596pb à -1543pb, ainsi que deux régions proximales protégées de -144pb à -128pb et de -120pb à -88pb. Ils ont aussi identifié une région dénommée « B », qui est la plus efficace pour activer la transcription. Elle est située entre les positions -1612pb à -1489pb. On retrouve également des sites de liaison pour des facteurs de transcription, tels SP1 (CCGCCC), AP-1 (TGACTCA), AP-2 (CCCCACCCCC) et un élément de réponse AMP cyclique CRE (TGACCTCA).



### 1.5.3 Les différents rôles de la GFAP

Les fonctions précises des filaments intermédiaires n'ont pas encore été déterminées. Les évidences structurelles amènent à proposer qu'ils pourraient agir comme échafaud pour maintenir la position du noyau et des autres organelles d'une cellule. Ils pourraient également servir de guide pour le transit des molécules à travers les pores des cellules. Ce type de protéine pourrait donc avoir des rôles à jouer au niveau de la structure et du transport des molécules. Dans les cellules de Müller de rétines normales, la GFAP n'étend pas ses prolongements au travers de la cellule entière; elle a plutôt une distribution restreinte à la base de ces cellules (Fisher et al., 1991; Lewis et al., 1995). Toutefois, durant la dégénérescence des photorécepteurs visuels ou lors d'un décollement de la rétine, la GFAP forme un réseau extensif à travers le cytoplasme des cellules de Müller (Lewis et al., 1995). Cette protéine forme aussi le tissu cicatriciel des cellules de Müller suite à une pathologie, ce qui empêche, par exemple lors d'un décollement de rétine, la réapposition des photorécepteurs à l'épithélium pigmentaire suivant une chirurgie de recollement de rétine (de Raad et al., 1996; Erickson et al., 1987; Guerin et al., 1990; Lewis et al., 1995), ce qui a des conséquences dramatiques pour le succès de cette chirurgie.

Lorsque les cellules sont dissociées des tissus et mises en culture cellulaire, elles continuent dans la majorité des cas à exprimer leurs marqueurs protéiques tissu-spécifiques. La GFAP est un marqueur spécifique astroglial *in vivo* qui est exprimée dans les lignées cellulaires de gliome. Toutefois, lors de la culture non confluente de lignées cellulaires de gliome en monocouche, ce ne sont pas toutes les cellules qui seront marquées avec un anticorps dirigé contre la GFAP (Chiu et Goldman, 1985). Le pourcentage de cellules GFAP-positives est

considérablement augmenté lorsqu'on permet à la culture non confluyente de devenir confluyente ou encore lorsqu'on traite la culture avec du dibutyryl AMPc. Durant le processus de vieillissement et en réponse au traitement par l'AMPc, les cellules vont développer de longs prolongements qui sont marqués fortement par l'anticorps anti-GFAP. Un marquage périnucléaire et cytoplasmique est également observé. Il a été suggéré que c'est l'intensification de la formation des contacts cellules-cellules, avec une augmentation simultanée de la concentration intracellulaire en AMPc, qui serait responsable de ce processus de différenciation (Chiu et Goldman, 1985). Il est possible qu'un mécanisme similaire prenne place dans les cellules de Müller.

#### 1.5.4 Expression de la GFAP dans les cellules de Müller

Il a été mentionné précédemment que, normalement, la GFAP n'est pas exprimée, ou en très faible quantité, dans les cellules de Müller. Toutefois, lors de certaines pathologies de la rétine telles que le décollement de la rétine, la dégénérescence des photorécepteurs visuels, le glaucome, les dommages causés à la rétine suite aux traitements au laser ou lors de blessures aux yeux (v.g. perforation), le sectionnement du nerf optique, ou encore lors de transplantation de rétine, la GFAP est alors exprimée en très grande quantité (Figure 8) (de Raad et al., 1996; Durlu et al., 1990; Ekstrom et al., 1988; Erickson et al., 1992; Guerin et al., 1990; Lewis et al., 1995; Okada *et al.*, 1990; Schlosshauer et al., 1991; Yoshida et al., 1993). L'augmentation de l'expression de la GFAP est un phénomène général qui accompagne une gliose: il s'agit de la prolifération des cellules gliales dont font partie les cellules de Müller. Il a donc été suggéré que l'expression de la GFAP par les cellules de Müller peut être utilisée comme un indicateur d'une pathologie de la rétine. Cette

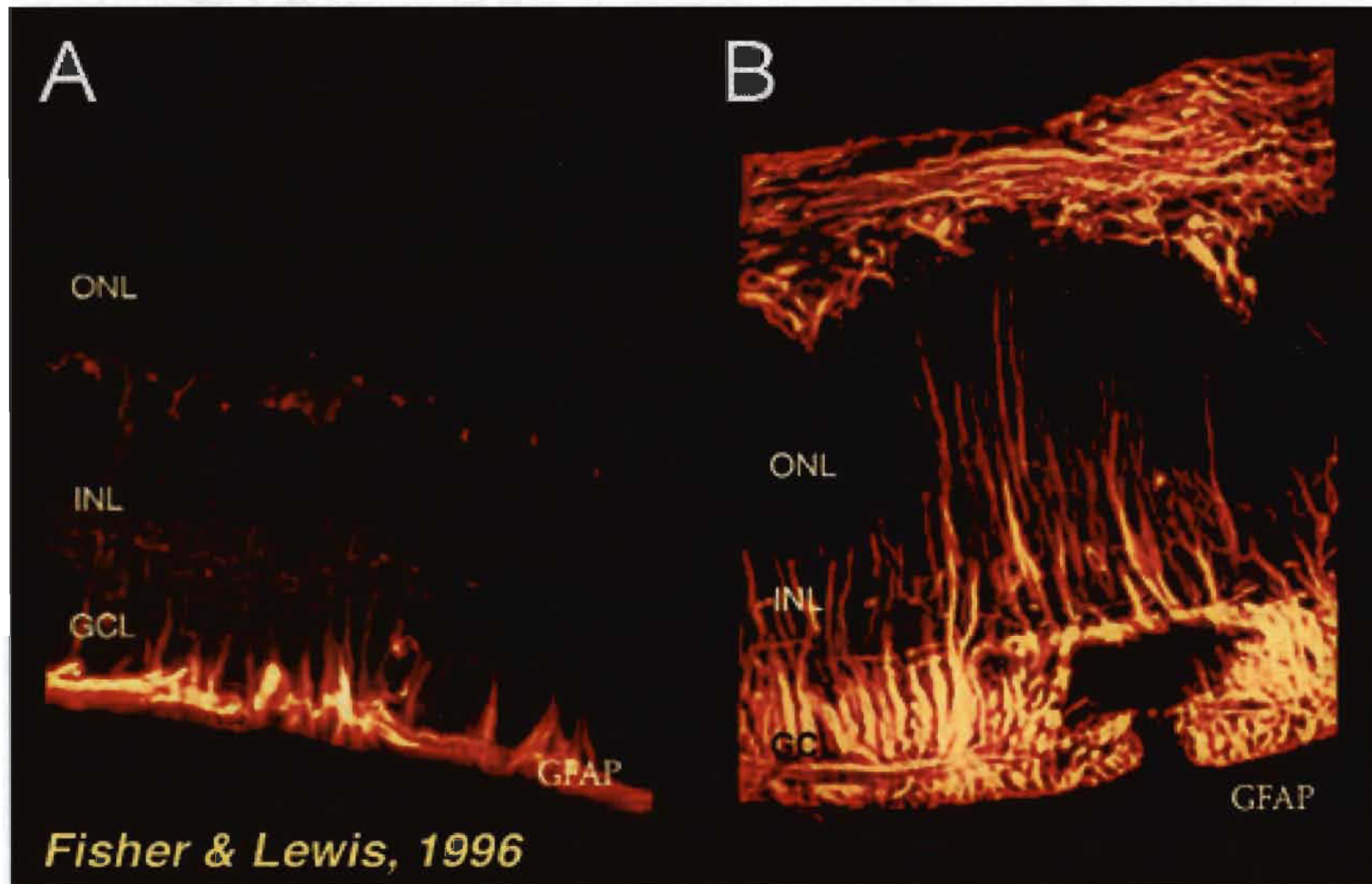


Figure 8. Expression de la GFAP dans les cellules de Müller , ONL = couche nucléaire externe, INL = couche nucléaire interne, GCL = couche de cellules ganglionnaires: A) une rétine normale, non-pathologique et B) une rétine pathologique lors d'un décollement de rétine (Site web :[Http://insight.med.utah.edu/Webvision/index.html](http://insight.med.utah.edu/Webvision/index.html)).

expression se retrouve dans toutes les cellules de Müller (de Raad et al., 1996; Durlu et al., 1990; Ekstrom et al., 1988; Erickson et al., 1992; Guerin et al., 1990; Lewis et al., 1995; Okada et al., 1990; Schlosshauer et al., 1991; Yoshida et al., 1993).

L'apparition de la protéine GFAP est une réponse à une blessure ou à une pathologie. Il se produit alors une augmentation dramatique de la concentration de la GFAP dans les cellules de Müller près du site du dommage. Lors d'une blessure, les cellules de Müller réagissent en proliférant à travers la rétine et en s'hypertrophiant (Figure 8). La GFAP étant une protéine du cytosquelette, elle aide à stabiliser les cellules de Müller qui s'hypertrophient durant la formation du tissu cicatriciel (Fisher et al., 1991; Guerin et al., 1990; Lewis et al., 1995; Okada et al., 1990). Au départ, il s'agit de la migration du noyau des cellules de Müller de son emplacement original, soit la couche nucléaire interne, vers la couche plexiforme externe, pour se retrouver ensuite dans la couche nucléaire externe et quelques fois jusque dans l'espace sous-rétinien (Figures 3 et 8). Le noyau des photorécepteurs apparaît lui aussi dans l'espace sous-rétinien lors de la rupture de la membrane limitante externe. La réponse proliférante est accompagnée d'une hausse de l'expression de la GFAP.

L'augmentation générale de l'expression de la GFAP suit parallèlement le cours de la dégénérescence des photorécepteurs. Les projections des cellules de Müller s'hypertrophient à travers la rétine où elles empêchent la reformation des connexions synaptiques et amènent la rupture de la structure existante. Elles peuvent aussi changer les propriétés optiques de la rétine, par exemple en empêchant le recollement de la rétine, ce

qui a pour effet de détériorer la vision. Le rôle que joue l'augmentation de l'expression de la GFAP dans les cellules de Müller lors de pathologies de la rétine n'est pas complètement connu. On peut supposer qu'elle serait impliquée dans la transformation de ces cellules au niveau de leur forme et de leur taille (DiLoreto et al., 1995; Ekstrom et al., 1988; Erickson et al., 1992; Fisher et al., 1991; Guerin et al., 1990; Hicks et Courtois, 1990; Lewis et al., 1995; Okada et al., 1990; Vaughan et al., 1990).

## 1.6 Implication de la GFAP dans certaines pathologies rétinienne

### 1.6.1 Le décollement de la rétine

La perte de contact entre l'épithélium pigmentaire et la rétine neurosensorielle définit le décollement de rétine. Certaines forces qui affectent la séparation de ces feuillets rétiens peuvent être produites par des traumatismes mineurs ou les mouvements oculaires (Stein et al., 1992). Des « flashes » de lumière et la présence de corps flottants sont des symptômes précédant un décollement de rétine rhégmateux. Ces symptômes peuvent être causés par la rupture de petits vaisseaux sanguins qui libèrent des globules rouges, ce qui amène des mouvements d'ombre dans la rétine.

Le décollement de rétine idiopathique représente 85 à 90% des cas. Il ne peut survenir sans la réunion de deux conditions : un décollement postérieur du vitré, où le gel vitréen qui occupe tout le segment postérieur de l'oeil se collabe et ne joue plus son rôle de tamponnement interne, ainsi qu'une ou plusieurs déchiscences rétiennes, où l'humeur vitrée s'infiltre entre les deux feuillets rétiens et les sépare (Figure 9). Les signes de décollement de la rétine surviennent en général quelques jours après le décollement

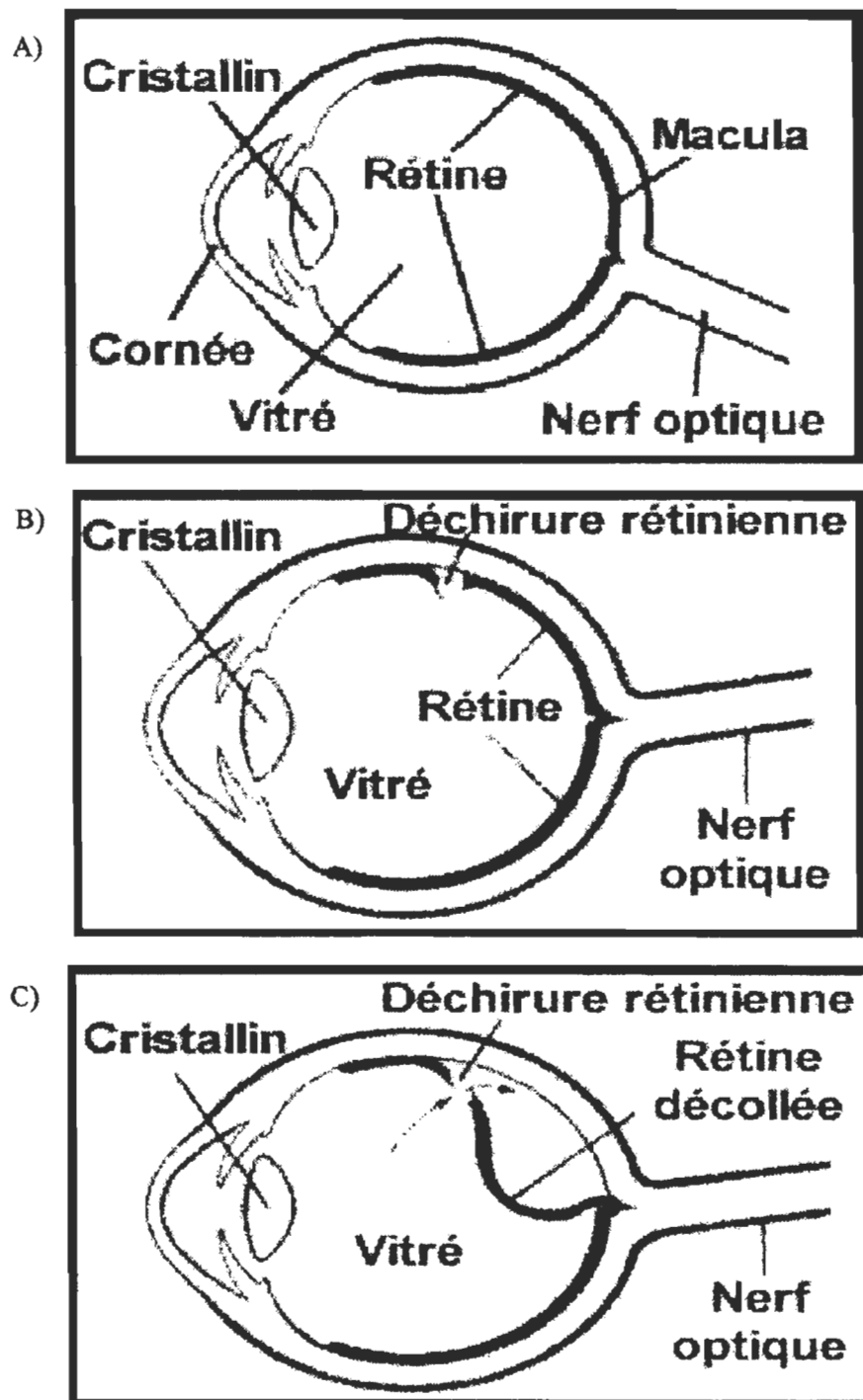


Figure 9. Les étapes menant à un décollement de rétine. A) Une rétine normale. B) Une rétine présentant une déchirure. C) L'écoulement du vitré. Site web: [Http://www.eyesite.ca/](http://www.eyesite.ca/).

postérieur du vitré, sous forme d'un voile noir situé dans la partie du champ visuel opposé à la zone de la rétine qui est soulevée. Il provoque une amputation d'une partie du champ visuel (scotome positif) qui s'étend progressivement. Lorsque le décollement de rétine atteint la macula, il s'y associe une baisse d'acuité visuelle, des métamorphopsies, une micropsie et une dyschromatopsie (Truill et Ganem-Albou, 1995).

La rétine décollée se présente sous un aspect saillant, plus ou moins mobile, plissée, grise ou d'un rose plus sombre que normalement. Le siège du soulèvement peut être situé dans le quadrant nasal, temporal supérieur ou inférieur, mais le plus souvent temporal supérieur. L'étendue du soulèvement peut être de un à quatre quadrants. La mobilité de la rétine est appréciée lors des mouvements rapides du globe oculaire; il s'agit d'un élément important du pronostic. En effet, plus la rétine est souple (décollement de rétine récent), meilleur est le pronostic (Truill et Ganem-Albou, 1995).

Le décollement de rétine idiopathique s'accompagne d'une ou de plusieurs déchiscences. Il s'agit de déchirures en forme de fer à cheval se retrouvant en périphérie rétinienne entre l'équateur et l'ora serrata. Cette déchirure est le plus souvent à l'origine du décollement de rétine (Truill et Ganem-Albou, 1995).

#### 1.6.1.1 La GFAP et le décollement de rétine

Le décollement de la rétine provoque plusieurs effets complexes sur la biologie cellulaire de la rétine qui n'ont pas tous encore été déterminés. Un changement dans le taux et la localisation de la GFAP a été rapporté dans les cellules de Müller (Figure 8)

(Lewis et al., 1995). Après un jour de décollement, la GFAP se condense à la base des cellules de Müller. L'augmentation de la GFAP se répand à travers la cellule entière en l'espace de quelques semaines après le décollement. Après deux jours de décollement, les cellules de Müller, les astrocytes, les cellules endothéliales vasculaires, les cellules de l'épithélium pigmentaire et les cellules microgliales commencent toutes à se diviser (Fisher et al., 1991). Le noyau des cellules de Müller est fréquemment transporté jusqu'à la membrane nucléaire externe ou dans l'espace sous-rétinien. Après trois jours, la GFAP est détectée par immunofluorescence dans l'espace sous-rétinien. La réponse proliférante atteint son maximum en l'espace de trois à quatre jours après le décollement et décline par la suite. Les projections des cellules de Müller s'hypertrophient à l'intérieur de la rétine, obstruant potentiellement la reformation des connexions synaptiques, amenant ainsi la rupture des structures existantes ou un changement des propriétés optiques des tissus de la rétine. La GFAP aide à stabiliser les cellules de Müller en formant le tissu cicatriciel des cellules. Par contre, la formation de ce tissu amène le rétrécissement de la rétine qui provoque des déchirures et éventuellement son décollement (Guidry, 1996). Les cellules de Müller entourent le segment externe des photorécepteurs empêchant ainsi leur réapposition à l'épithélium pigmentaire. Ceci apparaît comme étant une des raisons du faible recouvrement de la vision après une chirurgie de recollement de la rétine. L'habileté éventuelle à inhiber la réponse des cellules de Müller peut affecter positivement le potentiel de recouvrement visuel par la prévention d'une gliose sous-rétinienne, d'une rupture de l'organisation intrarétinienne et d'une perte des cellules photoréceptrices après une rupture de la membrane limitante externe.



Une étude récente (Lewis et al., 1999), également réalisée chez le chat, a tenté de démontrer que l'apport en oxygène entre le diagnostic de décollement de la rétine et la chirurgie de recollement, pourrait réduire l'incidence et la sévérité des complications gliales. L'étude a été réalisée sur 13 animaux: suite au décollement provoqué de la rétine, 6 animaux ont été gardés dans des conditions normales d'O<sub>2</sub> (21%, normoxie), alors que 7 animaux ont été soumis à des conditions plus grandes d'O<sub>2</sub>, soit 70% (hyperoxie). Dans les conditions normales, le décollement de rétine cause la prolifération des cellules de Müller et l'hypertrophie des prolongements de ces cellules. Un supplément en O<sub>2</sub> durant le décollement réduit la prolifération et l'hypertrophie des cellules de Müller. La GFAP peut être détectée dans les prolongements radiaux près de la surface interne de la rétine. Après un décollement dans des conditions normales d'O<sub>2</sub>, le marquage de la GFAP dans les cellules de Müller est considérablement augmenté et on détecte la protéine jusque dans les prolongements de la membrane limitante externe. Dans des conditions d'hyperoxie, cette hausse de la GFAP dans les cellules de Müller est réduite, mais n'est pas entièrement éliminée. Les résultats de l'étude de Lewis et al. (1999) tendent à prouver que l'apport en oxygène durant le décollement de la rétine réduit l'hypertrophie et la prolifération des cellules de Müller causées par le décollement. L'apport en oxygène amène à présumer que la réaction gliale, suivant le décollement de la rétine, résulte en partie d'une hypoxie. Ceci suggère que la prolifération qui suit une chirurgie de recollement pourrait être réduite si le patient recevait un apport supplémentaire en O<sub>2</sub> entre le diagnostic et la chirurgie, pouvant ainsi diminuer les risques d'apparition de la vitréorétinopathie proliférante. La portion recollée de la rétine devient un endroit de prédilection pour la formation de cicatrices gliales qui s'étendent dans la rétine même aux endroits n'ayant pas subi de décollement.

### 1.6.2 La rétinopathie diabétique

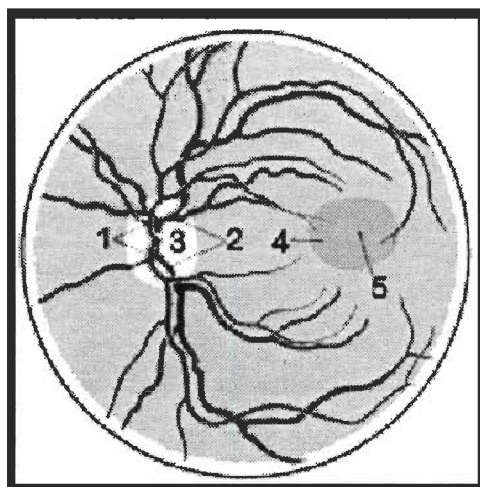
Le diabète est actuellement la première cause de cécité acquise dans les pays occidentaux. L'incidence de la cécité augmente avec l'âge et diffère selon le sexe. On peut constater une prédominance chez les hommes de moins de 50 ans mais, au-delà de cet âge, la situation inverse prédomine : 3 femmes pour 1 homme entre 50 et 59 ans, 5 femmes pour 1 homme après 70 ans. Dans la population mondiale, 1% des personnes sont atteintes de diabète, soit environ 40 millions de gens, et 28% parmi eux ont une rétinopathie diabétique (Truill et Ganem-Albou, 1995).

La lésion initiale de la rétinopathie diabétique est la micro-angiopathie qui, par définition, atteint les capillaires, mais aussi les artéioles et les veinules, sous forme d'une vasodilatation avec hyperperméabilité capillaire ou d'une obstruction capillaire (Truill et Ganem-Albou, 1995). La dilatation capillaire semble répondre à un phénomène d'autorégulation physiologique lié à l'hyperglycémie. Cette vasodilatation, devenant chronique, entraîne une altération de la paroi vasculaire associant un épaissement de la membrane basale, une prolifération des cellules endothéliales et une dégénérescence des péricytes. Cette altération de la paroi vasculaire a pour conséquence la formation de micro-anévrismes autour des zones capillaires non fonctionnelles et, surtout, la transudation des liquides intravasculaires à l'origine de l'oedème rétinien (Truill et Ganem-Albou, 1995).

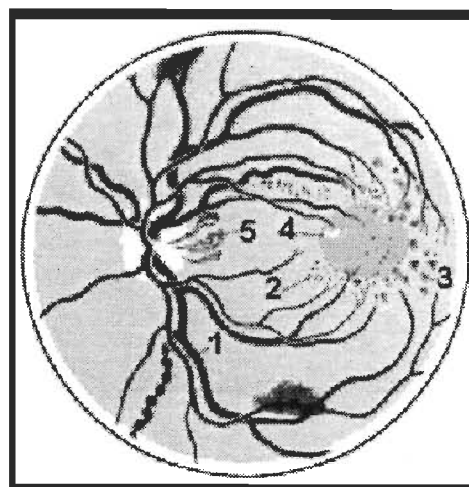
Les problèmes oculaires tendent à se développer vers une rétinopathie non proliférante et, subséquemment, une rétinopathie proliférante. Une rétinopathie préproliférante inclut des « cotton-wool spots », des anomalies microvasculaires intrarétiniennes où des capillaires à

l'intérieur de la rétine aident à alimenter les zones ischémiques (Stein et al., 1992; Truill et Ganem-Albou, 1995). Il y a 28% des diabétiques qui sont atteints de rétinopathie simple à des degrés divers mais, en général, leur état ne s'aggrave pas davantage.

À un stade plus avancé, les vaisseaux sanguins de la rétine sont bouchés ou obstrués complètement, ce qui entraîne la mort de certaines parties de la rétine. La rétinopathie diabétique proliférante atteint 5% des personnes diabétiques et survient lorsque de nouveaux vaisseaux sanguins anormaux (formation ischémique) viennent remplacer les anciens (Figure 10). Il s'agit de néovascularisation à la surface de la rétine. Ces nouveaux vaisseaux sont fragiles, ils peuvent se rompre facilement causant des hémorragies du vitré et de la rétine, ce qui altère la vision. Des tissus cicatriciels se forment, rétrécissent et déchirent la rétine, la faisant saigner ou se détacher de la partie postérieure de l'œil, ce qui peut entraîner une baisse importante de la vision, voire la cécité. La néovascularisation peut se contracter et former une masse fibrovasculaire qui pourra tirer sur la rétine et amener un décollement rétinien. Plus il y a longtemps qu'une personne est atteinte de diabète, plus elle risque d'être frappée d'une forme quelconque de rétinopathie diabétique. Généralement, l'incidence de complications diabétiques augmente avec la durée de la maladie (Truill et Ganem-Albou, 1995).



1. Artérioles rétiniennes
2. Veinules rétiniennes
3. Papille optique
4. Macula
5. Fovéa



1. Dilatation des veines
2. Micro-anévrismes capillaires
3. Hémorragies
4. Exsudats durs
5. Néof ormation de vaisseaux sanguins

Figure 10. La rétinopathie diabétique. Dans l'image de gauche, on aperçoit une rétine normale, alors que dans l'image de droite, on aperçoit une rétine présentant une rétinopathie diabétique (Site web: [Http://www.eyesite.ca/](http://www.eyesite.ca/)).

#### 1.6.2.1 La GFAP et la rétinopathie diabétique

Des changements métaboliques intenses dus au statut diabétique affectent tous les organes et systèmes. La rétine est sensible aux conséquences de ces changements. Des études cliniques ont démontré que, lors d'une rétinopathie diabétique, il se trouve une quantité excessive de glycogène dans les cellules de Müller (Schellini et al., 1995). D'autres études ont conclu que l'obstruction des vaisseaux sanguins est due à une quantité excessive de glycogène (Klein et Klein, 1997, Lieth et al., 1998, Schellini et al., 1995). Toutefois, aucune étude ne démontre que cette quantité de glycogène proviendrait des cellules de Müller. Cette augmentation de glycogène pourrait être due à l'oxydation excessive d'acides gras chez les personnes diabétiques (Lieth et al., 1998, Schellini et al., 1995). Une étude a récemment été réalisée sur des rats diabétiques traités à l'insuline, des rats diabétiques non traités et des rats normaux (Schellini et al., 1995). Les résultats montrent que chez les rats diabétiques non traités, les cellules de Müller présentent une dispersion de la chromatine du noyau et des granulations nucléaires denses avec une augmentation de la présence de glycogène. Dans le cytoplasme, ces auteurs ont détecté la présence de corps denses et de lysosomes. Les rats de douze mois présentent plus de glycogène et de lysosomes dans les cellules de Müller que les animaux plus jeunes. Les animaux diabétiques traités présentent des cellules de Müller similaires à celles observées dans le groupe contrôle, mais avec une plus grande quantité de glycogène, de corps résiduels, de lysosomes et des vacuoles contenant des éléments de myéline que chez les animaux normaux. Les cellules de Müller du groupe contrôle occupent presque l'épaisseur de la rétine de la membrane limitante externe à la membrane limitante interne et ne présentent aucune des altérations observées chez les rats diabétiques. Cette étude

démontre que le traitement à l'insuline n'est pas suffisamment efficace pour protéger complètement les cellules de Müller en accord avec les observations cliniques (Schellini et al., 1995). En effet, il a été observé que les rétinopathies diabétiques continuent d'évoluer malgré un bon contrôle du niveau de glucose sanguin (Schellini et al., 1995). La décondensation de la chromatine du noyau des cellules de Müller des rats diabétiques est un phénomène qui se manifeste lorsque la synthèse des protéines est activée, ce qui indique un signe de souffrance ou de mort des cellules. Les changements au niveau cytoplasmique sont plus grands chez les animaux diabétiques. Pour ces animaux, il y a des signes de nécrose pour tous les types de cellules de la rétine. Il est donc nécessaire d'enlever et de digérer les débris cellulaires, ce qui explique le grand nombre de lysosomes et de corps résiduels détectés dans les cellules de Müller chez ces animaux. Les cellules de Müller jouent un rôle dans la phagocytose à l'intérieur de la rétine, ayant l'habileté de digérer et d'éliminer les corps résiduels et les substances toxiques (Schellini et al., 1995). Au cours du diabète, l'éclatement des vaisseaux sanguins amène l'hypertrophie et la prolifération des cellules de Müller qui forment le tissu cicatriciel, ainsi que la présence de la GFAP qui forme un réseau extensif à travers le cytoplasme des cellules de Müller (Mizutani et al., 1998). La formation de ce tissu amène le rétrécissement de la rétine, ce qui pourrait amener son déchirement et éventuellement son décollement. Nous avons donc voulu étudier la régulation transcriptionnelle du gène de la GFAP dans des cellules de Müller provenant de patients atteints de rétinopathie diabétique en comparaison avec des cellules provenant de patients normaux.

### 1.6.3 Le mélanome uvéal

Le mélanome uvéal est la tumeur intraoculaire la plus répandue dans la population adulte. À chaque année, six nouveaux cas par million d'individus sont répertoriés. Ainsi, au Québec, approximativement 36 nouveaux cas sont répertoriés annuellement. Le mélanome uvéal est 15 fois plus présent dans la population blanche que la population noire. De plus, il atteint plus d'hommes que de femmes. Il apparaît dans la cinquième ou la sixième décade de la vie (Rennie, 1997; Stein et al., 1992; Zografos, 1998). La majorité des cas de mélanomes de l'uvée se développent de novo. Dans certains cas, toutefois, un naevus pré-existant peut être à l'origine de la tumeur alors que, dans d'autres cas, des facteurs héréditaires et génétiques, ou la présence d'une mélanocytose oculaire peuvent favoriser leur développement. Cette dernière affection correspond à une augmentation du nombre de mélanocytes dans tous les tissus oculaires : la sclérotique, l'épiscière, le tissu uvéal et parfois la papille optique. Les personnes qui présentent une mélanocytose ont un risque 35 à 65 fois supérieur par rapport au reste de la population de développer un mélanome de l'uvée (Rennie, 1997).

Les facteurs génétiques impliqués sont principalement reliés aux chromosomes 3, 6 et 8 (Rennie, 1997; Singh et al., 1996). Dans une étude récente (Rennie, 1997), ces anomalies ont été rapportées comme étant une ou plusieurs copies additionnelles du chromosome 8q, la monosomie du chromosome 3, la délétion du chromosome 1p, la délétion du chromosome 6q, la trisomie du chromosome 6p, la trisomie du chromosome 21 ou des anomalies du chromosome 11. La monosomie du chromosome 3 est une anomalie constante apparaissant dans 50% des tumeurs étudiées. Ceci suggère la présence d'un gène

suppresseur sur le chromosome 3, lequel, lorsqu'absent, contribue au développement de la tumeur. Les anomalies du chromosome 8 sont plus intrigantes, à cause de l'augmentation du matériel génétique qui provient des copies additionnelles du chromosome 8. Cela suggère la présence d'un promoteur oncogène sur ce chromosome. La présence de l'oncogène c-myc, impliqué dans la prolifération cellulaire, sur le chromosome 8q24,1 laisse croire à un rôle possible de ce gène dans la progression du mélanome uvéal. Une autre cause génétique du mélanome uvéal est le « familial uveal melanoma » qui est à l'origine de 0.6% des mélanomes et qui agit selon le mode autosomal dominant (Rennie, 1997; Singh et al., 1996).

Les mélanomes uvéaux se présentent cliniquement sous forme de masses plus ou moins pigmentées accompagnées le plus souvent d'un décollement secondaire exsudatif de la rétine. Ils sont localisés le plus souvent dans la choroïde postérieure. Le corps ciliaire ainsi que l'iris sont plus rarement touchés. Le mélanome origine des cellules pigmentées de la choroïde, les mélanocytes. L'ophtalmologiste peut détecter le mélanome par le degré de pigmentation de la tumeur, sa forme et sa localisation. La tumeur apparaît comme une masse brun-vert et, lors du stade avancé, elle présente la forme d'un champignon lorsqu'il y a rupture de la membrane de Bruch (Kath et al., 1993; Mooy et De Jong, 1996). Les mélanomes de l'uvée sont des tumeurs malignes qui donnent naissance principalement à des métastases au foie. Dans 85% des cas, les métastases hépatiques sont la seule ou la première manifestation de la maladie métastatique. Les autres sites métastatiques peuvent être, par ordre de préférence, les poumons, la peau, les os, le cerveau ainsi que quelques autres tissus. Le risque de métastase est estimé globalement entre 26 et 37% à 5 ans, entre



40 et 48% à 10 ans et entre 45 et 50% à 15 ans après traitement par énucléation. La taille, la forme et la localisation de la tumeur dans l'œil, le type cellulaire qui compose la tumeur (classification de Callender), l'éventuelle infiltration de la sclérotique, le nombre de mitoses et le type de vascularisation, ainsi que le profil des patients, le traitement appliqué et le temps écoulé avant l'intervention sont des paramètres essentiels qui influencent la survie des patients (Mooy et De Jong, 1996; Zografos, 1998).

La symptomatologie, par ordre de fréquence, comprend une baisse de l'acuité visuelle, rapportée le plus souvent comme un flou visuel, des phosphènes, des myodésopsies, des métamorphopsies et l'apparition d'un scotome dans le champ visuel. Dans environ 20% des cas, les mélanomes sont asymptomatiques et sont découverts fortuitement lors d'un examen de routine du fond de l'œil. Cependant, les tumeurs du pôle postérieur de l'œil présentent rapidement des symptômes (Zografos, 1998).

#### 1.6.3.1 La GFAP et le mélanome uvéal

Aucune étude n'a été réalisée sur l'implication possible de la GFAP dans la progression du mélanome uvéal. La GFAP étant une protéine impliquée dans diverses pathologies rétiniennes, et particulièrement celles impliquant un décollement de la rétine, il est donc possible qu'elle soit également impliquée dans les cas de mélanome uvéal où il y a présence d'un décollement de rétine secondaire. Les mélanomes sont accompagnés le plus souvent par un décollement secondaire exsudatif. C'est dans cet optique que nous avons procédé à quelques analyses d'immunohistochimie.

### 1.7 Objectifs spécifiques des travaux de recherche de ce mémoire

Les niveaux de GFAP exprimés dans les cellules de Müller seraient anormalement élevés chez les patients présentant une rétinopathie diabétique (Mizutani et al., 1998; Schellini et al., 1995) ainsi que chez ceux présentant un décollement de la rétine, ce qui suggère que la GFAP pourrait exercer une fonction majeure dans ces pathologies oculaires. Les objectifs de mon travail de recherche consistaient à (1) mettre au point un protocole pour la culture des cellules de Müller humaines, (2) à caractériser ces cellules en culture à l'aide de divers marqueurs propres aux cellules de Müller, (3) à étudier la régulation transcriptionnelle du gène de la GFAP dans les cellules de Müller. Pour ce faire, nous avons à notre disposition une panoplie de plasmides recombinants portant différents segments de la région 5' du promoteur du gène de la GFAP humaine. Les transfections transitoires de ces plasmides ont été effectuées dans des cultures primaires de cellules de Müller humaines ainsi que dans des cellules qui, normalement, n'expriment pas la GFAP (GH4C1, 293T et HeLa). Nous avons également comparé (4) la croissance des cellules de Müller provenant de patients normaux, versus celles provenant de patients diabétiques, et déterminer s'il y avait présence de la GFAP dans ces cellules et également étudier la régulation transcriptionnelle du gène de la GFAP dans les cellules de Müller provenant de patients atteints de rétinopathie diabétique. Finalement nous avons tenté de (5) déterminer s'il y a présence de GFAP dans des coupes de rétine provenant de patients atteints de mélanome uvéal par immunohistochimie.

## CHAPITRE 2

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1 Produits utilisés

Pour l'obtention des cultures primaires de cellules de Müller humaines et de rats, nous avons utilisé différents produits, tant pour la dissection que pour la mise en culture. Notre solution de dissection comprend du Hank's BSS sans  $\text{Ca}^{+2}$  et  $\text{Mg}^{+2}$ , du Hank's BSS divalent, de la pénicilline/streptomycine, provenant de chez Gibco, de l'albumine bovine et de la glutathione de chez Sigma et, finalement, de la polyvinylpyrrolidone de chez Fluka. Pour la mise en culture des cellules, nous avons utilisé, de chez Gibco, du DMEM, de la trypsine et de la pénicilline/streptomycine, de la collagénase de chez Sigma et du FBS (Fetal Bovine Serum) de chez Wisent Multicell. Les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture Costar selon la quantité de rétines prélevées: T-25 (25 cm<sup>2</sup>) ou T-75 (75 cm<sup>2</sup>).

Pour la caractérisation de nos cellules, nous avons procédé à des mesures d'immunofluorescence indirecte, d'immunohistochimie et d'immunobuvardage de type Western. Pour toutes ces techniques, des anticorps ont été utilisés. Les anticorps primaires utilisés sont, pour la détection de la protéine GFAP, l'anticorps monoclonal (anti-GFAP humain de souris) provenant de Serotec, l'anticorps GFAP polyclonal (pour l'immunobuvardage de type Western) (anti-GFAP bovin de lapin) provenant de Dako, l'anticorps monoclonal pour la protéine glutamine synthétase (anti-glutamine synthétase humain de souris) provenant de Cedarlane ainsi que l'anticorps monoclonal pour la protéine CRALBP, une gracieuseté du Dr. John Saari, Université de Washington (Seattle, Etats-Unis) (anti-CRALBP humain de lapin). L'anticorps secondaire utilisé contre la glutamine

synthétase et la GFAP (anti-souris de chèvre) marqué à la rhodamine provient de Sigma, alors que l'anticorps secondaire contre la CRALBP (anti-lapin de chèvre) marqué à la rhodamine provient de Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.

Les enzymes de restriction, BglIII et HindIII, proviennent de Pharmacia. La trousse utilisée pour le séquençage des plasmides suite aux maxipréparations et au clonage provient de Pharmacia. La trousse de dosage de la hGH de Medicorp et le chloramphénicol de NEN-Dupont pour le dosage de la chloramphénicol acétyl transférase (CAT) ont été utilisés pour les transfections transitoires.

## 2.2 Cultures cellulaires

### 2.2.1 Prélèvement et culture des cellules de Müller chez le rat

Nous avons débuté nos expériences en utilisant des rats puisqu'une méthode de préparation des cellules de Müller avait été mise au point à partir des rétines de cet animal (Hicks et Courtois, 1990; Lewis et al., 1988; Wakakura et Foulds, 1988). Selon les travaux de Hicks et Courtois (1990), il était essentiel d'utiliser des rétines de rats nouveaux-nés, i.e. entre 3 et 12 jours après leur naissance. Il est nécessaire d'utiliser des cellules de Müller de rats nouveaux-nés, car nous avons essayé avec des cellules de rats adultes, mais celles-ci ne peuvent être maintenues en culture. En fait, nous avons remarqué que les cellules de rats nouveaux-nés poussent remarquablement bien en culture.

Des femelles gestantes de type Sprague-Dawley albinos (Charles River) sont utilisées. Les bébés sont sacrifiés trois jours après leur naissance : après les avoir endormis au CO<sub>2</sub>, on

procède à la rupture de leur cou à l'aide de ciseaux, selon un protocole accepté par le comité de bons soins aux animaux de l'Université du Québec à Trois-Rivières. Les paupières sont ensuite incisées car, à cet âge, elle sont encore fermées et une membrane recouvre l'oeil. Cette membrane est retirée. A l'aide d'une pince recourbée, on soulève l'oeil de l'orbite oculaire et on coupe le nerf optique. Les yeux sont déposés dans une solution saline de dissection (albumine bovine 0.3%, Hank's BSS sans  $\text{Ca}^{+2}$  et  $\text{Mg}^{+2}$  1X, Hank's BSS divalent 20X, polyvinylpyrrolidone (PVP) 10%, pénicilline/streptomycine 2% et glutathione 1.7 mM) jusqu'à leur utilisation. Les yeux sont disséqués et la rétine est prélevée sous un microscope binoculaire. Les rétines sont ensuite déposées dans la solution saline de dissection jusqu'à leur utilisation. Une fois toutes les rétines récupérées, celles-ci sont incubées durant une heure à 37°C dans une solution enzymatique (Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), collagénase 70 U/ml, trypsine 0.1%). A partir de cette étape, la suite des manipulations a lieu dans des conditions stériles sous la hotte. Les rétines sont ensuite triturées à l'aide d'une pipette de 10 ml stérile, en faisant entrer et sortir les rétines de la pipette, et mises en culture dans des T-25 (l'équivalent de 5 yeux par boîte) dans 5ml de milieu de culture. Le milieu de culture des cellules de Müller de rats (DMEM, FBS 10%, pénicilline/streptomycine 0.1%) est changé tous les trois jours. La croissance des cellules s'effectue dans une incubateur à 37°C en présence de 5%  $\text{CO}_2$ . La rétine contient différents types de cellules ; parmi celles-ci, on retrouve des cellules nerveuses, soit les cellules amacrines, bipolaires, ganglionnaires, horizontales et interplexiformes, ainsi que les photorécepteurs visuels. Ces cellules ne peuvent croître en culture. C'est pour cette raison que notre méthode de prélèvement des cellules de Müller de la rétine nous permet de

mettre en culture ce type spécifique de cellules, sans contamination par d'autres types de cellules (Lewis et al., 1988; Wakakura et Foulds, 1988).

### 2.2.2 Prélèvement et culture des cellules de Müller chez l'humain

Après avoir réussi à mettre en culture des cellules de Müller de rats, nous avons procédé à la mise au point d'un protocole de mise en culture pour les cellules de Müller humaines. Les yeux humains proviennent de la Banque d'Yeux Nationale Inc. qui est située au Centre hospitalier de l'université Laval (CHUL). La méthode est très semblable à celle utilisée pour les yeux de rats. Par contre, chez l'humain, il faut prendre plus de précautions dans le prélèvement du vitré, afin d'éviter de décoller la rétine qui alors se déchire et rend difficile sa récupération. Il s'agit de découper largement la cornée pour que l'ora serrata soit facilement accessible. On fait ensuite une incision à la base de l'ora serrata que l'on découpe sur toute la longueur, ce qui permet au vitré de rester accroché à l'ora serrata et d'obtenir une rétine sans vitré. La suite des manipulations est la même que pour les cellules de Müller de rats (section 2.2.1). La seule différence est la concentration du FBS dans le milieu de culture qui est de 20% pour les cellules de Müller humaines.

### 2.2.3 Culture de lignées cellulaires

Pour les expériences en transfection transitoire, nous avons utilisé des lignées cellulaires que nous avons fait croître dans un milieu de culture spécifique pour chaque type de cellule : les cellules HeLa (ATCC CCL 2) qui sont des cellules épithélioïdes de carcinome humain (DMEM, FBS 10%, glutamine 200 mM et gentamicine 40mg/ml), les cellules 293T (ATCC CRL 1573) qui sont des cellules rénales humaines (DMEM, FBS 10%, glutamine 200 mM et gentamicine 40 mg/ml) et les cellules GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> (gracieuseté du

Dr. David D. Moore, Massachusetts General Hospital, Boston) qui sont des cellules hypophysaires de rats (Ham's F-10, FBS 10% et gentamicine 40 mg/ml).

## 2.3 Caractérisation des cultures cellulaires

### 2.3.1 Principe de la technique d'immunofluorescence indirecte

Cette technique sert à localiser des protéines au sein d'une cellule et nécessite l'utilisation d'un microscope à épifluorescence et des anticorps spécifiques à la protéine recherchée ainsi que des anticorps secondaires spécifiques à l'anticorps primaire et marqués avec une sonde fluorescente. Il y a deux sondes fluorescentes couramment utilisées pour ce type de microscopie ; ce sont la fluorescéine, qui émet une lumière verte, et la rhodamine, qui émet une lumière rouge. Pour nos expériences, nous avons utilisé des anticorps secondaires marqués avec la rhodamine, car le système de filtres que nous possédons permet seulement de visualiser la rhodamine.

### 2.3.2 Préparation des cellules pour les mesures d'immunofluorescence indirecte

Il s'agit de faire une suspension cellulaire de 50 000 cellules dans 50 µl de milieu de culture, de déposer cette suspension sur une lamelle de 13 mm qu'on recouvre ensuite de milieu de culture. Les cellules sont cultivées sur ces lamelles dans des plaques à 24 puits jusqu'à confluence. Lorsque les cellules ont atteint la confluence, c'est-à-dire 3-4 jours suivant leur mise en culture, il faut rincer 2 fois les cellules avec du PBS-IF 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 6.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O, pH 7.0) pendant 2 minutes. On procède ensuite à la fixation des cellules en versant suffisamment d'éthanol 70% froid (-20°C) pour recouvrir les lamelles qu'on incube ensuite au congélateur durant 10 minutes. Par la suite, il faut rincer les lamelles au PBS-IF

1X (2 rinçages d'une minute suivis de 2 rinçages de deux minutes). Si les lamelles ne sont pas utilisées au cours des prochains jours, il est nécessaire de les entreposer dans du PBS contenant 4 mM d'azoture de sodium. Pour procéder au marquage des cellules avec les anticorps, il faut transférer les lamelles dans une plaque à 12 puits. Si les lamelles ont été entreposées dans le PBS-azoture de sodium, il faut faire 2 rinçages de deux minutes au PBS-IF 1X. Le liquide autour de la lamelle est aspiré et 50 µl d'anticorps primaire (anti-GFAP, anti-glutamine synthétase ou anti-CRALBP) dilué dans du PBS-IF BSA 1% est déposé sur chaque lamelle (dilution de travail de 1:50 pour chaque anticorps). La solution de PBS-IF BSA 1% a été utilisée en guise de contrôle négatif. Les lamelles sont ensuite incubées dans une chambre humide pendant 45 minutes à la noirceur à la température de la pièce. On rince ensuite 3 fois les lamelles pendant deux minutes avec du PBS-IF 1X et on dépose 50µl/lamelle d'anticorps secondaire conjugué à la rhodamine (on utilise un anti-souris pour les anticorps primaires anti-GFAP et anti-glutamine synthétase et un anti-lapin pour l'anticorps primaire anti-CRALBP) qui sont dilués dans du PBS-IF BSA 1% (dilution de travail 1:200). On incube les lamelles dans une chambre humide pendant 30 minutes à la noirceur et à la température de la pièce. Après l'incubation, on rince les lamelles 3 fois pendant deux minutes avec du PBS-IF 1X et 3 fois pendant deux minutes avec de l'eau distillée. Par la suite, on procède au montage des lamelles sur des lames (75 x 25 mm, Fisher): on dépose 10µl de milieu de montage (p-phénylènediamine 0,1%, PBS 10X) sur une lame de microscope et on place la lamelle (cellules face à la lame) sur le milieu de montage qu'on laisse sécher à plat à 4<sup>0</sup>C et à la noirceur pendant au moins 30 minutes. On fixe le tour des lamelles avec du vernis à ongles transparent. On observe ensuite les lames



avec un microscope à épifluorescence à l'aide d'un objectif de 20X (Nikon Diaphot 300) et les photos sont prises avec un appareil photographique (Nikon FDX-35); les films utilisés sont des TMAX p3200 (Kodak).

#### 2.4 Immunohistochimie de coupes de rétine de patients souffrant de mélanome uvéal

La technique d'immunohistochimie repose sur le même principe que la méthode d'immunofluorescence indirecte. Au lieu de travailler avec des cellules, on travaille avec des coupes de rétine. La technique d'immunohistochimie est un groupe de procédures enzymatiques qui permettent de déterminer la présence d'antigènes dans les tissus (Kuby, 1994). Plusieurs enzymes différentes sont utilisées pour la conjugaison avec les anticorps, mais les meilleurs résultats sont obtenus avec la « horseradish peroxydase ». Nous avons utilisé une méthode de conjugaison anticorps-peroxydase indirecte qui tire avantage du complexe avidine-biotine. L'avidine est une protéine présente dans le blanc de l'œuf ; cette protéine possède une intense affinité pour une vitamine de bas poids moléculaire, la biotine. Pour cette méthode, on utilise tout d'abord un anticorps primaire dirigé contre la protéine que l'on désire étudier. Cet anticorps est reconnu par un anticorps secondaire couplé à la biotine qui elle est reconnue par le complexe avidine-peroxydase. Cette technique est basée sur l'habileté d'anticorps spécifiques à se lier aux antigènes correspondants. L'intérêt d'utiliser le complexe avidine-biotine est l'augmentation du signal lors de la réaction, car l'avidine possède quatre sites de liaison pour la biotine. Pour la procédure d'immunoperoxydase, l'activité enzymatique de la « horseradish peroxydase » est utilisée en présence de peroxyde d'hydrogène et d'un chromogène, le diaminobenzidine, qui sert à visualiser le résultat de la réaction. Il apparaît au microscope des granules brunâtres

déposés au site de réaction anticorps-antigène. Les sections de tissus marquées sont ensuite photographiées. Pour augmenter le contraste de la couleur, des filtres de couleur ou de densité neutre peuvent être utilisés. Il est important de toujours utiliser un contrôle positif et un contrôle négatif pour éviter les faux-positifs (Liapis et Hutton, 1997).

#### 2.4.1 Préparation des coupes de rétine pour l'immunohistochimie

Les yeux de patients souffrant de mélanome uvéal qui ont été utilisés pour faire les coupes de rétine ont été paraffinés immédiatement après leur prélèvement. Lorsque préservés dans la paraffine, ces yeux peuvent être conservés de nombreuses années. Avant de procéder au marquage des coupes, celles-ci doivent être déparaffinées et blanchies à l'aide de xylène et de deux solutions d'éthanol 100% et 95% (Liapis et Hutton, 1997). Les coupes sont ensuite rincées à l'eau distillée plusieurs fois, puis plongées dans un tampon citrate (acide citrique 0.1M, NaOH 2M, pH 6.0) à 90°C durant 15 minutes. Les coupes sont rincées deux fois à l'eau distillée et plongées dans le peroxyde d'hydrogène durant 5 minutes et rincées deux fois encore à l'eau distillée et lavées au tampon Tris (Trizma base 0.05M, NaCl 0.15M, pH 7.5) durant 5 minutes. Les coupes sont ensuite incubées dans un sérum de cheval (1/30) durant 20 minutes; cette étape permet de réduire l'adsorption non spécifique. Les coupes sont lavées au tampon Tris durant 5 minutes et incubées en présence de l'anticorps primaire anti-GFAP 1/200 durant 45 minutes. On lave ensuite les coupes encore une fois au tampon Tris durant 5 minutes. Par la suite, les coupes sont incubées en présence du deuxième anticorps anti-souris biotinylé durant 30 minutes et lavées au tampon Tris durant 5 minutes. On incube alors les coupes avec le complexe avidine-peroxydase durant 30 minutes qu'on lave ensuite avec le tampon Tris durant 5

minutes. Pour permettre la visualisation du marquage immunologique, on incube les coupes avec le chromogène diaminobenzidine (Sigma) durant 5 minutes. On lave une dernière fois les coupes au tampon Tris durant 5 minutes et on contre-colore les coupes à l'hématoxyline de Harris durant 3 minutes (Liapis et Hutton, 1997). Les coupes sont ensuite observées par microscopie de contraste de phase avec des objectifs de 10X et de 20X (Nikon Diaphot 300) et des photographies sont prises avec un appareil photographique (Nikon FDX-35); les films utilisés sont des TMAX-100 (Kodak).

## 2.5 Détection de la protéine GFAP dans différents types cellulaires

### 2.5.1 Principe de la méthode d'immunobuvardage de type Western

Une technique très utilisée pour la détection des protéines est l'immunobuvardage de type Western. Il s'agit du transfert capillaire sur membrane de nitrocellulose du profil électrophorétique d'une population de protéines. On met ensuite les bandes de la membrane au contact d'anticorps dirigés contre une protéine déterminée et liés à une enzyme (peroxydase). Par la suite, cette membrane est révélée à l'aide d'un film photosensible.

### 2.5.2 Préparation des extraits pour l'immunobuvardage de type Western

À l'aide d'un gradient de concentration de sucrose, on a récolté différentes fractions à partir des cellules de Müller, soit les noyaux, les protéines du cytosol et les protéines des membranes. Ces différentes fractions sont ensuite déposées sur un gel de polyacrylamide et ont permis de déterminer à quelle fraction cellulaire est associée la GFAP. Les cellules sont détachées des pétris à l'aide de pancréatine 1X (Gibco). Elles sont ensuite

homogénéisées 10 fois dans 5ml de tampon A (sucrose 0.25 M, Tris-Cl 15 mM pH 7.9, KCl 60 mM, NaCl 15 mM, EDTA 2 mM, EGTA 0.5 mM, spermine 0.15 mM, spermidine 0.5 mM, dithiothréitol (DTT) 1 mM et phénylméthylsulfonyl fluorure (PMSF) 0.4 mM). On ajoute le détergent Nonidet-P40 pour obtenir une concentration finale de 0.5% et on homogénéise 10 fois. On ajoute 10 ml de tampon B (tampon A + 2.1 M sucrose) à la suspension cellulaire qui est ensuite déposée sur 5 ml de tampon C (tampon A + 2.6 M sucrose) dans des tubes à centrifuger pour un rotor SW27 (Beckman) ; la centrifugation a lieu à 25 000rpm pendant 35 minutes à 4°C. Suite à la centrifugation, on obtient trois fractions : les noyaux cellulaires se retrouvent au fond du tube, on retrouve les membranes cellulaires à l'interface entre le 2.1 et le 2.6 M de sucrose et la fraction flottant sur le 2.1 M de sucrose contient le cytosol. Le culot de noyaux est resuspendu dans 1 ml de la solution NE3 (KCl 0.35 M, acétate de magnésium 2 mM, DTT 1 mM, Tris-Cl 10 mM pH 7.5). On ajoute suffisamment de KCl 4M et d'inhibiteur de protéases (Sigma) pour avoir une concentration finale de 0.4 M et 1%, respectivement. On homogénéise la suspension 10 fois qu'on transfère ensuite dans un tube de 1.5 ml et on procède à une centrifugation à 13 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C (Heraeus Biofuge Pico, rotor 3324). On récupère le surnageant et on procède à une dernière étape de centrifugation à 50 000rpm durant 2 heures à 4°C (ultracentrifugeuse Beckman, rotor TL 100.2). Le surnageant obtenu suite à cette centrifugation ainsi que les deux autres fractions obtenues suite au gradient de sucrose sont dialysés contre 4 L de tampon D (KCl 100mM, Tris-Cl 10mM pH 7.9, MgCl<sub>2</sub> 2mM, EDTA 0.1mM, DTT 0.1mM et PMSF 0.4mM) pendant une heure à 4°C (Bergeron et al., 1997; Guérin et al., 1990; Marzluff and Huang, 1984).

### 2.5.3 Électrophorèse et immunobuvardage de type Western

Lors de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE 12%, un tampon comprenant un détergent ionique, le sodium dodécyl sulfate (SDS), a été utilisé afin de dissocier les protéines en leurs sous-unités polypeptidiques. Le mélange de protéines a été dénaturé par chauffage à 100<sup>0</sup>C en présence de SDS et d'un réactif thiol, le mercaptoéthanol, qui réduit les ponts disulfures (tampon dénaturant : urée 4.8 M, Tris-Cl 0.5 M pH 6.8, glycérol 10%, SDS 10%,  $\beta$ -mercaptoéthanol 5%, bleu de bromophénol 2.5%). On utilise un gel de compression (acrylamide 2,5%, Tris 1 M pH 6.8, SDS 0.1%, ammonium persulfate (APS) 0.1%, TEMED 0.4%) pour concentrer les protéines qui sont ensuite séparées par le gel de séparation (acrylamide 12%, Tris 1.5 M pH 8.8, SDS 0.05%, APS 0.05%, TEMED 0.4%). Le réservoir d'électrophorèse contient un tampon Tris-glycine (Tris 250 mM, glycine 1.92 M et SDS 0.5% (p/v)). L'électrophorèse se fait à 150V durant une heure. Lorsque la migration des protéines est terminée, on procède au transfert Western. Le gel d'électrophorèse est transféré sur une membrane de nitrocellulose à 100 V durant une heure. Le tampon dans la cuve à électrophorèse est remplacé par le tampon de transfert (Tris 250 mM, glycine 1.92 M et méthanol 20%). Une fois le transfert terminé, on démoule le montage et on dépose la membrane dans du TS (NaCl 1.5M, Tris-Cl 100mM pH 7.4) pendant 10 minutes; pour bloquer les sites non spécifiques, on remplace le TS par du TSM (tampon TS incluant du Tween 20 0.1% et du lait en poudre 5% (p/v)) pendant 30 minutes. On ajoute ensuite l'anticorps primaire (anti-GFAP polyclonal, DAKO), dilution 1:10 000, durant 2 heures à la température de la pièce. On procède ensuite à une série de 4

lavages durant 5 minutes avec le tampon TSM. On ajoute par la suite l'anticorps secondaire (anti-lapin peroxydase, BRL), à une dilution 1:10 000 qu'on incube durant 1 heure à la température de la pièce. Une autre série de 4 lavages a lieu durant 5 minutes avec le tampon TSM et 2 fois avec le tampon TS durant 5 minutes. On procède à la révélation avec le réactif Super Signal (Pierce 34080) 1:1 durant 30 minutes. La membrane de nitrocellulose est ensuite exposée avec un film bleu (Kodak X-OMAT-Blue XB-1) (Bergeron et al., 1997).

## 2.6 Mesure semi-quantitative de l'ARNm de la GFAP par RT-PCR

Avec l'introduction de la PCR (polymerase chain reaction) il y a quelques années, il est devenu possible d'amplifier de très petites quantités de séquence cible d'ADN (Saiki et al., 1988). Cette méthode peut être adaptée pour la détection de l'ARN en utilisant la transcriptase inverse (Krug et Berger, 1987). Une méthode appelée RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) a été mise au point pour évaluer semi-quantitativement les niveaux d'ARNm dans un type de cellule. Cette méthode peut servir, comme dans notre cas, à évaluer les niveaux d'ARNm servant à coder une protéine spécifique. Il s'agit d'extraire l'ARNm des cellules de Müller et de préparer l'ADNc correspondant avec la transcriptase inverse qui servira pour l'amplification. Par la suite, à l'aide d'amorces en 3' et en 5' qui délimitent la séquence en ADN de la GFAP que l'on veut amplifier, il est possible d'amplifier cet ADN par PCR qui correspond alors au niveau d'ARNm présent dans nos cellules de Müller lors de leur extraction (Kaufman et al., 1995; Murphy et al., 1993).

### 2.6.1 Préparation des extraits d'ARNm pour la réaction RT-PCR

Le phénol, qui est contenu dans le Tri-Reagent (Bio/Can Scientific), permet d'extraire l'ARNm des cellules de Müller auquel on ajoute 400µl de chloroforme afin de solubiliser les lipides. On incube cette solution pendant 15 minutes à la température de la pièce. On centrifuge ensuite à 13 000rpm durant 15 minutes à la température de la pièce (Heraeus Biofuge Pico, rotor 3324). On garde la phase aqueuse, qui contient l'ARNm, à laquelle on ajoute 500µl d'isopropanol afin de précipiter l'ARNm. Après avoir laissé reposer cette solution pendant 10 minutes à la température de la pièce, on centrifuge à 13 000rpm durant 8 minutes. Le surnageant est enlevé et le culot d'ARNm est lavé avec de l'éthanol à 70%. Ce culot est resuspendu dans de l'eau DEPC et précipité avec de l'éthanol 95% à  $-20^{\circ}\text{C}$  contenant 3M d'acétate de sodium pH 5.2. Le culot est lavé avec de l'éthanol 70% et resuspendu dans de l'eau DEPC. On mesure la concentration d'ARNm par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 260nm. Les valeurs de concentration varient entre 1.5µg/µl et 2.4µg/µl. Le rapport 260/280 nous assure de la pureté des extraits d'ARNm ; il doit se situer entre 1.6 et 2. Pour toutes nos préparations d'ARN, ce rapport est de 1.6 (Wang et al., 1989).

### 2.6.2 La réaction RT

Pour la réaction impliquant la transcriptase inverse, on utilise une trousse de Pharmacia contenant les réactifs nécessaires. On prépare un mélange contenant 10µl de « first strand buffer » 5X, 2,5µl de 10 mM de nucléotides dNTP, 2µl de 1.4 µg/µl d'amorces

d'oligonucléotides RT, 1µl de « RNA guard » et 0.1 M de DTT. On ajoute ensuite 10µl d'ARNm à 1µg/µl qu'il faut bien mélanger et laisser reposer 5 minutes à la température de la pièce. Par la suite, on ajoute 2µl de transcriptase inverse superscript II (Gibco) à 200 U/µl et on incube le mélange pendant 1.5h à 37<sup>0</sup>C. La purification de la réaction RT a lieu à l'aide d'une trousse Qiagen (QIAquick nucleotide removal kit).

### 2.6.3 La réaction PCR

Le mélange pour la réaction PCR contient 5µl de tampon Taq, 10µl de produit de réaction RT, 2µl d'amorce 5' de la GFAP (GATGGAGCTCAATGACCGCT) (25pM/ml), 2µl d'amorce 3' de la GFAP (GCGACTCAATCTTCCTCTCC) (25pM/ml), 5µl de nucléotides dNTP 2µM et 1µl d'ADN polymérase Taq. La première étape de la réaction PCR a lieu à 94<sup>0</sup>C durant 2 minutes. À cette température, les molécules d'ADN double brin se séparent complètement pour fournir les simples brins servant de matrice à l'ADN polymérase. La température est maintenue à 94<sup>0</sup>C pendant 1 minute supplémentaire. La température est ensuite abaissée pour permettre aux amorces de se fixer aux séquences complémentaires présentes dans la molécule d'ADN. Cette étape d'hybridation des amorces est un paramètre essentiel dans la détermination de la spécificité de la PCR puisque la température et la durée des hybridations dépendent de la séquence à amplifier. Ainsi, en tenant compte de la séquence des amorces de la GFAP, cette étape a lieu à 55<sup>0</sup>C durant 1 minute. Ensuite, on élève la température à 72<sup>0</sup>C durant 1 minute, qui correspond à la température optimale pour le fonctionnement de l'ADN polymérase Taq. Cette température est ensuite maintenue durant 7 minutes supplémentaires pour permettre la



synthèse d'ADN. Le cycle de dénaturation, d'hybridation des amorces et de synthèse par l'ADN polymérase est répété 35 fois.

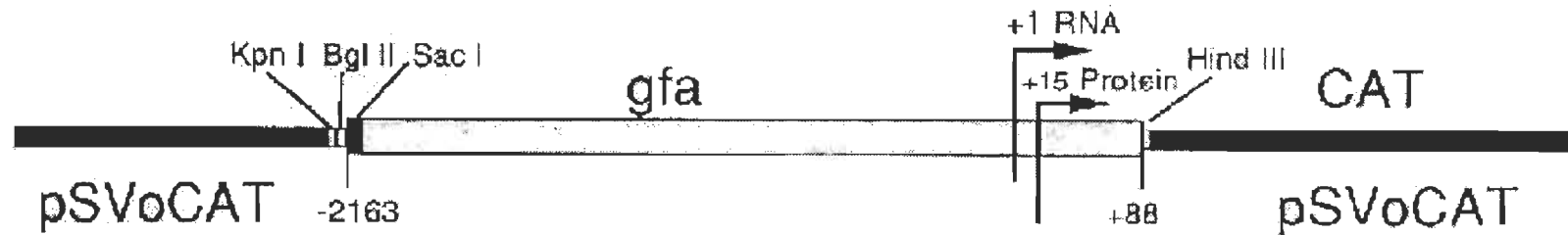
## 2.7 Préparation des plasmides de la GFAP pour les transfections transitoires

### 2.7.1 Maxipréparation de plasmides sur un gradient de concentration de CsCl

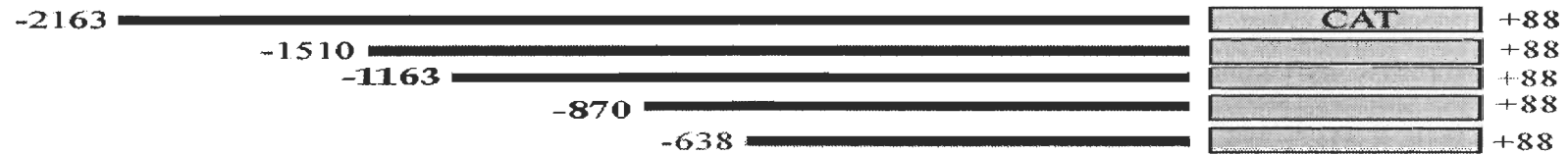
Pour nos expériences, nous avons reçu les plasmides de la GFAP du Dr. Michael Brenner (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, NIH, Bethesda, Maryland) (Figure 11) (Besnard et al., 1991). Ces plasmides sont construits en amont du gène rapporteur CAT et contiennent différentes longueurs du promoteur de la GFAP. Ces plasmides ont comme vecteur pSV0CAT. Nous avons dû amplifier ces plasmides pour en obtenir de grandes quantités.

La maxipréparation de plasmides sur un gradient de concentration de CsCl repose sur la densité de l'ADN. Suite à une ultracentrifugation, l'ADN va aller se loger au niveau du gradient de densité de CsCl qui correspond à sa propre densité. Il suffit alors de récupérer la bande d'ADN en perçant un trou au travers du tube à l'aide d'une seringue. Dans le CsCl, l'ion  $\text{Cs}^+$  se lie aux phosphates de l'ADN, ainsi qu'aux phosphates et à l'hydroxyle du ribose dans l'ARN, ce qui rend la densité de l'ARN supérieure à celle de l'ADN. On ajoute du bromure d'éthidium qui est capable de dérouler la double hélice d'ADN en s'intercalant entre deux paires de bases adjacentes, ce qui permet de séparer l'ADN chromosomique, les superhélices et les cercles relâchés (Darnell et al., 1993).

# pGfaCAT



## Plasmides CAT série +88



## Plasmides CAT série +47



Figure 11. Les différentes constructions de plasmides GFAP fournies par le Dr. M. Brenner (Besnard et al., 1991).

Pour procéder à l'amplification des plasmides, on doit tout d'abord transformer ceux-ci dans les cellules compétentes DH5 $\alpha$ . On repique ensuite une colonie et on la fait croître dans du « superbrot » toute une nuit. Le « superbrot » est un mélange très riche pour la croissance des bactéries; il s'agit d'un mélange de deux solutions, soit le superbrot A (bactotryptone 52g, yeast extract 116g et glycérol 0.6%) et le superbrot B (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 179 mM et KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 42 mM). Le lendemain, on centrifuge la suspension à 5000rpm (rotor GS-3, Sorvall), on ajoute la solution I hypotonique (glycérol 0.5% (v/v), Tris 0.25 mM pH 8.0 et EDTA 10 mM) pour resuspendre le culot et on ajoute ensuite la solution II (NaOH 0.2N et SDS 1%) pour faire éclater les cellules et finalement la solution III (acétate de potassium 5M et acide acétique glacial 25%) pour faire précipiter l'ADN. La solution est centrifugée à 5000rpm. On décante le surnageant et on ajoute de l'isopropanol et on centrifuge à 6000rpm. Le culot est resuspendu dans le TE (Tris 20 mM et EDTA 1 mM pH 8.0). On ajoute ensuite 8.8g de CsCl et le bromure d'éthidium à raison de 10mg/ml ; la solution est transférée dans une ampoule à centrifuger de 16 x 76 mm (Beckman) et le volume de l'ampoule est complété avec une solution de séparation (CsCl 0.3M, bromure d'éthidium 10mg/ml et TE pH 8.0). L'ampoule est scellée et centrifugée à 45 000 rpm (rotor Nvt 65) pendant environ 14 heures. Il s'agit ensuite de récupérer la bande d'ADN et de la transférer dans une ampoule de 13 x 51 mm (Beckman) qui est ensuite scellée et centrifugée à 75 000rpm (rotor Nvt 90) pendant 4 heures. On récupère la bande d'ADN et on extrait le bromure d'éthidium avec une solution d'isopropanol saturée en CsCl dans du TE. L'ADN est précipité avec de l'éthanol 95% à -20<sup>0</sup>C à la température de la pièce pendant une heure. On resuspend ensuite l'ADN dans du TE pendant une nuit. Le

lendemain, on fait deux précipitations avec de l'acétate de sodium 3M et de l'éthanol 95% à -20°C pendant une heure. L'ADN est resuspendu dans du TE et on peut alors procéder au dosage de l'ADN par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 260nm. On doit vérifier le rapport 260/280 pour s'assurer de la pureté de la préparation d'ADN. Ce rapport doit se situer entre 1.6 et 2. On procède également à la digestion des plasmides pour s'assurer que le fragment d'ADN que nous avons amplifié est le bon. Pour ce faire, nous utilisons les enzymes de restriction Bgl II et Hind III. Par la suite, on effectue le séquençage des plasmides pour vérifier s'il n'y a pas eu de mutation qui ont été introduites durant la préparation à l'aide de la trousse T7 DNA polymerase sequencing de Pharmacia.

## 2.8 Transfections transitoires des plasmides de la GFAP dans les cellules de Müller

À la suite du clonage d'un gène, nous voulons caractériser ses propriétés en le réintroduisant dans divers types de cellules afin d'identifier les éléments régulateurs contrôlant l'expression de ce gène. Il existe plusieurs approches expérimentales couramment utilisées afin d'introduire de l'ADN étranger dans diverses lignées de cellules animales. Parmi celles-ci, quatre sont particulièrement bien connues : la transfection par la technique au phosphate de calcium, la transfection par le DEAE-dextran, la transfection par électroporation et, finalement, la transfection par la formation de liposomes cationiques. Les deux premières techniques permettent la création d'un environnement chimique qui se traduit par l'attachement des molécules d'ADN à la surface des cellules. Cet ADN se retrouve à l'intérieur de la cellule par un mécanisme d'endocytose encore peu caractérisé. L'électroporation utilise un champ électrique afin de créer ou d'ouvrir des pores dans la membrane cellulaire. On croit que l'ADN diffuse passivement à l'intérieur de la cellule par

ces pores. Finalement, l'utilisation d'un réactif commercial tel que la lipofectamine (Gibco) permet d'introduire des molécules d'ADN par la formation de liposomes cationiques (Watson et al., 1994).

La transcription ou la réplication de l'ADN transfecté peut être mesurée après une période variant entre 1 et 4 jours après introduction de l'ADN. Cette technique, dite transfection transitoire, requiert généralement la récupération des cellules transfectées afin de préparer un extrait cytosolique qui servira à mesurer l'activité du gène introduit. La façon la plus simple d'optimiser les différents paramètres qui déterminent l'efficacité de transfection d'une cellule donnée consiste à utiliser un gène, dit rapporteur, dont l'activité peut être facilement mesurée. Un gène de fusion typique est généralement constitué du promoteur à étudier inséré de façon à contrôler l'expression d'un gène rapporteur dont le produit, qui n'exerce que peu ou pas d'effet physiologique sur la cellule transfectée, peut facilement être mesuré. Parmi tous les systèmes connus, nous avons utilisé le gène encodant le CAT et celui encodant l'hormone de croissance humaine (hGH) (Guérin et Moore, 1988; Selden et al., 1986).

#### 2.8.1 Transfections transitoires par la méthode du précipité de phosphatede calcium

La méthode du précipité de phosphate de calcium consiste à provoquer la formation de particules de précipité de phosphate de calcium dans lesquelles sont trappées les molécules d'ADN à transfecter. La formation de ce précipité est réalisée en mélangeant lentement une solution saline tamponnée à l'HEPES avec une solution de chlorure de calcium dans laquelle l'ADN à transfecter a été ajouté. Ces particules de précipité ont la propriété

d'adhérer à la surface des cellules et peuvent être observées en microscopie à contraste de phase 24h après le dépôt du précipité sur les cellules. Selon la lignée cellulaire transfectée, jusqu'à 10% des cellules contenues dans un pétri vont absorber l'ADN par un mécanisme encore inconnu (probablement de l'endocytose). Dans certains cas, un court traitement au glycérol ou au DMSO effectué après le dépôt du précipité sur les cellules peut améliorer la quantité d'ADN absorbée par la cellule (Figure 12) (Guérin et Moore, 1988; Guérin et al., 1990).

Les procédures expérimentales qui suivent décrivent d'abord la façon par laquelle les cellules sont transfectées et, par la suite, la façon par laquelle l'extrait cellulaire est préparé afin de doser l'activité du gène rapporteur utilisé. Dans ce cas-ci, la série de plasmides (pGFA) comporte le gène rapporteur encodant la chloramphénicol acétyl transférase. Le gène utilisé afin de normaliser les activités CAT selon l'efficacité de la transfection est celui encodant l'hormone de croissance humaine (hGH).

On enseme tout d'abord les pétris avec les cellules qu'on veut étudier (pour les cellules 293T, GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> et HeLa, 400 000 cellules/ pétri de 60mm (Costar) ; pour cellules de Müller humaines, 100 000 cellules/ puits, plaque (Falcon) à 6 puits). On doit laisser les cellules adhérer au pétri en les incubant à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub> (pendant 4 heures pour les cellules 293T, 24 heures pour les cellules HeLa, 72 heures pour les cellules GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> et les cellules de Müller humaines). Les transfections sont effectuées en triplicat. On prépare un mélange contenant 750µl de CaCl<sub>2</sub> 0.25 M, 45µg de chaque plasmide-test (pGfaCAT, Figure 11) et

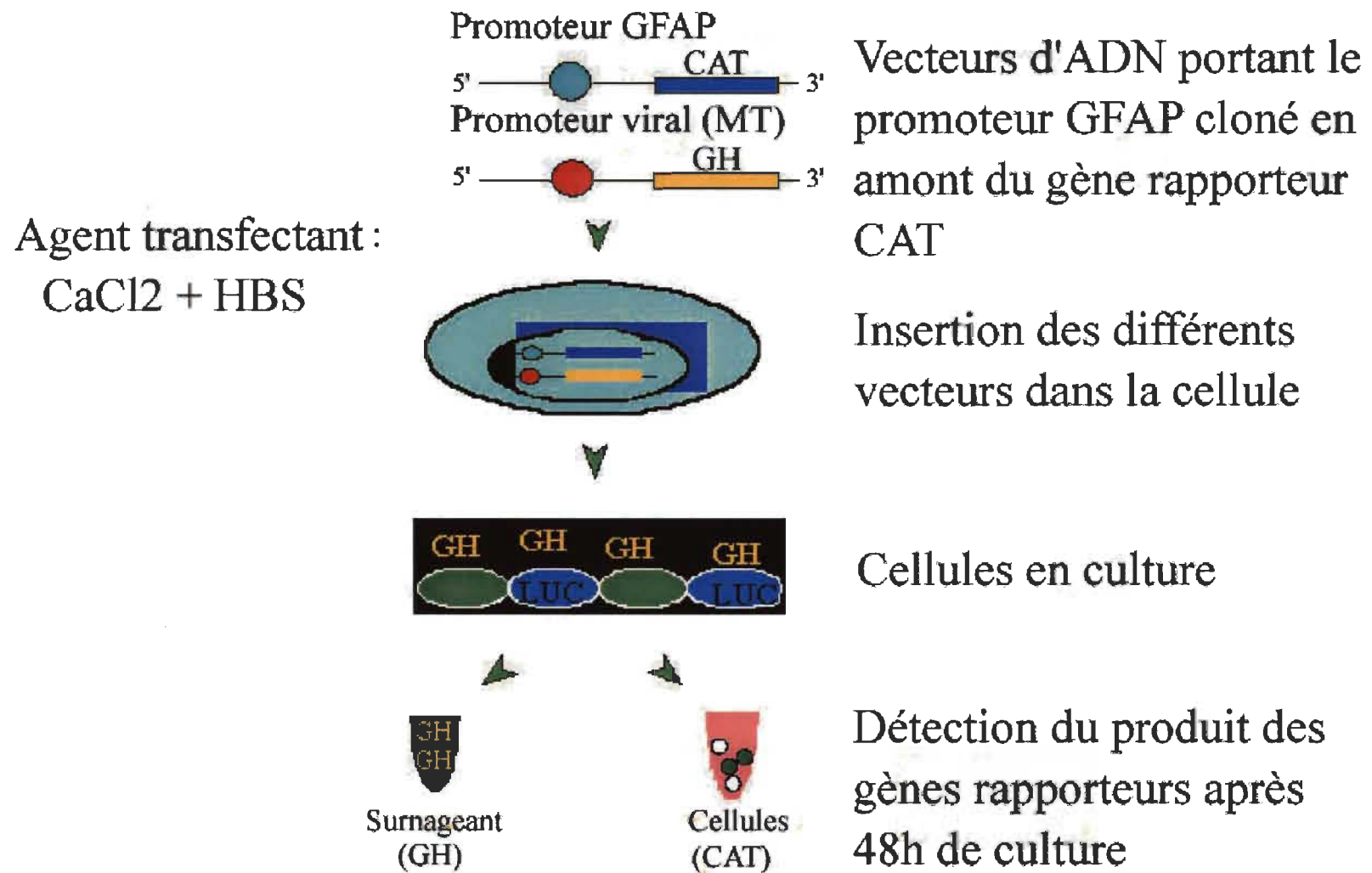


Figure 12. Principe de transfection transitoire par la méthode du précipité de phosphate de calcium.

15µg de PXGH<sub>5</sub> (gène rapporteur hGH) (Selden et al., 1986). En vortexant, on ajoute goutte à goutte à ce mélange 750µl de 2X HBS (HEPES 10.5mM, NaCl 68mM, KCl 2mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 0.05mM et dextrose 3mM, pH 7.05) contenant 0.05X PBS (NaCl 137mM, KCl 3mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 8mM et KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5mM, pH 7.5), qu'on laisse reposer pendant 5 minutes et on ajoute ensuite 500µl de ce mélange par pétri. Les cellules sont lavées 24 heures plus tard avec du PBS 1X et on ajoute ensuite 3 ml de milieu de culture. Après 48 heures, on récolte le milieu de culture pour dosage de la hGH et les cellules pour le dosage CAT. Pour les cellules de Müller humaines, on doit procéder à une étape supplémentaire pour favoriser l'incorporation de l'ADN plasmidique. On applique un traitement au glycérol (glycérol 15% dans une solution HBS (HEPES 25mM, NaCl 140mM et Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,75mM pH 7.5)) 4 heures après la transfection (Guérin et Moore, 1988; Guérin et al., 1990).

#### 2.8.1.1 Dosage de l'activité CAT par extraction en phase organique

Le dosage du gène transfecté est réalisé à l'aide de la chloramphénicol acétyl transférase (CAT), une enzyme bactérienne qui confère la résistance au chloramphénicol en inactivant celui-ci par acétylation d'un de ses deux groupements hydroxyles. On ne retrouve aucun équivalent de ce gène chez les eucaryotes, éliminant ainsi toute possibilité de bruit de fond pour la mesure de cette activité en transfection transitoire.

On aspire le milieu des pétris et on ajoute 300µl de tampon CAT (Tris-HCl 15 mM pH 8.0, KCl 60 mM, NaCl 15 mM, EDTA 2 mM, spermine 0.15 mM, DTT 1 mM et PMSF 0.4



mM). On décolle les cellules à l'aide d'un policeman, on transfère la suspension dans un tube de 1.5ml et on soumet les cellules à 3 cycles de gel-dégel (glace sèche et éthanol, suivi d'une incubation dans un bain à 37°C). On centrifuge et on transfère le surnageant dans un tube de 1.5ml et on incube pendant 10 minutes à 70°C ; on centrifuge de nouveau afin d'éliminer les protéines précipitées et on conserve le surnageant (Pothier et al., 1992). Par la suite, on procède au dosage CAT : pour ce faire, on utilise 100µl de l'extrait cellulaire ainsi que 25µl d'un mélange radioactif composé de 0.2µCi de chloramphénicol-<sup>3</sup>H, auquel on ajoute 20µl de Tris 0.25 M pH 8.0 et 2 volumes de xylène. On centrifuge à 1000rpm pendant 2 minutes et on élimine le xylène; on répète une autre fois avec 2 volumes de xylène. Ensuite, on ajoute 5µl de butyryl CoA (Sigma). On incube dans un bain-marie à 37°C pendant 18 heures (Seed et Sheen, 1988).

Le lendemain, on ajoute 330µl de xylène à chaque échantillon, on vortexe pendant 1 minute et on centrifuge 2 minutes à 13 000rpm. On garde 300µl de la phase xylène, à laquelle on ajoute 100µl de Tris 0.25 M pH 8.0, on vortexe et on centrifuge dans les mêmes conditions. On transfère 240µl de la phase aqueuse dans un tube de 1.5ml et on ajoute à nouveau 100µl de Tris 0.25 M pH 8.0. On vortexe et on centrifuge, puis on transfère 200µl dans un vial à scintillation (Sarstedt). On ajoute 2ml de cocktail à scintillation par échantillon (Amersham BCS NBCS104) et on mesure la radioactivité résiduelle avec un compteur Bêta (Seed et Sheen, 1988).

#### 2.8.1.2 Dosage de l'hormone de croissance humaine

Le dosage de l'hormone de croissance humaine, lors de transfections transitoires, repose sur une méthode de détection immunologique fort simple de la hGH. L'hormone de croissance chez l'humain est constituée de 191 acides aminés et n'est produite en quantité significative que par les cellules somatotropes provenant de l'hypophyse antérieure. L'hormone de croissance possède un peptide signal lui permettant d'être sécrétée dans le milieu de culture. Ainsi, 24 heures seulement après la transfection, des niveaux détectables de hGH peuvent être mesurés dans le milieu de culture (Larsen et al., 1986).

Pour le dosage de la hGH, on récolte 100µl de milieu de culture que l'on dépose dans des tubes tapissés du premier anticorps contre la hGH (trousse Medicorp). On ajoute 100µl d'un second anticorps marqué à l'iode 125 et on incube pendant 2 heures à la température de la pièce. Ensuite, on mesure l'activité de la hGH avec un compteur gamma.

## CHAPITRE 3

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1 Cultures des cellules de Müller de rats

L'objectif de ce travail de recherche était d'étudier l'expression du gène de la GFAP dans les cellules de Müller de rétines humaines. Nous devions donc mettre en culture des cellules de Müller humaines. Aucune publication n'existant sur le sujet, nous avons procédé, pour débiter, à la mise en culture de cellules de Müller de rats à partir de protocoles déjà publiés (Cao et al., 1997; Hicks et Courtois, 1990). Des photos prises en microscopie en contraste de phase sont présentées à la figure 13. Ces photos présentent des cultures de cellules de Müller de rat non-confluentes et confluentes. On parle de cellules non-confluentes lorsqu'elles couvrent moins de 70-80% de la surface des boîtes de culture; les cellules sont dites confluentes lorsque 100% de la surface des boîtes de culture est recouverte de cellules. La photo 13A présente des cellules de Müller de rat non-confluentes où on peut observer les caractéristiques suivantes: la présence d'îlots de croissance, les noyaux de ces cellules de Müller, les longs prolongements cytoplasmiques ainsi que l'enchevêtrement des prolongements cytoplasmiques entre les différents îlots de croissance. Ces caractéristiques ont également été observées par d'autres équipes (Guidry, 1996; Hicks et Courtois, 1990; Lewis et al., 1988; Newman et Reichenbach, 1996). La photo 13B présente une culture de cellules de Müller de rat confluentes où il est possible d'observer les noyaux. De plus, on peut voir que les cellules sont très entassées et qu'elles se superposent pour croître en multicouches. L'enchevêtrement des prolongements

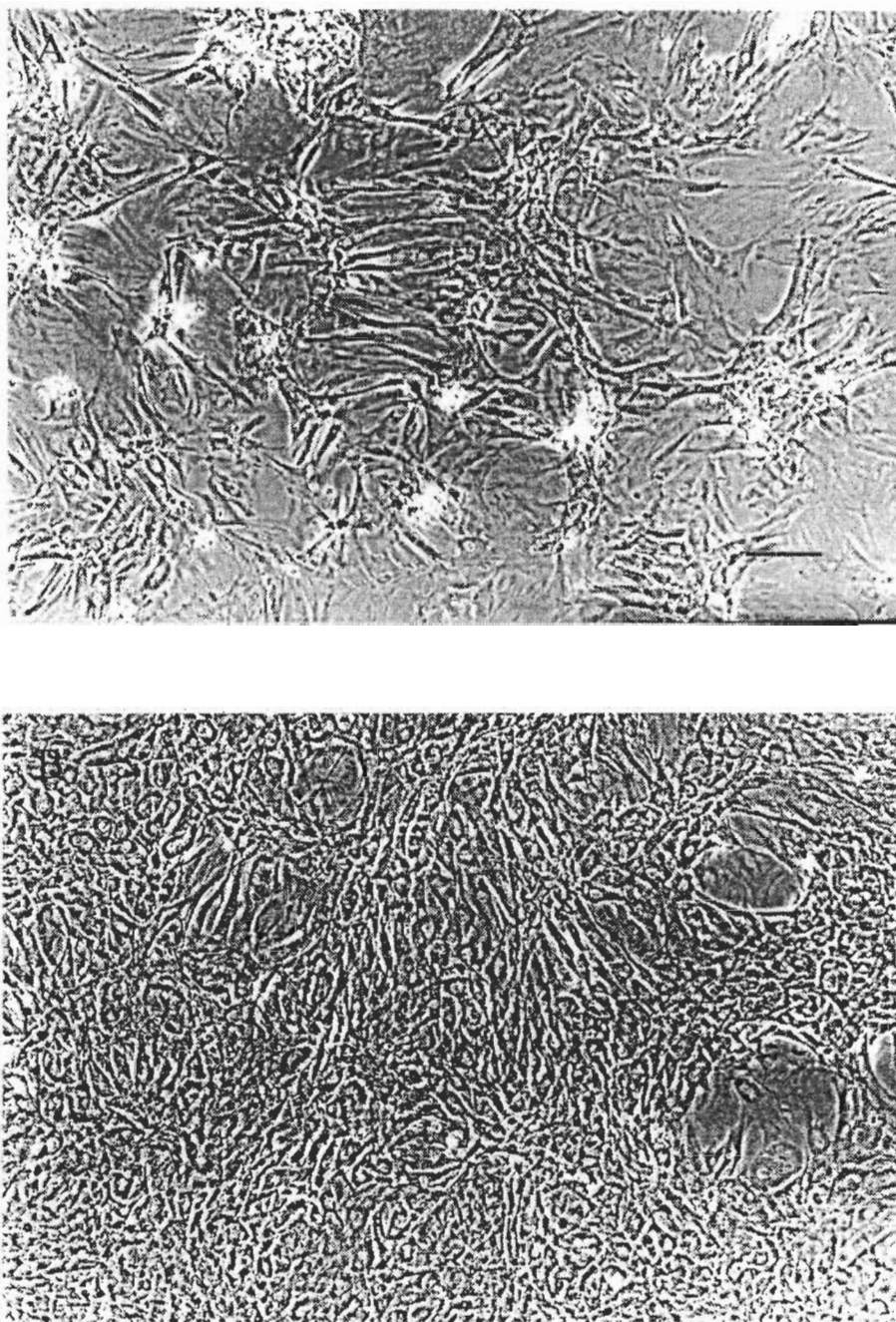


Figure 13. Photographies en contraste de phase de cellules de Müller de rat prises avec un objectif de 10X A) Cellules de Müller de rats non-confluentes. B) Cellules de Müller de rats confluentes. Échelle = 85 $\mu$ m.

cytoplasmiques est beaucoup plus dense et les prolongements se dirigent dans différentes directions.

### 3.2 Cultures des cellules de Müller humaines

Une fois la dextérité et l'habileté pour la dissection des cellules de Müller de rats bien acquises, nous avons débuté les expériences à partir de yeux humains. Pour ce faire, nous avons modifié le protocole de mise en culture des cellules de Müller de rats. De modifications en modifications, nous avons réussi à obtenir des cultures de cellules de Müller humaines. Toutefois, la croissance était extrêmement lente. Nous avons donc augmenté la concentration de FBS, le sérum qui nourrit les cellules. La croissance s'est améliorée, mais il reste que ce sont des cultures primaires et non des lignées cellulaires: la croissance est environ 10 fois plus lente que ces dernières. Des photos de cellules de Müller humaines prises en microscopie de contraste de phase sont présentées à la figure 14. La figure 14A nous permet d'observer des cellules de Müller humaines non-confluentes. On peut voir des îlots de croissance, les noyaux cellulaires, les longs prolongements cytoplasmiques, l'enchevêtrement de ces prolongements cytoplasmiques ainsi que les liens entre les différents îlots de croissance via ces mêmes prolongements. La figure 14B montre des cellules de Müller humaines confluentes. On peut observer l'entassement des cellules, ainsi que la présence de quelques noyaux. Les enchevêtrements des longs prolongements cytoplasmiques sont également visibles, ceux-ci s'étendant dans différentes directions.

La figure 15 nous permet de comparer les cultures des cellules de Müller de rats et humaines. On peut voir que les cellules de Müller humaines sont beaucoup plus grosses



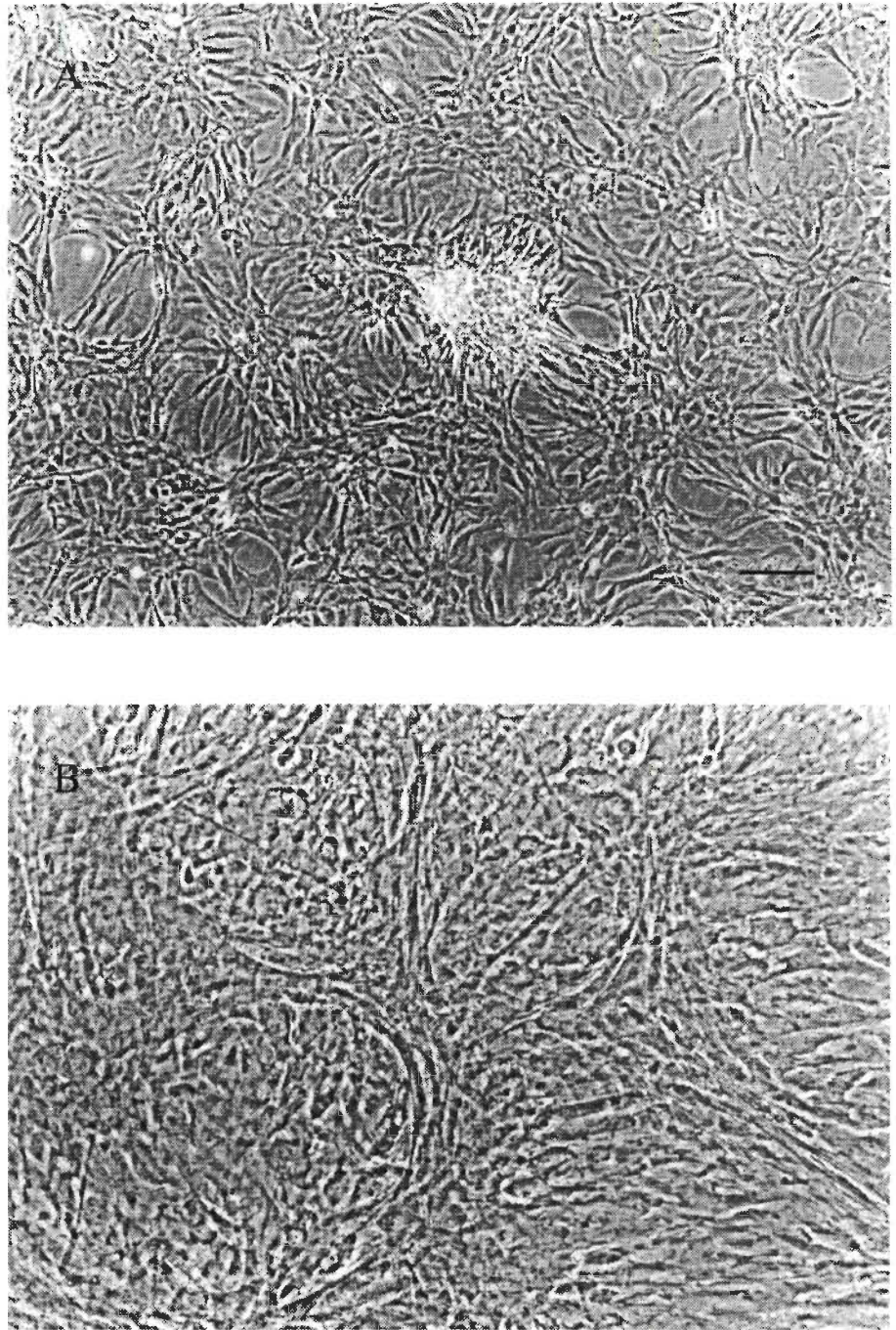
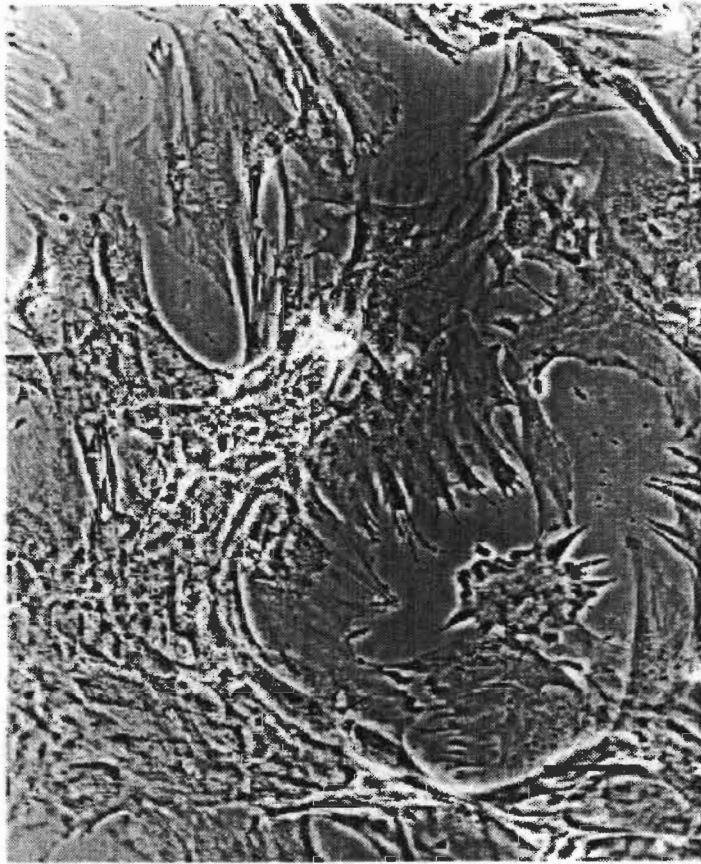


Figure 14. Photographies en contraste de phase de cellules de Müller humaines prises avec un objectif de 10X. A) Cellules de Müller humaines non-confluentes. B) Cellules de Müller humaines confluentes. Échelle = 85 $\mu$ m.

A)



B)

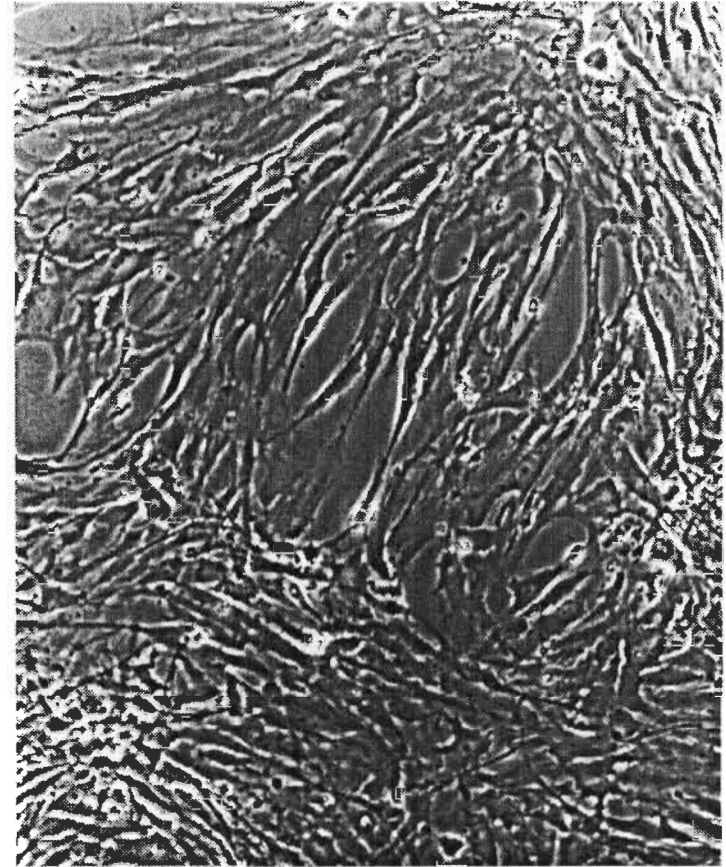


Figure 15. Comparaison entre les cellules de Müller de A) rats et B) humaines. Échelle = 40 $\mu$ m.

que les cellules de Müller de rats. C'est toutefois la seule différence notable, ces cellules étant comparables au niveau de leur morphologie cellulaire. On observe le noyau, les longs prolongements cytoplasmiques et les enchevêtrements de ces prolongements. Au niveau du comportement en culture, elles sont également comparables: les cellules sont très entassées, croissent en multicouches et forment des îlots de croissance.

Les cultures de cellules de Müller que nous obtenons sont des cultures primaires. Nous ne pouvons donc étendre ces cellules à l'infini, différemment des lignées cellulaires. Après un certain nombre de passages où on divise les cellules confluentes pour permettre leur multiplication en grandes quantités, qui varie d'un donneur à l'autre (certaines cultures pouvant subir un plus grand nombre de passages que d'autres), les cellules vont décoller d'elles-mêmes des boîtes de culture. Le nombre maximum de passages que nous avons obtenu pour un donneur est de 8 (P8). Nous avons déterminé qu'en moyenne ça prend environ 15 jours et plus pour obtenir une culture confluyente en P0, soit deux boîtes T-25 (25cm<sup>2</sup>). En considérant ce temps de division cellulaire très lent et le fait que l'on doit étendre les cellules jusqu'en P2 pour avoir une quantité de cellules suffisantes pour procéder aux transfections transitoires, le temps d'attente pour obtenir de belles cultures cellulaires est très long, ce qui a retardé beaucoup nos expériences. De ce fait, les cellules de Müller sont des cellules très difficiles à cultiver. De plus, nous avons déterminé que les donneurs doivent être âgés de 30 ans ou moins, étant donné que les cellules de Müller sont des cellules gliales, ce qui a limité l'accès au matériel biologique et a retardé l'avancement de nos travaux. Les cellules gliales peuvent se diviser seulement pendant un certain temps après la naissance (Reichenbach et Robinson, 1995), faculté qu'elles perdent avec l'âge.



Nous avons donc procédé à la mise en culture de cellules de Müller provenant de donneurs de différents âges, allant de la naissance à 87 ans. Les cellules qui ont réussi à se diviser provenaient de donneurs de 30 ans et moins, à quelques années près.

### 3.3 Caractérisation des cultures cellulaires

La microscopie en contraste de phase suggère qu'il s'agit de cellules de Müller (Figures 13-15) (Guidry, 1996 ; Hicks et Courtois, 1990 ; Lewis et al., 1988 ; Newman et Reichenbach, 1996). Pour confirmer qu'il s'agissait vraiment de cellules de Müller, nous avons procédé à la caractérisation du phénotype de ces cultures cellulaires. En utilisant des anticorps spécifiques aux cellules de Müller, nous avons pu confirmer le phénotype de ces cellules (Guidry, 1996; Lewis et al., 1988; Roque et Caldwell, 1990). Nous avons effectué ces expériences avec les anticorps anti-glutamine synthétase et anti-CRALBP. La glutamine synthétase est l'enzyme qui permet la transformation du glutamate en glutamine et elle est présente dans la rétine seulement au niveau des cellules de Müller. La CRALBP est une protéine de liaison pour le 11-cis-rétinol et le 11-cis-rétinaldéhyde. Elle agit comme un transporteur intracellulaire du rétinol et pour la présentation du substrat lors du processus de renouvellement des pigments visuels dans les cônes. La figure 16 présente les résultats des immunofluorescences indirectes effectuées avec l'anticorps anti-glutamine synthétase (Figure 16A) et l'anticorps anti-CRALBP (Figure 16B). L'expérience avec les contrôles nous permet de s'assurer que la fluorescence qui est émise n'est pas intrinsèque à la cellule ou qu'elle n'est pas due à un marquage non spécifique de l'anticorps secondaire. Le marquage indique qu'il y a eu liaison anticorps-antigène à la surface des cellules de Müller. Les cellules que nous avons isolées des rétines humaines sont donc des cellules de Müller.

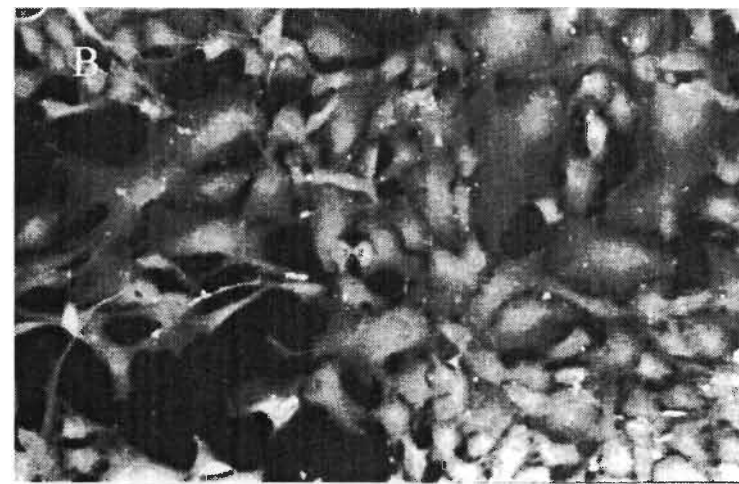
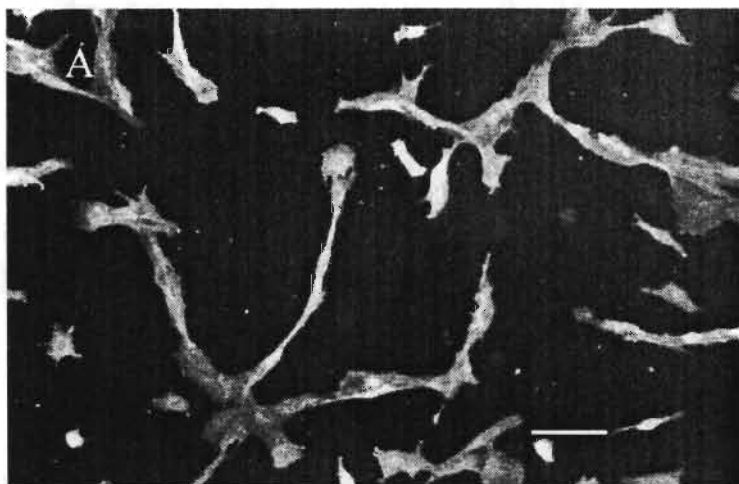


Figure 16. Caractérisation du phénotype des cellules de Müller en culture par la technique d'immunofluorescence indirecte : A) anticorps anti-glutamine synthétase, C) contrôle sans anticorps primaire, B) anticorps anti-CRALBP, D) contrôle sans anticorps primaire. Échelle = 85 $\mu$ m.

Ainsi, nous sommes les premiers à réussir à mettre en culture des cellules de Müller humaines.

### 3.4 Présence de la GFAP dans les cellules de Müller humaines

L'objectif du travail de recherche porte sur le gène de la GFAP. Nous avons donc vérifié par immunofluorescence indirecte si cette protéine était présente dans les cellules de Müller. Pour ce faire, nous avons procédé de la même façon que pour la caractérisation du phénotype des cellules de Müller, mais en utilisant cette fois un anticorps anti-GFAP. La figure 17A montre le marquage des cellules de Müller pour la protéine GFAP. Dans la littérature, il a été observé dans des coupes de rétine que la GFAP est absente ou exprimée en très faible quantité à la base des cellules de Müller dans des conditions normales, non pathologiques (Figure 8) (de Raad et al., 1996; Erickson et al., 1992; Lewis et al., 1995; Vaughan et al., 1990). Par contre, la figure 17 démontre qu'il y a présence de la GFAP dans les cellules de Müller en culture. Cette expérience ne nous permet toutefois pas de localiser précisément cette protéine dans les cellules, ni de la quantifier. On peut tout de même observer une forte expression de la GFAP qui suggère que la prolifération cellulaire dans ces cellules entraîne une expression anormale de cette protéine.

### 3.5 Présence de la GFAP dans d'autres types cellulaires

D'autres types de cellules ont été utilisées pour différentes expériences dans le cadre de ce travail. Il s'agit des cellules épithélioïdes de carcinome humain HeLa, des cellules rénales humaines 293T et des cellules hypophysaires de rats GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub>. Ce sont des lignées cellulaires

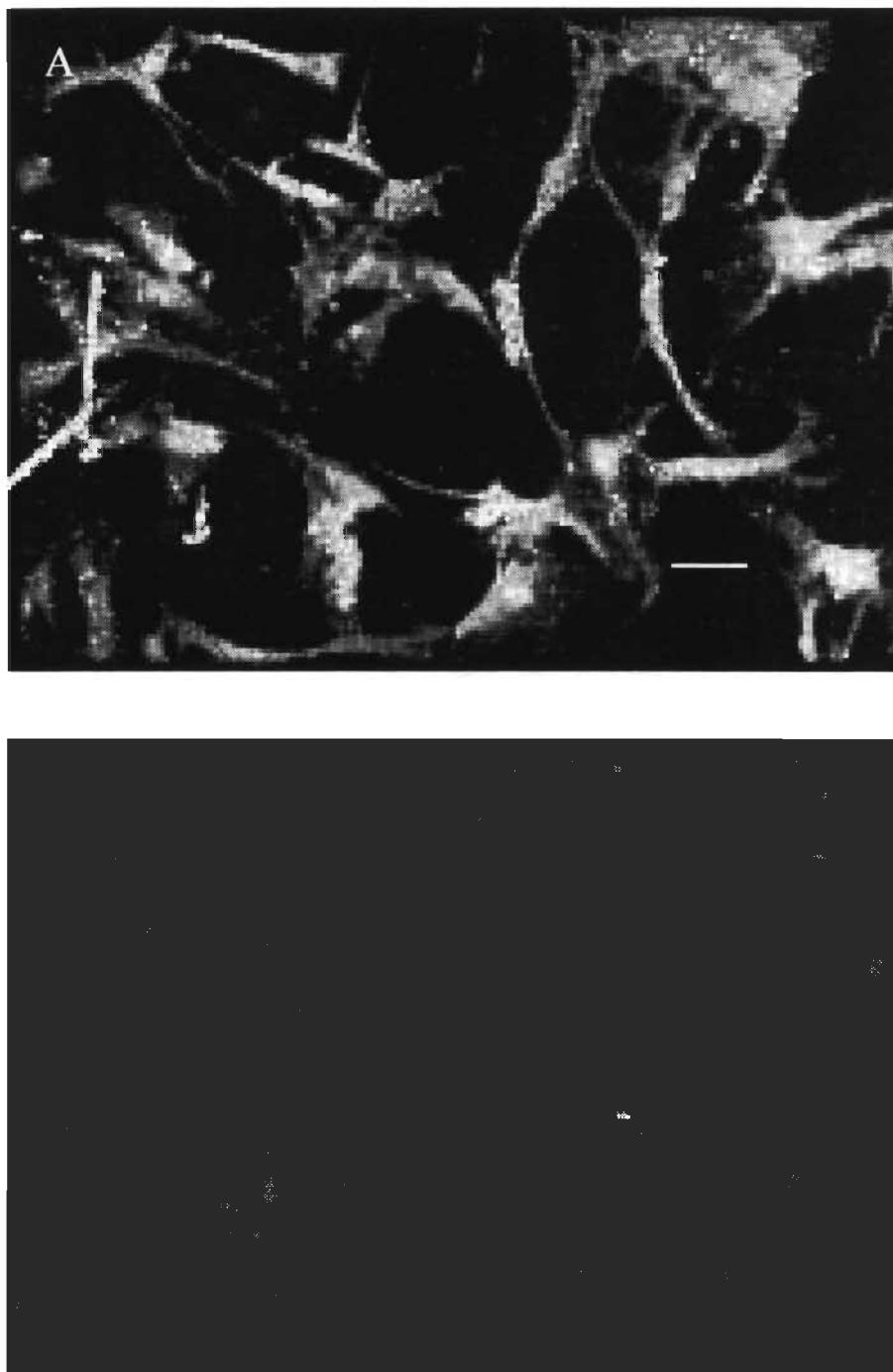


Figure 17. Présence de la GFAP dans les cellules de Müller humaines détectée par immunofluorescence indirecte : A) anticorps anti-GFAP, B) contrôle sans anticorps primaire. Échelle = 85 $\mu$ m.

bien établies, qui ne sont pas reconnues pour exprimer la GFAP. Nous avons donc vérifié par immunofluorescence indirecte si la protéine GFAP était présente dans ces cellules. La figure 18A montre les cellules HeLa où on n'observe aucun marquage pour la GFAP, le marquage étant très similaire au contrôle dans la figure 18B. La figure 18C présente la même expérience avec les cellules 293T où on n'aperçoit aucun marquage pour la GFAP puisque cette figure est très semblable au contrôle (Figure 18D). Les figures 18 E et F montrent, respectivement, les résultats obtenus avec les cellules GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> en présence et en absence d'anticorps anti-GFAP. Différemment des figures 18A-B et 18C-D, on note une fluorescence assez intense pour les figures 18E-F. Cependant, l'intensité de fluorescence semble similaire si on compare ces figures, ce qui suggère une adsorption non spécifique de l'anticorps secondaire. On peut donc déduire qu'il n'y a aucun marquage pour la GFAP dans les cellules GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub>. Dans les trois lignées cellulaires utilisées autres que les cellules de Müller, on n'observe pas la présence de la GFAP.

### 3.6 La localisation cellulaire de la GFAP dans les cellules de Müller par immunobuvardage de type Western

Par immunobuvardage de type Western, il est possible de déterminer la localisation cellulaire d'une protéine à l'aide d'un anticorps qui lui est spécifique. Pour ce faire, nous avons préparé des extraits cytosoliques, membranaires et nucléaires à partir de cellules de Müller humaines en culture qui ont été fractionnés sur un gradient de concentration de sucrose. Nous avons également déposé sur le gel d'acrylamide des extraits cellulaires des autres types de cellules que nous avons utilisés pour les expériences de transfections transitoires, soit les cellules 293T, GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> et HeLa. La figure 19 présente le résultat de

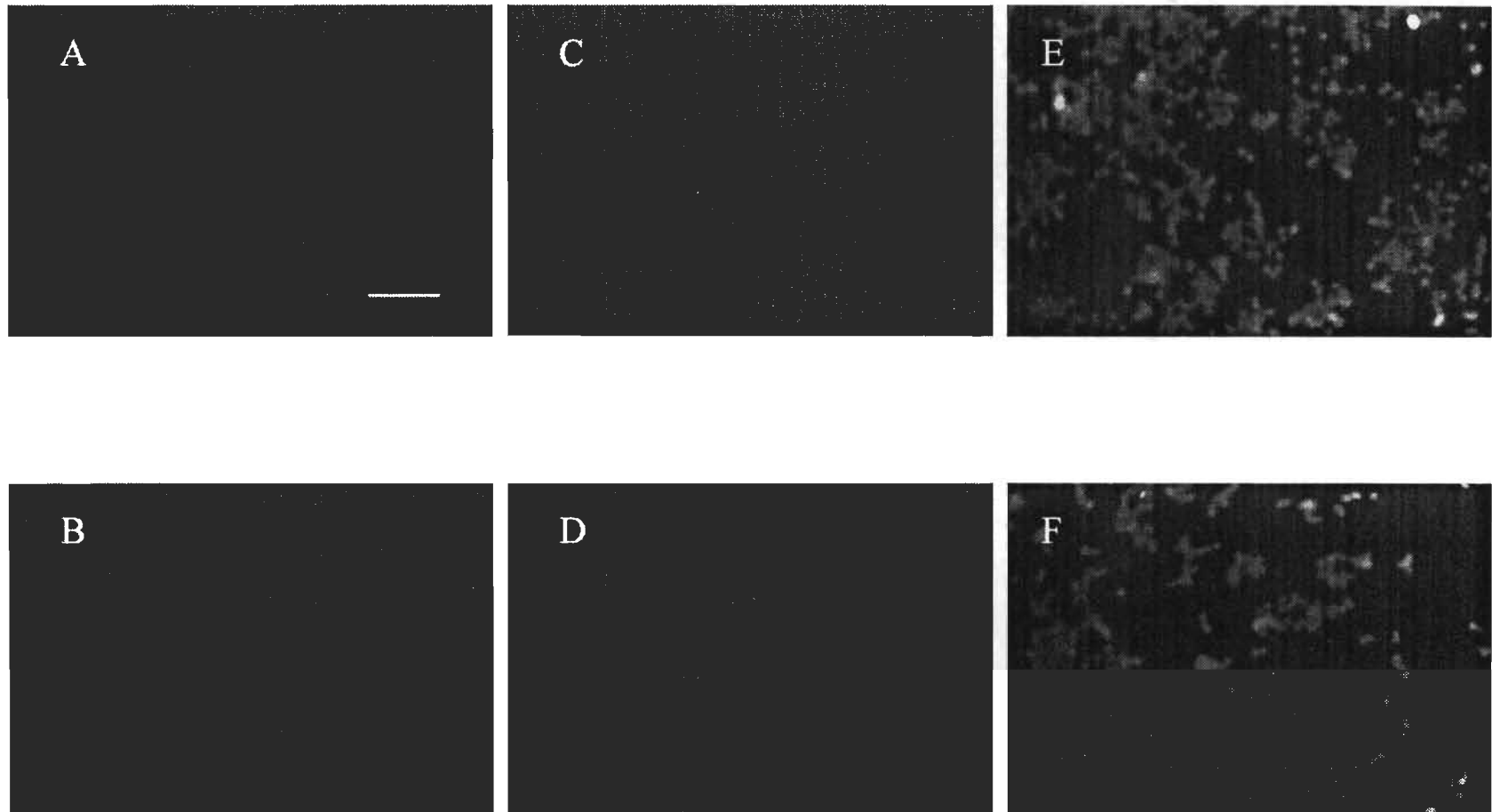


Figure 18. Présence de la GFAP dans les différentes lignées cellulaires utilisées (a-b, cellules 293T), (c-d, cellules HeLa), (e-f, cellules GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub>). Lorsqu'on compare les photos du haut (a-c-e, anticorps primaire) avec les photos du bas (b-d-f, contrôle sans anticorps primaire), on remarque qu'il n'y a pas présence de la GFAP dans ces lignées cellulaires. Échelle = 85µm.

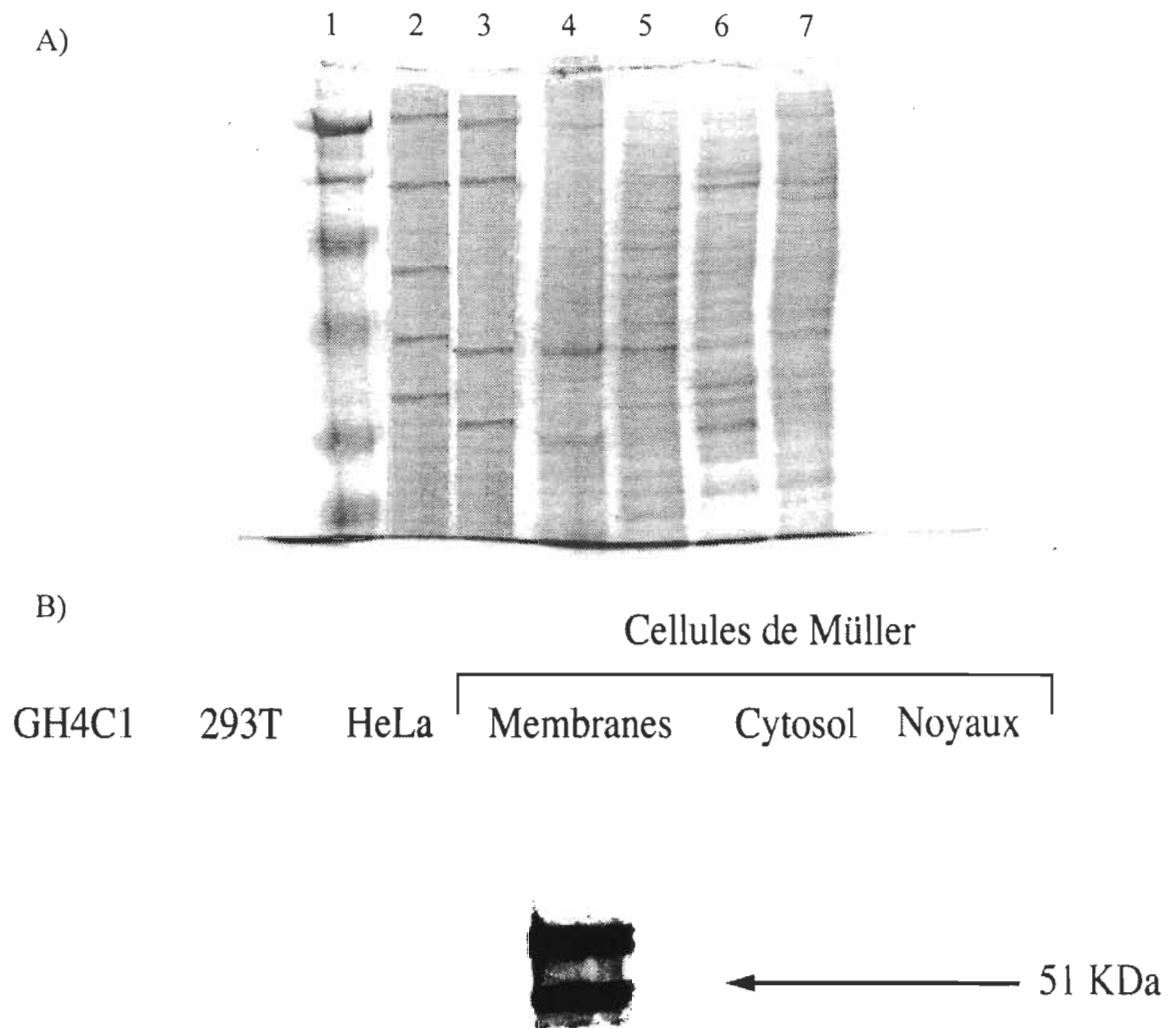


Figure 19. Résultats en immunobuvardage de type Western.

- A) Gel de polyacrylamide des échantillons pour le transfert Western après coloration au bleu de Comassie. 1) Standard de poids moléculaire, 2) extrait total des cellules GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub>, 3) extrait total des cellules 293T et 4) extrait total des cellules HeLa, 5) extrait membranaire, 6) extrait cytosolique et 7) extrait nucléaire des cellules de Müller.
- B) Transfert Western sur une membrane de nitrocellulose et réaction avec l'anticorps polyclonal anti-GFAP. La GFAP est associée aux membranes des cellules de Müller et n'est pas exprimée par les cellules HeLa, GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> et 293T.

l'immunobuvardage de type Western. La figure 19A présente le gel de polyacrylamide coloré au bleu de Comassie sur lequel les extraits cellulaires ont été déposés pour le transfert Western. Suite au transfert sur la membrane de nitrocellulose et à l'incubation avec l'anticorps anti-GFAP, une seule bande est révélée sur le film. Cette bande correspond à la GFAP. Elle possède un poids moléculaire d'environ 51kDa et correspond au puits où les extraits membranaires ont été déposés. Le patron de cette bande correspond aux données de la littérature (Guidry, 1996). En effet, elle apparaît sous la forme d'un doublet. La bande du haut pourrait correspondre à une modification post-traductionnelle de type phosphorylation ou glycosylation (voir section 1.4.2.2). Il est donc possible d'affirmer que la GFAP est une protéine associée aux membranes. Pour les protéines 293T, GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> et HeLa, les résultats de l'immunobuvardage de type Western sont en accord avec les résultats obtenus en immunofluorescence indirecte. Lors de cette expérience, nous n'avons pu détecter la présence de la GFAP dans ces types de cellules.

### 3.7 Mesure semi-quantitative de l'ARNm de la GFAP par RT-PCR

La technique de RT-PCR permet la mesure semi-quantitative de l'ARNm. Nous voulions de cette façon prouver notre hypothèse selon laquelle plus les cellules vieillissent (grand nombre de passages), plus elles sont susceptibles de subir des dommages. Puisque la GFAP est présente lors de dommages ou de pathologies, il devrait y avoir une plus grande présence de cette protéine avec le nombre de passages. Comme décrit dans la section 2.6.3 nous avons tout d'abord extrait l'ARNm de cellules de Müller en culture que nous avons amplifié par PCR. À l'aide d'amorces, nous avons amplifié un fragment de 358pb de la GFAP. Nous avons procédé à l'extraction de l'ARNm de cellules de Müller lors de



passages P2 à P6. La figure 20 présente le résultat de la RT-PCR de la GFAP lors des différents passages. La figure 20A montre que la même quantité d'ARNm a été utilisée pour l'amplification en PCR. La figure 20B présente le résultat du RT-PCR. On observe que l'intensité de la bande de la GFAP augmente avec le nombre de passages. Nous avons utilisé l'ARNm de l'actine comme contrôle. Cet ARNm est amplifié de la même façon que l'ARNm de la GFAP en suivant les mêmes paramètres. Puisque l'ARNm de l'actine se situe au bon endroit et que son intensité ne varie pas avec le nombre de passages, nous pouvons affirmer que les résultats obtenus avec l'ARNm de la GFAP sont fiables et que la différence d'intensité observée n'est pas due à un artefact expérimental lors de l'amplification PCR. Nous pouvons conclure que notre hypothèse, selon laquelle plus les cellules subissent de passages (cellules qui correspondraient à des cellules de plus en plus vieilles et pathologiques), plus elles transcrivent l'ARNm de la GFAP en comparaison avec des cellules jeunes, est valable.

### 3.8 Transfections transitoires avec les cellules de Müller humaines

Puisque les cellules de Müller humaines étaient très difficiles à transfecter, nous avons dû essayer différentes méthodes de transfection. Au total, nous avons essayé 5 méthodes différentes. Tout d'abord, nous avons procédé par la méthode du précipité de phosphate de calcium dont le mécanisme sous-jacent est l'endocytose et nous n'avons pas obtenu de résultats satisfaisants. Le deuxième composé utilisé pour la transfection est un produit commercial, la lipofectamine, dont le mécanisme est la formation de liposomes; ce composé n'a pas permis d'obtenir de résultats. Le troisième composé est le polyéthylène imine, dont le mécanisme est inconnu, mais que l'on croit semblable à la lipofectamine;

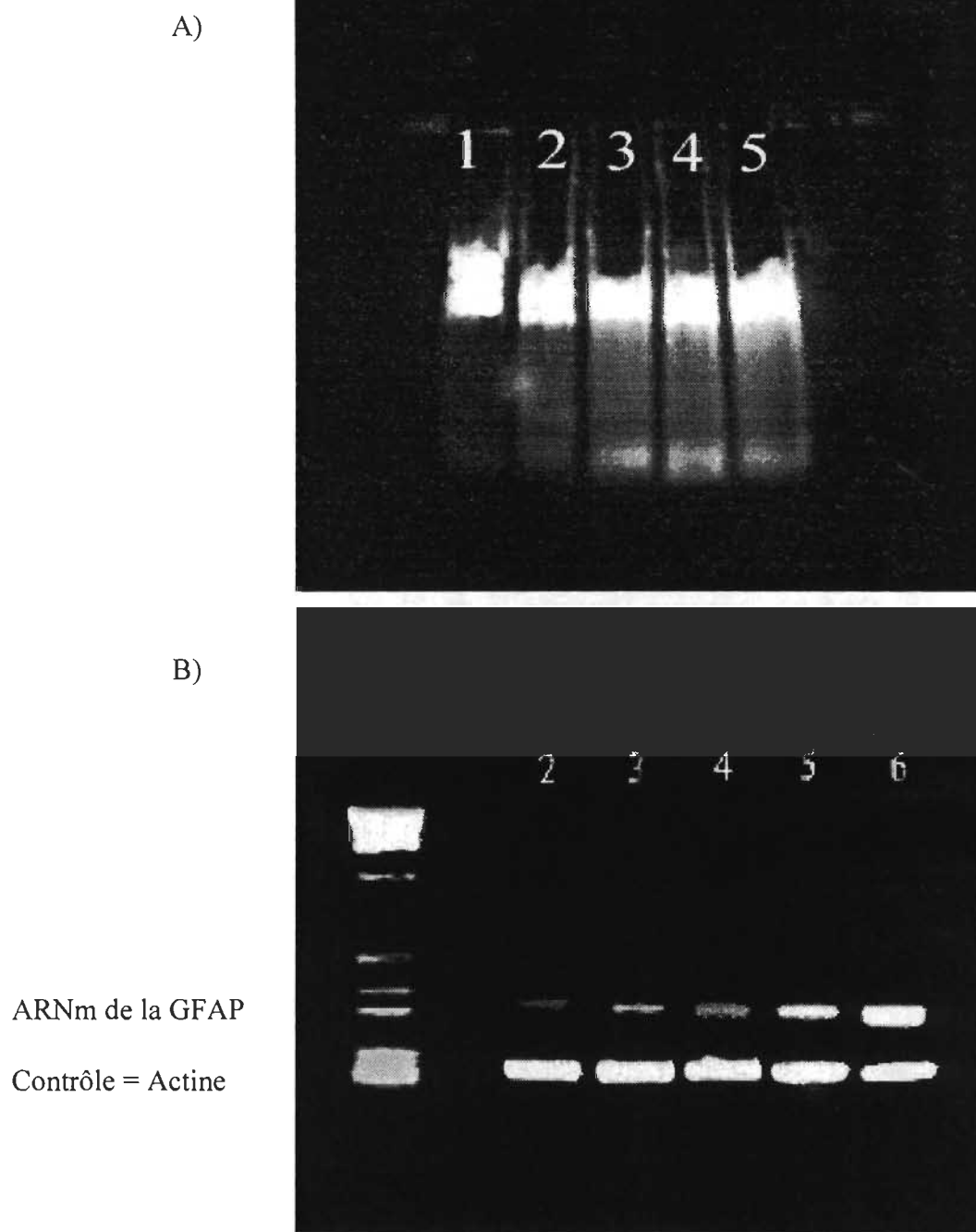


Figure 20. Mesure semi-quantitative de l'ARNm de la GFAP par RT-PCR.

A) Puits 1 à 5 : dépôt des échantillons d'ARN utilisés pour le RT-PCR.

B) Réaction RT-PCR : puits 1, standard de poids moléculaire; puits 2 à 6, passages P2 à P6 des cellules de Müller humaines. La première bande à partir du haut du gel, correspond à l'ARNm amplifié de la GFAP, la deuxième bande est l'actine que l'on utilise comme contrôle.

nous n'avons pas obtenu de résultats satisfaisants. Ensuite, nous avons utilisé la technique de l'électroporation qui mène à la formation de pores dans les membranes, ce qui permet une meilleure incorporation du plasmide dans les cellules. Cette technique nous a permis de détecter l'activité du promoteur de la GFAP dans les cellules de Müller. Nous avons toutefois abandonné l'idée d'utiliser cette technique, car elle nécessite une très grande quantité de cellules, soit environ 5 millions de cellules pour chaque transfection. Il est important de mentionner que chaque transfection doit être réalisée en triplicat pour chacun des plasmides que nous voulons étudier. Il était donc impossible d'envisager l'utilisation de cette technique avec les cellules de Müller humaines en considérant les problèmes d'approvisionnement et de vitesse de croissance de ces cellules (voir section 3.2). Grâce à cette dernière technique, nous avons tout de même pu conclure que le facteur limitant pour l'incorporation des plasmides dans les cellules était la difficulté de perméabiliser les membranes des cellules. Nous sommes donc revenus à notre technique de transfection de départ, soit le précipité de phosphate de calcium, auquel nous avons ajouté un traitement au glycérol, 4 heures après la transfection, dans le but de perméabiliser les membranes. Cette fois-ci nous avons la bonne méthode transfection et nous avons été capables de mesurer l'activité du promoteur de la GFAP.

Pour les transfections transitoires dans les cellules de Müller, nous avons utilisé les constructions pGfaCAT qui nous ont été fournies par le Dr. M. Brenner (Figure 11). Les activités de ces plasmides sont dosées avec la chloramphénicol acétyl transférase (section 2.8.1.1) et normalisées avec l'hormone de croissance humaine (section 2.8.1.2). Les plasmides pGfaCAT sont divisés en deux séries, soit une série ayant une extrémité 3' de

+47 et l'autre série une extrémité de +88 en 3'. Le tableau 2 présente les valeurs brutes d'activité CAT/hGH obtenues avec les différents plasmides pGfaCAT dans les cellules de Müller et les différentes lignées cellulaires étudiées. Des changements significatifs de valeur CAT/hGH sont observés pour la série de plasmides +47. La séquence minimale requise pour obtenir une activité maximale du promoteur de la GFAP est de 132pb. Toutefois, nous ne pouvons qu'émettre une hypothèse à ce sujet, étant donné que nous n'avons pas de construction plasmique de plus courte longueur. C'est pour déterminer hors de tout doute la séquence minimale que nous entreprendrons la construction de plus petits fragments du gène de la GFAP dans nos travaux futurs. Les résultats présentés à la figure 21 démontrent que le promoteur de la protéine GFAP est actif dans les cellules de Müller avec une activité maximale de 2096 (CAT/hGH, voir tableau 2) qui est obtenue avec le fragment le plus long du promoteur de la GFAP de 2163pb. On peut également soupçonner la présence de deux éléments de régulation positifs entre les positions -132pb à -211pb et entre -211pb à -2163pb. Les résultats, pour la série de plasmides +88 sont présentés à la figure 21B. Les résultats obtenus avec ces plasmides nous ont permis d'identifier un élément de régulation négatif entre les positions -1660pb et -1735pb. De plus, une baisse d'activité est aussi détectée pour le promoteur le plus long de 2163pb. Cette valeur est de 2096 pour la série +47 et de 709 pour la série +88. Cette dernière donnée suggère la présence d'un élément de régulation négatif entre les positions +47pb à +88pb.

Afin de comparer les résultats de transfections transitoires entre les différents types cellulaires utilisés, nous avons effectué des transfections des cellules 293T et GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub>

Tableau 2  
 Compilation des résultats de valeurs CAT/hGH  
 obtenues en transfection transitoire pour les plasmides pGfaCAT  
 dans les cellules de Müller ainsi que deux lignées cellulaires

pGfaCAT	Cellules de Müller	Cellules 293T	Cellules GH <sub>4</sub> C <sub>1</sub>
Série +47			
-132	264	15	43
-211	704	34	50
-2163	2096	2.14	48
Série +88			
-638	1193	2.72	37
-870	1108	0.1	49
-1660	1070	1.8	14
-1735	703	19	4.47
-2163	709	0.5	12

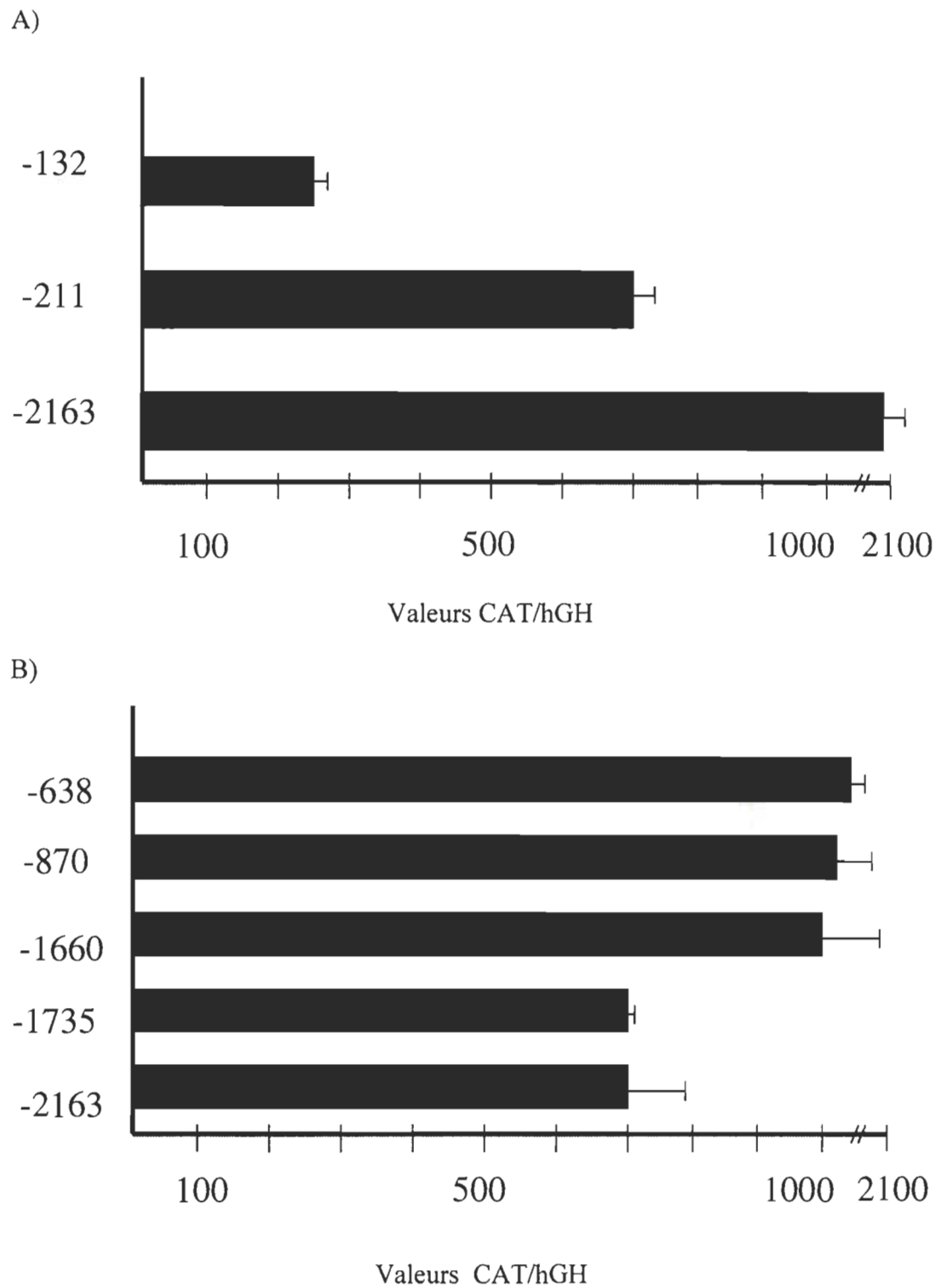


Figure 21. Résultats des transfections des cellules de Müller humaines avec les plasmides pGfaCAT en A) avec la série +47 et en B) avec la série +88.

avec les plasmides pGfaCAT. Nous n'avons pas utilisé cette fois-ci les cellules HeLa, contrairement aux expériences d'immunofluorescence indirecte et d'immunobuvardage de type Western (sections 3.3 et 3.6) car, suite à des expériences préliminaires avec les cellules HeLa, nous n'avons pu mesurer aucune activité pour les plasmides de la GFAP, nous avons donc poursuivi les transfections avec les cellules 293T et GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub>. Les figures 22 et 23 présentent graphiquement ces résultats, alors que le tableau 2 permet de comparer numériquement les résultats obtenus entre les différents types cellulaires. Dans les lignées cellulaires 293T et GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub>, le promoteur de la GFAP n'est pas actif (Figures 22 et 23). Pour la série +88, aucun changement de valeur CAT/hGH appréciable est détecté dans les lignées cellulaires (Figures 22B et 23B). Les valeurs de CAT/hGH pour les cellules de Müller sont 1000 fois supérieures à celles obtenues pour les lignées cellulaires.

Pour conclure, cette étude a permis de démontrer l'expression du gène de la protéine GFAP dans les cellules de Müller humaines. La séquence promotrice minimale nécessaire pour l'activité de la protéine est de 132pb. Des études ultérieures vont nous permettre de confirmer cette séquence et d'identifier de façon précise les zones de régulation positives ou négatives par la construction de fragments de différentes longueurs en 5' et portant +47pb en 3'. De plus, cette étude a révélé la présence d'un élément de régulation négatif entre les positions +47pb et +88pb. Ce résultat est surprenant, car les éléments de régulation qui ont une grande influence sur l'activité du promoteur sont ceux qui sont situés dans les 100 premières paires de base de la boîte TATA. La boîte TATA pour le gène de la GFAP est située 25 paires de base en 5' du site d'initiation de la transcription (Nakatani et al., 1990b). Ainsi, un élément situé si loin en 3' ne devrait pas avoir une si forte influence

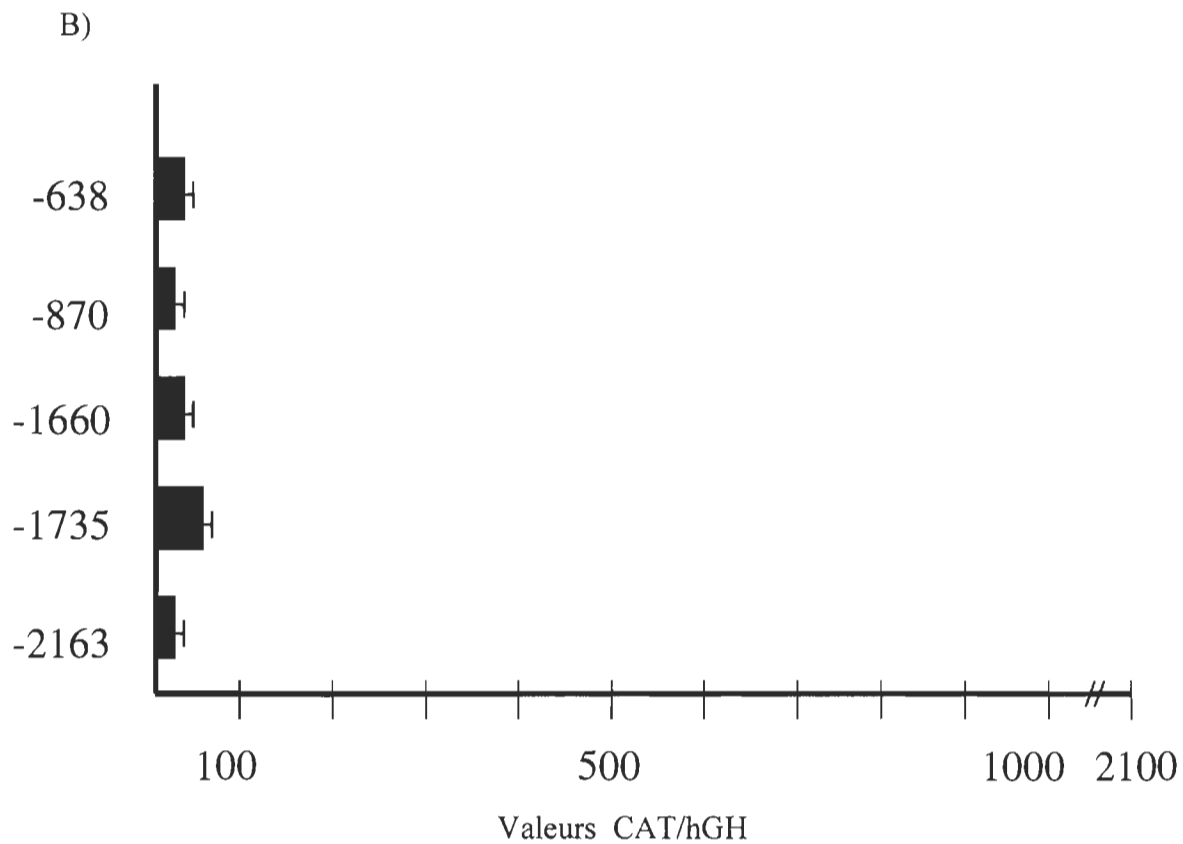
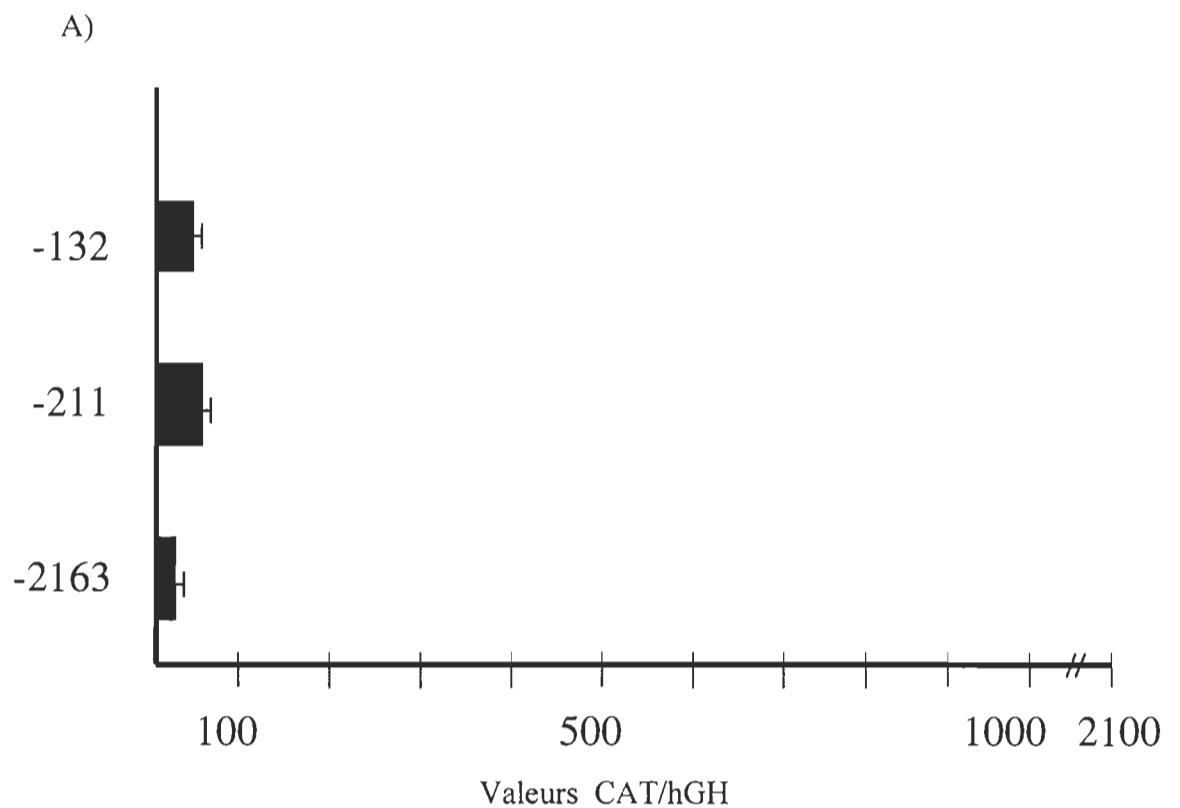


Figure 22. Résultats des transfections des cellules 293T avec les plasmides pGfaCAT avec A) la série +47 et avec B) la série +88.



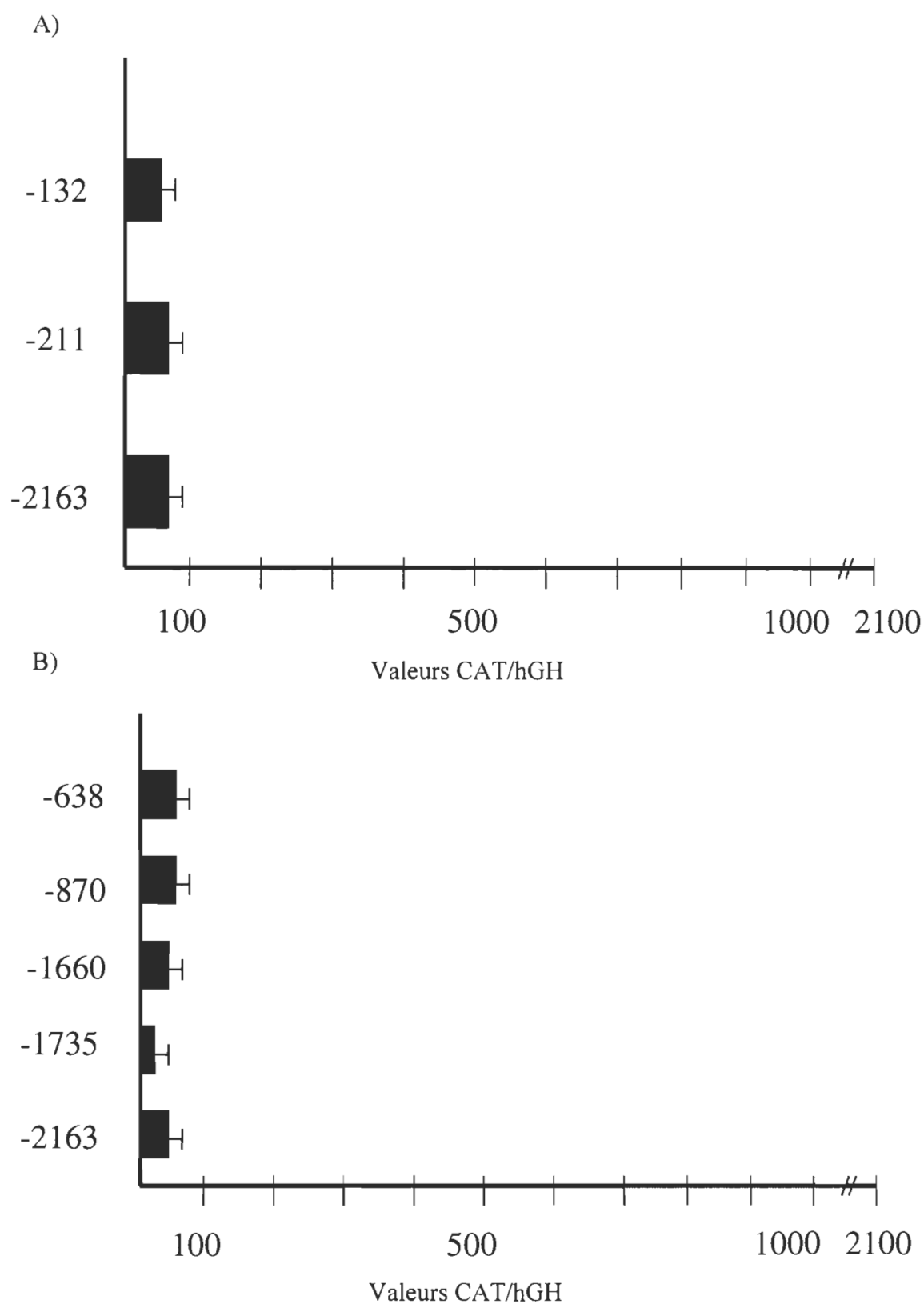


Figure 23. Résultats des transfections des cellules GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> avec les plasmides pGfaCAT avec A) la série +47 et avec B) la série +88.

sur l'activité du promoteur. Cependant, le gène de la GFAP, tout comme celui du virus Epstein-Barr et le gène Myc (Nakatani et al., 1990a), possède un initiateur de la transcription en 3' du site d'initiation de la transcription. L'initiateur en 3' pour le gène de la GFAP est situé entre les positions +11pb et +50pb. Cet initiateur peut à lui seul initier la transcription du gène lorsqu'il y a délétion de la boîte TATA (Nakatani et al., 1990b). Il est donc plausible de soupçonner la présence d'un élément de régulation négatif important entre les positions +47pb et +88pb qui sont situées dans les 100 paires de base entourant cet initiateur en 3'.

## CHAPITRE 4

### PERSPECTIVES DE RECHERCHE

#### 4.1 Présence de la GFAP dans le mélanome uvéal

Dans le mélanome uvéal, il arrive souvent que des décollements de rétine rhégmateux surviennent. Dans la littérature, il a été démontré que la GFAP est présente lors de décollements de rétine (de Raad et al., 1996; Erickson et al., 1987; Guerin et al., 1990; Lewis et al., 1995). Il était alors intéressant de déterminer si la GFAP était présente dans les cas de décollements de rétine rhégmateux de patients atteints de mélanome uvéal. Nous avons obtenu des coupes de rétine provenant de patients atteints de mélanome uvéal et ainsi que de patients normaux.

Par la technique d'immunohistochimie à l'aide d'un anticorps anti-GFAP, il a été possible d'observer la présence de la GFAP dans ces coupes de rétine. La figure 24A présente le résultat de la réaction sur une coupe de rétine de mélanome uvéal, alors que la figure 24B montre un contrôle sans anticorps primaire. On peut voir en figure 24A que la coloration brune, qui signifie qu'il y a reconnaissance de la GFAP, s'étend sur toute l'épaisseur de la rétine et sur toute la longueur des prolongements cytoplasmiques des cellules de Müller. Il y a donc présence de la GFAP dans le mélanome uvéal. Les figures 24C et D présentent des coupes de rétine provenant d'un patient normal. À la figure 24C, on n'observe aucune coloration en présence de l'anticorps anti-GFAP. La figure 24D présente le résultat du contrôle sans anticorps primaire. Il n'y a donc pas de GFAP chez le patient normal.

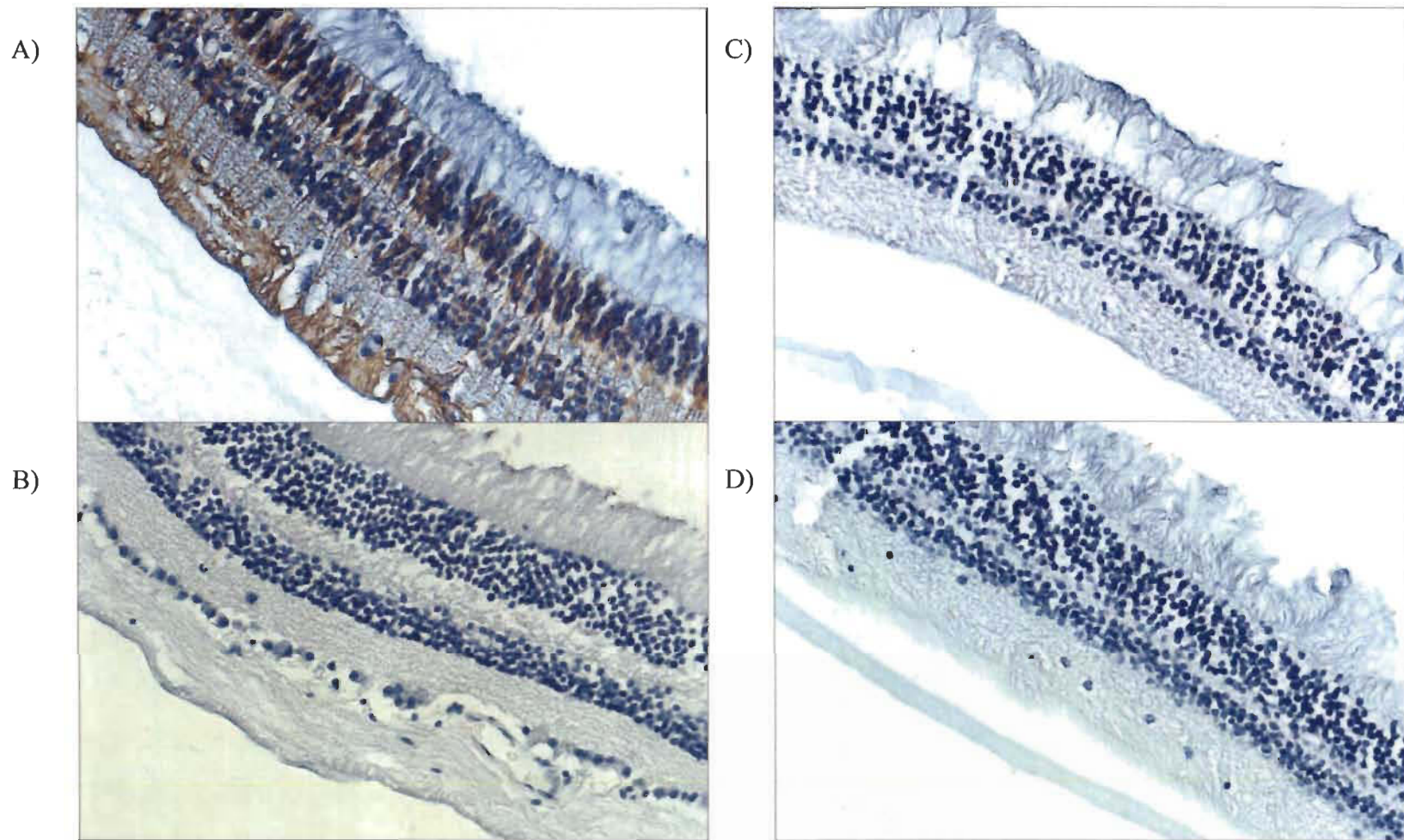


Figure 24. Détection de la GFAP par immunohistochimie sur une coupe de rétine provenant d'un patient atteint de mélanome uvéal (A et B) versus une coupe de rétine non pathologique (C et D). En A), détection de la GFAP ; en B), contrôle sans anticorps primaire ; en C), rétine non pathologique, (absence de la GFAP) ; en D) contrôle sans anticorps primaire.

La présence de la GFAP est-elle due aux changements qui se produisent dans la rétine lors d'un mélanome de l'uvée ou sa présence est-elle détectable lors du décollement de la rétine seulement ? Cette question devra être élucidée. Pour le moment, nous n'avons pas encore obtenu de coupe de rétine de mélanome uvéal sans décollement de la rétine rhégmateux ou encore les rétines avaient été soumises à des traitements radioactifs quelconques dans le but de guérir le mélanome uvéal. Si on parvient à déterminer la source de la présence de la GFAP (mélanome versus décollement de rétine) et que le mélanome seul s'avère être cette source, la GFAP pourrait alors devenir un outil de diagnostic intéressant pour cette pathologie oculaire, comme elle l'est pour les cas de gliome au niveau du cerveau. Nous poursuivrons, donc ce travail avec d'autres coupes de rétines.

## 4.2 Étude de l'expression de la GFAP dans les cellules de Müller humaines

### 4.2.1 Identification des protéines nucléaires se liant au promoteur de la GFAP

L'étude du promoteur de la GFAP réalisée dans le cadre de ce mémoire a permis d'identifier certaines zones de régulation importantes. Mon objectif de recherche futur consistera à identifier les facteurs de transcription associés à ces zones de régulation ainsi que les séquences cibles reconnues par les facteurs de transcription qui sont responsables de la régulation de l'expression de la GFAP. Cet objectif sera réalisable en exploitant les techniques de dépistage des interactions ADN-protéine telles que la rétention en gel, en utilisant des extraits nucléaires préparés à partir des cultures primaires de cellules de Müller, ainsi que par des essais d'empreintes à la DNaseI et d'interférence de méthylation au diméthyl sulfate qui permettront d'identifier les cibles dans l'ADN du promoteur de la

GFAP qui sont reconnues par les facteurs de transcription (Audet et al., 1994; Laniel et al., 1997).

Suite à ces expériences, il faudra développer une stratégie de mutagenèse dirigée pour évaluer la fonction régulatrice (positive ou négative) exercée par ces protéines nucléaires sur l'activité du promoteur de la GFAP.

Une seule étude a été réalisée avec le promoteur du gène de la GFAP humaine à partir d'astrocytes du cerveau (Besnard et al., 1991). Les résultats de cette étude ont été présentés à la section 1.5.2.1 Les auteurs ont identifié 4 régions cibles associées à des facteurs de transcription connus, soit NF-1, AP-1, AP-2 et SP-1. Il serait fort intéressant de poursuivre les études sur le promoteur de la GFAP dans les cellules de Müller humaines pour déterminer les régions cibles et les facteurs de transcription associés à ces régions pour ensuite comparer les résultats obtenus avec l'étude de Besnard et al. (1991). Puisqu'il s'agit de deux types de cellules différentes (cellules de Müller vs astrocytes) qui proviennent de tissus différents (rétine vs cerveau), il est possible que les résultats soient différents.

#### 4.2.2 Les différents facteurs qui influencent l'expression de la GFAP

Certains facteurs de croissance ont été reconnus comme ayant une influence sur l'expression de l'ARNm et de la protéine GFAP. Les résultats des études présentés dans cette section ont tous été obtenus avec des astrocytes du cerveau et ce dans différentes

espèces animales. Le facteur le plus étudié est le «transforming growth factor  $\beta 1$ » (TGF- $\beta 1$ ), qui fait partie de la superfamille TGF- $\beta$  elle-même composée de nombreuses sous-classes fonctionnelles et structurelles et qui ont des rôles de croissance-inhibition pour les cellules, des effets sur la régulation du développement, de modulation de la matrice extracellulaire et dans la différenciation terminale (Jones et al., 1998; Laping et al., 1994; Reilly et al., 1998). Le TGF- $\beta 1$  est reconnu pour inhiber la prolifération des astrocytes et des cellules microgliales (Jones et al., 1998) et pour induire l'expression de la GFAP *in vivo* (Reilly et al., 1998) et *in vitro* (Laping et al., 1994). Le TGF- $\beta 1$  joue un rôle au niveau de la régulation du promoteur de la GFAP en augmentant l'expression de son ARNm, suite à l'action des astrocytes en réponse à une blessure au niveau du système nerveux central (SNC) (Gomes et al., 1999; Krohn et al., 1999). Une courte région proximale au site d'initiation de la transcription a été identifiée sur le promoteur de la GFAP de rat de -106pb à -53pb comme étant très importante pour l'action du TGF- $\beta 1$ . Cette région contient un motif de séquence qui chevauche un site de liaison NF-1 et un site de liaison NF- $\kappa$ B (Krohn et al., 1999). Le haut taux d'ARNm et de protéine GFAP présent dans les cicatrices gliales suggère un rôle pour TGF- $\beta$  comme facteur de régulation de la GFAP et pour la formation de cicatrices dans les phénomènes de glioses (Gomes et al., 1999).

D'autres cytokines ont des effets positifs sur la régulation de l'expression de la GFAP. Il s'agit du «basic fibroblast growth factor» (bFGF) et du «ciliary neurotrophic factor» (CNTF) qui augmentent l'expression de la GFAP. Le bFGF amène une augmentation de la

GFAP après un traumatisme au cerveau et lors de tumeurs cérébrales. Il jouerait un rôle dans la régénération nerveuse et dans la formation des tumeurs (Gomes et al., 1999). Le CNTF est reconnu pour avoir une action pléiotropique sur plusieurs cellules gliales et neuronales. Par une action directe du CNTF sur le promoteur du gène de la GFAP, la GFAP pourrait induire des changements morphologiques dans les astrocytes en réponse à une blessure du SNC (Gomes et al., 1999).

Certaines cytokines ont un effet négatif sur la régulation de l'expression de la GFAP au niveau des astrocytes du cerveau. Il s'agit principalement de l'interleukine 1 (IL-1) et du «tumor necrosis factor» (TNF- $\alpha$ ) (Gomes et al., 1999). Ces deux cytokines agissent sur la régulation du promoteur de la GFAP en exerçant un effet négatif qui amène une baisse de l'ARNm de la GFAP en réponse à un traumatisme neurologique. IL-1 a un effet contraire au TGF- $\beta$ 1. On retrouve dans le promoteur de la GFAP une région proximale du site d'initiation de la transcription très importante pour l'activité de IL-1 qui est la même que celle pour l'activité de TGF- $\beta$ 1, soit de -106pb à -53pb (Krohn et al., 1999).

L'étude de Laping et al. (1994), réalisée sur les astrocytes du cerveau de rats et de souris, a démontré qu'il existe une relation entre le vieillissement et l'augmentation de la GFAP. La cause serait une action locale et systémique de certaines hormones et également en réponse à des changements d'activité neuronale. Plusieurs hormones sont déjà reconnues dans la littérature pour avoir un effet sur la régulation de l'expression de la GFAP (Laping et al., 1994). Le traitement des astrocytes avec les hormones thyroïdiennes (T3) amène la



sécrétion de facteurs de croissance (EGF et TGF- $\beta$ 1) qui ont une action autocrine sur les astrocytes et une action paracrine sur les neurones (Gomes et al., 1999). Les glucocorticoïdes sont également reconnus pour inhiber l'expression de la GFAP autant au niveau de l'ARNm que de la protéine (De Nicola et al., 1998; Gomes et al., 1999; O'Callaghan et al., 1989).

En conclusion, il serait intéressant de déterminer si ces facteurs de croissance et cytokines ont un effet sur l'expression de la GFAP dans les cellules de Müller humaines. Cette étude pourrait être réalisée, en ajoutant au milieu de culture des cellules de Müller, ces facteurs de croissance et cytokines individuellement et, par la suite, d'observer en transfection transitoire s'il y a un effet sur l'expression de la GFAP.

#### 4.3 Implication de la GFAP dans la rétinopathie diabétique

La rétinopathie diabétique (section 1.6.2) est une pathologie dont un des effets secondaires importants est le décollement de la rétine. Plusieurs études ont montré que la GFAP est présente suite aux décollements de rétine (section 1.6.1) (Klein et Klein, 1997; Lieth et al., 1998; Mizutani et al., 1998; Schellini et al., 1995). Nous avons voulu étudier la régulation transcriptionnelle du gène de la GFAP provenant de patients diabétiques dans les cellules de Müller et comparer ces résultats avec ceux obtenus dans les cellules de Müller de patients non atteints de cette pathologie. Nous avons tout d'abord procédé à la mise en culture des cellules de Müller provenant de patients diabétiques de type II. Le comportement de ces cellules est différent de celui des cellules provenant de patients

normaux. La figure 25A présente des photos des cellules de Müller normales prises en contraste de phase, c'est-à-dire provenant de patients dits normaux, alors que la figure 25B présente des cellules de Müller provenant de patients diabétiques. Les patients dont on compare les photos des cellules de Müller étaient tous deux âgés de 78 ans. Les cellules ont été mises en culture durant la même période de temps, soit un mois. On observe une très grande différence au niveau de la prolifération des cellules. Pour un patient de 78 ans, on ne s'attend pas à ce qu'il y ait prolifération cellulaire (voir section 3.3). À cet âge, les cellules de Müller n'ont plus la capacité de se multiplier. C'est ce qu'on observe à la figure 25A. Seulement quelques cellules ont adhéré à la surface de la boîte de culture, mais elles ne prolifèrent pas. Toutefois, la figure 25B montre que les cellules de Müller provenant de patients diabétiques ont atteint la confluence. Il y a donc eu prolifération cellulaire. Ainsi, il y a une grande différence au niveau de la prolifération des cellules de Müller entre les cellules provenant de patients atteints de diabète de type II et celles provenant de patients normaux. Nous avons présenté dans cette section un seul cas de patient diabétique versus un patient normal. Toutefois, l'expérience a été répétée plusieurs fois et on observe toujours le même comportement.

Suite à ces résultats, nous avons voulu vérifier si la GFAP pourrait être impliquée dans ce processus de prolifération cellulaire. Nous avons procédé à la transfection transitoire des cellules de Müller de patients diabétiques par la même méthode de transfection que pour les cellules de Müller normales (section 3.8). Nous n'avons obtenu aucun résultat avec les cellules de Müller de patients diabétiques car, suite au traitement des cellules avec le précipité de phosphate de calcium, elles sont devenues filamenteuses et, à la suite du

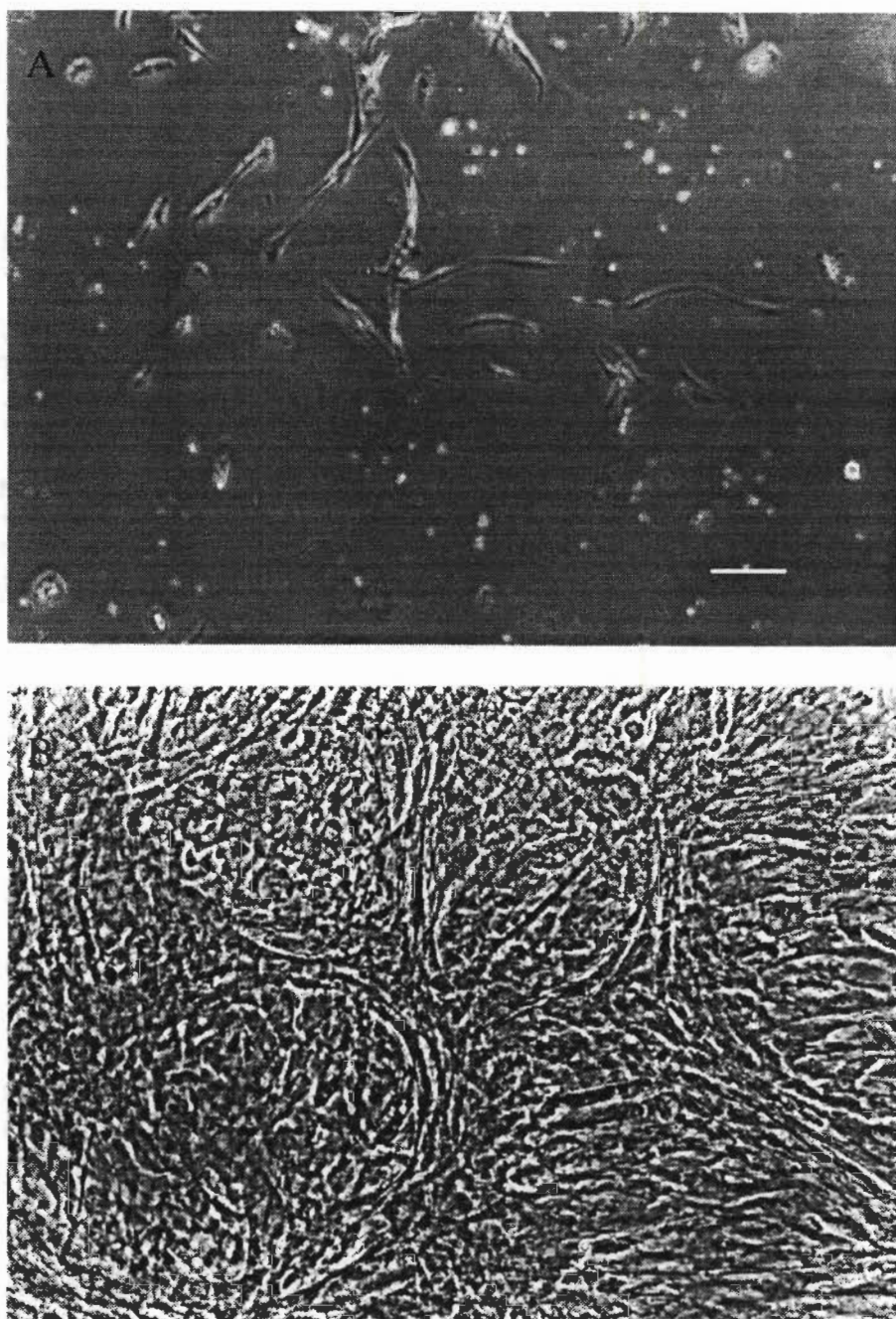


Figure 25. Photographies en contraste de phase avec un objectif de 10X, de cellules de Müller de patients normaux (A) et de patients diabétiques (B). Échelle = 85 $\mu$ m.

traitement au glycérol, elles ont décollé de la surface des pétris. Aucune activité CAT/hGH n'a pu être mesurée car les plasmides n'ont pu être insérés dans les cellules de Müller. Ce résultat peut être expliqué par l'âge trop avancé des donneurs. Les donneurs diabétiques de type II sont âgés en moyenne de plus de 70 ans. Les cellules de Müller sont alors vieilles et leurs membranes sont plus fragiles et elles éclatent suite à l'action de l'agent transfectant. Pour réussir ce type d'expérience, il faudrait obtenir des cellules provenant de donneurs beaucoup plus jeunes, les membranes cellulaires seraient alors beaucoup plus résistantes.

Pour poursuivre les expériences avec des cellules provenant de patients diabétiques, il faudrait obtenir des cellules provenant de patients souffrant de diabète de type I. Les patients atteints de ce type de diabète sont beaucoup plus jeunes que ceux atteints de type II, qui est un diabète de vieillesse. Ainsi, les cellules de ces patients étant plus jeunes, l'efficacité de transfection serait grandement augmentée. De plus, les patients de diabète de type I présentent plus de risques d'être atteints de rétinopathie diabétique et sont donc plus susceptibles au décollement de la rétine.

#### 4.4 Effet du VEGF et des Maps kinases sur l'expression de la GFAP au cours de la rétinopathie diabétique

##### 4.4.1 Effet du VEGF

Les cellules de Müller entourent la majorité des parois des vaisseaux sanguins réiniens (Reichenbach et Robinson, 1995). De plus, ces cellules synthétisent des facteurs qui induisent la formation de jonctions serrées dans ces vaisseaux sanguins ainsi que des

facteurs de croissance ayant des fonctions de régulation pour diverses cellules dans la rétine (Reichenbach et Robinson, 1995). Par conséquent, puisque les cellules de Müller produisent des facteurs capables de moduler le débit sanguin, la perméabilité vasculaire ainsi que la survie cellulaire et qu'elles enveloppent les vaisseaux sanguins dans la rétine, on leur attribue un rôle actif dans l'apparition de la rétinopathie diabétique. Lorsque des dommages se produisent au niveau des capillaires rétiens durant l'augmentation du processus d'ischémie, la rétinopathie diabétique progresse alors vers sa forme proliférante (néovasculaire), dans laquelle les événements les plus destructeurs sont la formation de cicatrices rétiennes et le décollement de la rétine (Ferrara, 1995). Selon Duh et Aiello, (1999), le VEGF jouerait un rôle important dans les complications microvasculaires lors du diabète, telles que la rétinopathie. L'ischémie est le facteur majeur responsable de l'augmentation de l'ARNm du VEGF dans la rétine (Ferrara, 1995). Il existe 4 isoformes du VEGF : 2 formes diffusibles et deux formes liées à la matrice extracellulaire (Ferrara, 1995). Plusieurs cellules de l'œil produisent du VEGF; ce sont le RPE, les péricytes des capillaires rétiens, les cellules endothéliales, les cellules de Müller et les cellules ganglionnaires (Duh et Aiello, 1999).

La prolifération des cellules gliales et leur contribution dans la formation des membranes épirétiennes sont des processus connus dans la rétinopathie diabétique (Barber et al., 1998). L'étude de Armstrong et al. (1998) a démontré qu'il y avait une concentration de VEGF 5 fois plus importante dans les membranes épirétiennes provenant de patients atteints de diabète de type I en comparaison avec des patients atteints de diabète de type II. Les auteurs vont jusqu'à affirmer que le facteur X proposé en 1948 par Michelson qui

serait impliqué dans la néovascularisation pourrait être le VEGF (Armstrong et al., 1998). Dans des conditions diabétiques, Gilbert et al. (1998), ont démontré qu'il y avait un changement dans l'expression du gène du VEGF ainsi que de son récepteur VEGFR-2 (une tyrosine kinase) et ce, seulement dans la couche nucléaire interne où se trouvent les cellules de Müller et non au niveau du RPE.

La cascade de signaux intracellulaires de transduction du VEGF pourrait devenir la cible d'agents thérapeutiques (Duh et Aiello, 1999). Lorsque le VEGF se lie à son récepteur VEGFR-2, il y a activation de la phospholipase  $C\gamma$  ( $PLC\gamma$ ) qui, à son tour, convertit le phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate en diacylglycérol (DAG) et en inositol triphosphate. Le DAG induit l'activation et la translocation de la protéine kinase C (PKC). In vitro, le VEGF active spécifiquement les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  et in vivo, les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$ . Chez les animaux, l'inhibiteur LY333531 de la PKC- $\beta$  a prouvé son efficacité par la suppression du VEGF lors d'altérations capillaires rétinienne (Aiello et al., 1997) et lors des processus d'ischémie qui induisent la néovascularisation rétinienne (Danis et al., 1998).

Ainsi, il serait important d'étudier l'effet du facteur de croissance VEGF sur l'expression de la GFAP dans les cellules de Müller humaines. Le VEGF est reconnu comme étant un facteur qui régule l'expression de la GFAP dans le SNC (Verderber et al., 1995). Si l'expression de la GFAP dans les cellules de Müller humaines était affectée par la présence de VEGF, il serait nécessaire de déterminer le mécanisme de signalisation intracellulaire

qui en est responsable en utilisant des analogues non hydrolysables du GTP, de l'AMP ou de l'ATP ainsi que des inhibiteurs de kinases tel que le LY333531.

#### 4.4.2 Effet des Maps kinases

Les effets des dommages causés aux cellules par l'hyperglycémie contribuent au développement des complications diabétiques. Dans son article, Tomlinson (1999) soulève trois hypothèses pour expliquer ce fait, les trois étant interreliées. La première est que dans le diabète, le glucose est le substrat principal pour la voie du sorbitol; il est converti en sorbitol par l'action de l'aldose réductase et l'oxydation de NADPH qui est suivi de l'oxydation du sorbitol en fructose par l'action de la sorbitol déshydrogénase avec réduction de NAD<sup>+</sup>. La seconde hypothèse est la glycosylation non-enzymatique des protéines et la troisième hypothèse est l'augmentation du stress oxydatif. Ces trois voies, ainsi que d'autres anomalies biochimiques résultant de l'hyperglycémie, partagent la capacité d'activer les «mitogen activated protein kinases» (Maps kinases).

Les maps kinases forment un groupe spécifique de kinases sérine/thréonine qui sont activées en réponse à des stimuli extracellulaires par la double phosphorylation des résidus thréonine et tyrosine. Il y a trois groupes de maps kinases : les «extracellular signal regulated kinases» (ERK), les «c-Jun N-terminal kinases» (JNK) et les p38 kinases (p38). Les maps kinases ont la capacité de déclencher tous les événements cellulaires nécessaires au développement de la rétinopathie diabétique (Tomlinson, 1999).

Le stress oxydatif, qui diminue la concentration intracellulaire de GSH, active ERK plutôt que JNK et p38. La baisse de concentration de GSH est une conséquence de l'augmentation de la voie du sorbitol dans le diabète, probablement à cause de la compétition de l'aldose réductase avec la glutathione réductase pour le NADPH. Cette hypothèse fait le lien entre la voie du sorbitol, le stress oxydatif et l'activation de ERK. Ceci pourrait expliquer l'activation de ERK qui est observée dans le tissu nerveux des rats diabétiques (Tomlinson, 1999).

À l'extérieur des cellules, le glucose réagit de façon non-enzymatique avec les amines primaires des protéines pour former des composés glycosylés et des oxydants. Ces produits vont agir sur les cellules vasculaires via leurs récepteurs et vont causer des dysfonctions vasculaires; il s'agit de la deuxième hypothèse de Tomlinson (1999). Un taux excessif intracellulaire de glucose augmente la production de sorbitol via l'aldose réductase ou altère la voie de transduction des signaux par l'activation du DAG et de la PKC. L'activation de la PKC et, par conséquent l'augmentation du DAG, initiées par l'hyperglycémie, sont associées à plusieurs anomalies vasculaires de la rétine (Koya et King, 1998). Le DAG et la PKC sont importants dans les cellules vasculaires pour la régulation de la perméabilité, la contractilité, la croissance cellulaire, l'angiogénèse, l'action des cytokines et l'adhésion des leukocytes, tous des mécanismes anormaux dans le diabète (Koya et King, 1998).

La PKC est un activateur des maps kinases; la co-activation de la PKC et des maps kinases dans les cellules vasculaires, lors de concentrations élevées en glucose, renforce la notion



que les deux soient étroitement liés. Dans le tissu vasculaire en condition diabétique, l'activation de la PKC est la conséquence du stress oxydatif et de l'activation exagérée de la voie du sorbitol. La PKC et le DAG amènent des anomalies hémodynamiques par la diminution des prostanoïdes et la production d'oxyde nitrique (NO) (Tomlinson, 1999). Le NO est un radical particulier qui est synthétisé par trois isoformes de NO-synthase présentes dans la rétine (Tomlinson, 1999). Les isoformes neuronale et endothéliale, dites constitutives, sont réglées par le taux de calcium cytosolique. Ainsi, l'enzyme neuronale (NOS-I), également présente dans les cellules de Müller, est activée dans les cellules stimulées par le glutamate et apparaît impliquée dans la neurotoxicité ischémique, comme le suggère l'effet neuroprotecteur de ses inhibiteurs. L'isoforme NOS-II, induite par les cytokines en réponse aux stimuli inflammatoires, peut être exprimée dans la rétine, dans le RPE et dans les cellules de Müller, en réponse à un épisode ischémique et pourrait y jouer un rôle cytotoxique (Bonne et al., 1998).

Une augmentation de glucose de 5 à 22mmol/L augmente la concentration cellulaire en DAG, un effet qui se produit 3-5 jours suivant la hausse du taux de glucose dans les cellules endothéliales (Koya et King, 1998). L'augmentation du DAG se produit suite à l'hyperglycémie. La source de DAG qui active la PKC provient de l'hydrolyse du phosphatidylinositol (PIs) ou du métabolisme de la phosphatidylcholine (PC) par la phospholipase C ou D (Koya et King, 1998). Selon plusieurs évidences, l'action de la PKC serait responsable de la baisse du flux sanguin dans la rétine (Koya et King, 1998; Shiba et al., 1993). Une baisse du flux sanguin amène l'hypoxie, l'apparition du VEGF, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'apparition de microanévrisme.

De très nombreuses études ont été réalisées sur le diabète et ses complications. Plusieurs d'entre elles ont identifié des facteurs communs qui pourraient être responsables des complications engendrées par cette maladie. Dans ce chapitre, j'ai voulu identifier les principaux facteurs qui pourraient avoir un lien avec les cellules de Müller; toutefois, il en existe beaucoup d'autres, que ce soit au niveau cardiovasculaire ou au niveau rénal, deux tissus propices aux complications diabétiques. Les principaux facteurs impliqués dans la rétinopathie diabétique sont tous interreliés, qu'il s'agisse du stress oxydatif, de l'hyperglycémie ou de la présence du VEGF. Ces facteurs conduisent tous vers les mécanismes de régulation cellulaire des maps kinases, d'où l'intérêt d'étudier la régulation de l'expression de la GFAP par la voie des maps kinases à l'aide d'inhibiteurs des maps kinases.

Il reste encore beaucoup de travail à réaliser afin de comprendre les mécanismes d'apparition et de contrôle de la rétinopathie diabétique. En ce moment, plusieurs pistes sont ouvertes pour la recherche dans ce domaine et certaines ont déjà amené la mise en évidence de nouveaux agents thérapeutiques.

#### 4.5 Implication du glutamate dans la régulation de l'expression de la GFAP

Le glutamate, un neurotransmetteur libéré par différentes cellules rétiniennes, est recapté grâce à des systèmes neuronaux et gliaux présents en particulier dans les cellules de Müller. Les cellules de Müller sont impliquées dans des interactions métaboliques avec les photorécepteurs et les neurones. En effet, elles emmagasinent et alimentent les cellules

nerveuses et les photorécepteurs en glucose grâce à la présence d'un niveau élevé de GLUT1, servant au transport membranaire du glucose, et d'un taux élevé de glycolyse (Reichenbach et Robinson, 1995). Elles servent aussi à éliminer les surplus de glutamate, qui est le neurotransmetteur le plus important dans la rétine, par le biais de la glutamine synthétase. Les cellules de Müller sont les seules cellules de la rétine qui expriment cette enzyme. Il existe un transporteur dépendant du  $\text{Na}^+$  dont différents sous-types ont été décrits dans la rétine. Ce symport est sensible au stress oxydant, à l'acidose ou encore à la présence d'acide arachidonique, événements biochimiques qui ont lieu en situation ischémique et qui provoquent soit un dysfonctionnement de la recapture, soit une libération de glutamate non-vésiculaire par inversion du sens du transport membranaire (Newman et Reichenbach, 1996).

L'accumulation de glutamate extracellulaire stimule l'antiport glutamate/cystine des cellules de Müller et peut aussi être responsable d'un stress oxydant par déplétion du GSH dans ces cellules (Bonne et al., 1998). Le GSH est un composant majeur des mécanismes de défense cellulaire et apparaît jouer un rôle essentiel de protection des cellules contre les dommages oxydatifs causés à la rétine (Kannan et al., 1999; Lu et al., 1999). En tant qu'antioxydant, le GSH participe à plusieurs aspects du métabolisme cellulaire: l'enlèvement des hydroperoxydes, la protection des cellules contre les radiations ionisantes, le maintien des groupes sulfhydryls des protéines et le transport des acides aminés gamma glutamyl. Quelques études ont identifié la localisation du glutathion dans les cellules de Müller et les cellules horizontales de la rétine du lapin (Pow et Crook, 1995; Schutte et Werner, 1998).

Le GSH est un tripeptide synthétisé à partir de cystéine, de glutamate et de glycine (Reichelt et al., 1997). La cystéine intracellulaire est l'acide aminé qui limite le taux de synthèse du glutathion. La cystéine est produite par la réduction intracellulaire de la cystine qui est amenée de l'espace extracellulaire par un antiporteur cystine/glutamate. Une forte concentration extracellulaire de glutamate bloque l'apport de cystine dans les cellules neuronales; il en résulte donc une baisse du taux de glutathion (Reichelt et al., 1997). Une augmentation du taux extracellulaire de glutamate amène deux situations néfastes pour les cellules nerveuses : excitotoxicité et baisse du GSH conduisant donc à une situation de stress oxydatif (Reichelt et al., 1997).

Le transporteur  $\text{Na}^+$ /glutamate dans les cellules de Müller est très important pour l'homéostasie du glutamate. Il a une grande influence sur la concentration de glutathion et permet le maintien d'un taux intracellulaire normal de cette molécule. Ce transporteur fournit le glutamate au cytoplasme des cellules gliales qui sert alors de substrat pour la synthèse du glutathion. Ce transporteur fournit également l'antiporteur cystine/glutamate en glutamate qui est nécessaire pour la conversion de la cystine en cystéine et qui sert également de substrat pour la synthèse du glutathion. Le facteur limitant pour le niveau de glutathion dans les cellules gliales n'est pas la source de cystine, mais plutôt l'approvisionnement en glutamate (Reichelt et al., 1997).

À cause de sa constante exposition aux irradiations et de son activité métabolique élevée, l'oeil a un grand besoin d'une protection antioxydante et le GSH joue ce rôle. Sous des

conditions ischémiques, le GSH est transféré des cellules de Müller aux neurones rétiniens, ce qui suggère que les cellules de Müller participent activement à la protection neuronale (Kannan et al., 1999). La compréhension des mécanismes cytotoxiques du glutamate va permettre de proposer des cibles pharmacologiques pour des traitements neuroprotecteurs (Bonne et al., 1998).

En conclusion, puisque l'expression de la GFAP dans les cellules de Müller augmente lors de changements pathologiques, il serait intéressant d'observer le comportement de la GFAP lorsqu'il y a accumulation de glutamate dans la rétine. L'augmentation de glutamate amenant une baisse du glutathion donc une situation de stress oxydatif. Par son implication dans les cellules de Müller, la GFAP pourrait peut-être jouer un rôle dans ce processus. Par l'ajout de différentes concentrations de glutamate dans le milieu de culture des cellules de Müller humaines et par transfection transitoire avec différentes constructions de plasmides GFAP, il serait possible de mesurer l'effet du glutamate sur l'activité de la GFAP.

## BIBLIOGRAPHIE

Aiello, L. P., Bursell, S. E., Clermont, A., Duh, E., Ishii, H., Takagi, C., Mori, F., Ciulla, T. A., Ways, K., Jirousek, M., Smith, L. E., et King, G. L. Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective beta-isoform-selective inhibitor. Diabetes, 1997, 46, 1473-1480.

Ali, M. A., et Klyne, M. A. La vision chez les vertébrés, Montréal, Masson, 1986.

Anderson, D. H., Guerin, C. J., Erickson, P. A., Stern, W. H., et Fisher, S. K. Morphological recovery in the reattached retina. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1986, 27, 168-183.

Armstrong, D., Augustin, A. J., Spengler, R., Al-Jada, A., Nickola, T., Grus, F., et Koch, F. Detection of vascular endothelial growth factor and tumor necrosis factor alpha in epiretinal membranes of proliferative diabetic retinopathy, proliferative vitreoretinopathy and macular pucker. Ophthalmologica, 1998, 212, 410-414.

Audet, J.F., Masson, J.Y., Rosen, G.D., Salesse, C. et Guérin, S.L. Multiple regulatory elements control the basal promoter activity of the human alpha4 integrin gene. DNA Cell Biol, 1994, 13, 1071-1085.

Balcarek, J. M., et Cowan, N. J. Structure of the mouse glial fibrillary acidic protein gene: implications for the evolution of the intermediate filament multigene family. Nucleic Acids Res, 1985, 13, 5527-5543.

Barber, A.J., Lieth, E., Khin, S.A., Antonetti, D.A., Buchanan, A.G. et Gardiner T.W. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. J Clin Invest, 1998, 102, 783-791.

Bergeron, M.J., Leclerc, S., Laniel, M. A., Poirier, G. G., et Guérin, S. L. Transcriptional regulation of the rat poly (ADP-ribose) polymerase gene by Sp1. Eur J Biochem, 1997, 250, 342-353.

Berman, E. R. Biochemistry of the eye, New-York, Plenum, 1991.

Berson, F. G. Basic ophthalmology for medical students and primary care residents, San Francisco, American Academy of ophthalmology, 1993.

Besnard, F., Brenner, M., Nakatani, Y., Chao, R., Purohit, H. J., et Freese, E. Multiple interacting sites regulate astrocyte-specific transcription of the human gene for glial fibrillary acidic protein. J Biol Chem, 1991, 266, 18877-18883.

Bignami, A., et Dahl, D. The radial glia of Muller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein. Exp Eye Res, 1979, 28, 63-69.

Bonne, C., Muller, A., et Osborne, N. N. Ischémie rétinienne et excitotoxicité. Médecine Science, 1998, 14, 1322-1328.

Brenner, M. Structure and transcriptional regulation of the GFAP gene. Brain Pathol, 1994, 4, 245-257.

Bridges, C. D., Alvarez, R. A., Fong, S. L., Gonzalez-Fernandez, F., Lam, D. M., et Liou, G. I. Visual cycle in the mammalian eye. Retinoid-binding proteins and the distribution of 11-cis retinoids. Vision Res, 1984, 24, 1581-1594.

Buchi, E. R. Cell death in rat retina after pressure-induced ischaemia-reperfusion insult: electron microscopic study. II. Outer nuclear layer. Jpn J Ophthalmol, 1992, 36, 62-68.

Buser, P., et Imbert, M. Neurophysiologie fonctionnelle, Paris, Hermann, 1987.

Caley, D. W., Johnson, C., et Liebelt, R. A. The postnatal development of the retina in the normal and rodless CBA mouse: a light and electron microscopic study. Am J Anat, 1972, 133, 179-212.



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

Chiu, F. C., et Goldman, J. E. Regulation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in CNS development and in pathological states. J Neuroimmunol, 1985, 8, 283-292.

Danis, R. P., Bingaman, D. P., Jirousek, M., et Yang, Y. Inhibition of intraocular neovascularization caused by retinal ischemia in pigs by PKCbeta inhibition with LY333531. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39, 171-179.

Darnell, J., Lodish, H., et Baltimore, D. Biologie moléculaire de la cellule, Bruxelles, De Boeck Université, 1993.

Das, S. R., Bhardwaj, N., Kjeldbye, H., et Gouras, P. Muller cells of chicken retina synthesize 11-cis-retinol. Biochem J, 1992, 285, 907-913.

De Nicola, A. F., Ferrini, M., Gonzalez, S. L., Gonzalez Deniselle, M. C., Grillo, C. A., Piroli, G., Saravia, F., et de Kloet, E. R. Regulation of gene expression by corticoid hormones in the brain and spinal cord. J Steroid Biochem Mol Biol, 1998, 65, 253-272.

de Raad, S., Szczesny, P. J., Munz, K., et Reme, C. E. Light damage in the rat retina: glial fibrillary acidic protein accumulates in Muller cells in correlation with photoreceptor damage. Ophthalmic Res, 1996, 28, 99-107.

DiLoreto, D. A., Jr., Martzen, M. R., del Cerro, C., Coleman, P. D., et del Cerro, M. Muller cell changes precede photoreceptor cell degeneration in the age- related retinal degeneration of the Fischer 344 rat. Brain Res, 1995, 698, 1-14.

Dowling, J. E. The retina an approachable part of the brain, Boston, Belknap, 1987.

Duh, E., et Aiello, L. P. Vascular endothelial growth factor and diabetes: the agonist versus antagonist paradox. Diabetes, 1999, 48, 1899-1906.

Durlu, Y. K., Ishiguro, S., Yoshida, A., Mito, T., Tsuchiya, M., et Tamai, M. Response of Muller cells following experimental lensectomy-vitreectomy. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1990, 228, 44-48.

Ekstrom, P., Sanyal, S., Narfstrom, K., Chader, G. J., et van Veen, T. Accumulation of glial fibrillary acidic protein in Muller radial glia during retinal degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1988, 29, 1363-1371.

Erickson, P. A., Fisher, S. K., Anderson, D. H., Stern, W. H., et Borgula, G. A. Retinal detachment in the cat: the outer nuclear and outer plexiform layers. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1983, 24, 927-942.

Erickson, P. A., Fisher, S. K., Guerin, C. J., Anderson, D. H., et Kaska, D. D. Glial fibrillary acidic protein increases in Muller cells after retinal detachment. Exp Eye Res, 1987, 44, 37-48.

Erickson, P. A., Feinstein, S. C., Lewis, G. P., et Fisher, S. K. Glial fibrillary acidic protein and its mRNA: ultrastructural detection and determination of changes after CNS injury. J Struct Biol, 1992, 108, 148-161.

Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor. The trigger for neovascularization in the eye. Lab Invest, 1995, 72, 615-618.

Fisher, S. K., Erickson, P. A., Lewis, G. P., et Anderson, D. H. Intraretinal proliferation induced by retinal detachment. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991, 32, 1739-1748.

Gilbert, R.E., Vranes, D., Berka, J.L., Kelly, D.J., Cox, A., Wu, L.L., Stacker, S.A., et Cooper, M.E. Vascular endothelial growth factor and its receptors in control and diabetic rats eyes. Lab Invest, 1998, 61, 1017-1027.

Gomes, F. C., Paulin, D., et Moura Neto, V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. Braz J Med Biol Res, 1999, 32, 619-631.

Guerin, C. J., Anderson, D. H., et Fisher, S. K. Changes in intermediate filament immunolabeling occur in response to retinal detachment and reattachment in primates. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1990, 31, 1474-1482.

Guérin, S. L., et Moore, D. D. DNase I footprint analysis of nuclear proteins from pituitary and nonpituitary cells that specifically bind to the rat growth hormone promoter and 5'-regulatory region. Mol Endocrinol, 1988, 2, 1101-1107.

Guérin, S. L., Pothier, F., Robidoux, S., Gosselin, P., et Parker, M. G. Identification of a DNA-binding site for the transcription factor GC2 in the promoter region of the p12 gene and repression of its positive activity by upstream negative regulatory elements. J Biol Chem, 1990, 265, 22035-22043.

Guidry, C. Isolation and characterization of porcine Muller cells. Myofibroblastic dedifferentiation in culture. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996, 37, 740-752.

Hicks, D., et Courtois, Y. The growth and behaviour of rat retinal Muller cells in vitro. 1. An improved method for isolation and culture. Exp Eye Res, 1990, 51, 119-129.

Hollander, H., Makarov, F., Dreher, Z., van Driel, D., Chan-Ling, T. L., et Stone, J. Structure of the macroglia of the retina: sharing and division of labour between astrocytes and Muller cells. J Comp Neurol, 1991, 313, 587-603.

Jones, L. L., Kreutzberg, G. W., et Raivich, G. Transforming growth factor beta's 1, 2 and 3 inhibit proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer. Brain Res, 1998, 795, 301-306.

Kannan, R., Bao, Y., Wang, Y., Sarthy, V. P., et Kaplowitz, N. Protection from oxidant injury by sodium-dependent GSH uptake in retinal Muller cells. Exp Eye Res, 1999, 68, 609-616.

Kath, R., Hayungs, J., Bornfeld, N., Sauerwein, W., Höffken, K., et Seeber, S. Prognosis and treatment of disseminated uveal melanoma. Cancer, 1993, 72, 2219-2223.

Kaufman, P. B., Wu, W., Kim, D., et Cseke, L. J. Handbook of molecular and cellular methods in biology and medecine, Boca Raton, CRC Press, 1995.

Kivelä, T., et Uusitalo, M. Structure, development and function of cytoskeletal elements in non-neuronal cells of the human eye. Progress in retinal and eye research, 1998, 17, 385-428.

Klein, R., Klein, B.E.K. Diabetic eye disease. Lancet, 1997, 350, 197-204.

Koya, D., et King, G. L. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. Diabetes, 1998, 47, 859-866.

Krohn, K., Rozovsky, I., Wals, P., Teter, B., Anderson, C. P., et Finch, C. E. Glial fibrillary acidic protein transcription responses to transforming growth factor-beta1 and interleukin-1beta are mediated by a nuclear factor-1-like site in the near-upstream promoter. J Neurochem, 1999, 72, 1353-1361.

Krug, M. S., et Berger, S. L. First-strand cDNA synthesis primed with oligo(dT). Methods Enzymol, 1987, 152, 316-325.

Kuby, J. Immunology, New York, W. H. Freeman Company, 1994.

Laniel, M.A., Bergeron, M.J., Poirier, G.G. et Guérin, S.L. A nuclear factor other than Sp1 binds the GC rich promoter of the gene encoding rat poly (ADP-ribose) polymerase in vitro. Biochem Cell Biol, 1997, 75, 427-434.

Laping, N. J., Teter, B., Nichols, N. R., Rozovsky, I., et Finch, C. E. Glial fibrillary acidic protein: regulation by hormones, cytokines, and growth factors. Brain Pathol, 1994, 4, 259-275.

Laqua, H., et Machemer, R. Glial cell proliferation in retinal detachment (massive periretinal proliferation). Am J Ophthalmol, 1975, 80, 602-618.

Larsen, P. R., Harney, J. W., et Moore, D. D. Repression mediates cell-type-specific expression of the rat growth hormone gene. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986, 83, 8283-8287.

Lewis, G. P., Kaska, D. D., Vaughan, D. K., et Fisher, S. K. An immunocytochemical study of cat retinal Muller cells in culture. Exp Eye Res, 1988, 47, 855-868.

Lewis, G. P., Matsumoto, B., et Fisher, S. K. Changes in the organization and expression of cytoskeletal proteins during retinal degeneration induced by retinal detachment. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995, 36, 2404-2416.

Lewis, G. P., Mervin, K., Valter, K., Maslim, J., Kappel, P. J., Stone, J., et Fisher, S. Limiting the proliferation and reactivity of retinal Muller cells during experimental retinal detachment: the value of oxygen supplementation. Am J Ophthalmol, 1999, 128, 165-172.

Liapis, H., et Hutton, K. Detection of integrins in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. J Histochem Cytochem, 1997, 45, 737-741.

Lieth, R., Barber, A.J., Xu, B., Dice, C., Ratz, M.J., Tanase, D., Strother, J.M.. Glial reactivity and impaired glutamate metabolism in short-term experimental diabetic retinopathy. Diabetes, 1998, 47, 815-820

Linser, P. J., Sorrentino, M., et Moscona, A. A. Cellular compartmentalization of carbonic anhydrase-C and glutamine synthetase in developing and mature mouse neural retina. Brain Res, 1984, 315, 65-71.

Lu, S. C., Bao, Y., Huang, Z. Z., Sarthy, V. P., et Kannan, R. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression in retinal Muller cells by oxidative stress. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40, 1776-1782.

Marieb, E. N., et Laurendeau, G. Anatomie et physiologie humaine, Saint-Laurent, Éditions du renouveau pédagogique inc., 1992.

Marzluff, W. F., et Huang, R. C. C. Transcription and translation: A practical approach, Arlington, IRL Press, 1984.

Miura, M., Tamura, T., et Mikoshiba, K. Cell-specific expression of the mouse glial fibrillary acidic protein gene: identification of the cis- and trans-acting promoter elements for astrocyte-specific expression. J Neurochem, 1990, 55, 1180-1188.

Mizutani, M., Gerhardinger, C., et Lorenzi, M. Muller cell changes in human diabetic retinopathy. Diabetes, 1998, 47, 445-449.

Mooy, C. M., et De Jong, P. T. V. M. Prognostic parameters in uveal melanoma: a review. Survey of ophthalmology, 1996, 41, 215-228.



Murphy, E., Hieny, S., Sher, A., et O'Garra, A. Detection of in vivo expression of interleukin-10 using a semi-quantitative polymerase chain reaction method in *Schistosoma mansoni* infected mice. J Immunol Methods, 1993, 162, 211-223.

Nakatani, Y., Brenner, M., et Freese, E. An RNA polymerase II promoter containing sequences upstream and downstream from the RNA startpoint that direct initiation of transcription from the same site. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990a, 87, 4289-4293.

Nakatani, Y., Horikoshi, M., Brenner, M., Yamamoto, T., Besnard, F., Roeder, R. G., et Freese, E. A downstream initiation element required for efficient TATA box binding and in vitro function of TFIID. Nature, 1990b, 348, 86-88.

Newman, E. A. Sodium-bicarbonate cotransport in retinal Muller (glial) cells of the salamander. J Neurosci, 1991, 11, 3972-3983.

Newman, E. A. Acid efflux from retinal glial cells generated by sodium bicarbonate cotransport. J Neurosci, 1996, 16, 159-168.

Newman, E. A., et Reichenbach, A. The Muller cell: a functional element of the retina. Trends Neurosci, 1996, 19, 307-312.

O'Callaghan, J. P., Brinton, R. E., et McEwen, B. S. Glucocorticoids regulate the concentration of glial fibrillary acidic protein throughout the brain. Brain Res, 1989, 494, 159-161.

Okada, M., Matsumura, M., Ogino, N., et Honda, Y. Muller cells in detached human retina express glial fibrillary acidic protein and vimentin. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1990, 228, 467-474.

Osborne, N. N., Block, F., et Sontag, K. H. Reduction of ocular blood flow results in glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in rat retinal Muller cells. Vis Neurosci, 1991, 7, 637-639.

Pfeiffer, B., Grosche, J., Reichenbach, A., et Hamprecht, B. Immunocytochemical demonstration of glycogen phosphorylase in Muller (glial) cells of the mammalian retina. Glia, 1994, 12, 62-67.

Poitry-Yamate, C., et Tsacopoulos, M. Glial (Muller) cells take up and phosphorylate [3H]2-deoxy-D-glucose in mammalian retina. Neurosci Lett, 1991, 122, 241-244.

Poitry-Yamate, C. L., Poitry, S., et Tsacopoulos, M. Lactate released by Muller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. J Neurosci, 1995, 15, 5179-5191.

Pothier, F., Ouellet, M., Julien, J.P. et Guérin, S.L. An improved CAT assay for promoter analysis in either transgenic mice or tissue culture. DNA Cell Biol. 1992, 11, 83-90.

Pow, D. V., et Crook, D. K. Immunocytochemical evidence for the presence of high levels of reduced glutathione in radial glial cells and horizontal cells in the rabbit retina. Neurosci Lett, 1995, 193, 25-28.

Quinlan, R., Hutchison, C., et Lane, B. Intermediate filament proteins, New York, Academic Press, 1994.

Reeves, S. A., Helman, L. J., Allison, A., et Israel, M. A. Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86, 5178-5182.

Reichelt, W., Stabel-Burow, J., Pannicke, T., Weichert, H., et Heinemann, U. The glutathione level of retinal Muller glial cells is dependent on the high-affinity sodium-dependent uptake of glutamate. Neuroscience, 1997, 77, 1213-1224.

Reichenbach, A. Attempt to classify glial cells by means of their process specialization using the rabbit retinal Muller cell as an example of cytotopographic specialization of glial cells. Glia, 1989, 2, 250-259.

Reichenbach, A., et Robinson, S. R. Neurobiology and clinical aspects of the outer retina, London, Chapman, 1995.

Reilly, J. F., Maher, P. A., et Kumari, V. G. Regulation of astrocyte GFAP expression by TGF-beta1 and FGF-2. Glia, 1998, 22, 202-210.

Rennie, I. G. The Ashton lecture, uveal melanoma: the past, the present and the future. Eye, 1997, 11, 255-264.

Rentsch, I., Holz, H., Bauszus, R., et Kossling, F. K. [Barrett's syndrome (author's transl)]. Med Klin, 1979, 74, 437-441.

Robinson, S. R., et Dreher, Z. Muller cells in adult rabbit retinae: morphology, distribution and implications for function and development. J Comp Neurol, 1990, 292, 178-192.

Roque, R. S., et Caldwell, R. B. Muller cell changes precede vascularization of the pigment epithelium in the dystrophic rat retina. Glia, 1990, 3, 464-475.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., et Erlich, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 1988, 239, 487-491.

Sarkar, S., et Cowan, N. J. Intragenic sequences affect the expression of the gene encoding glial fibrillary acidic protein. J Neurochem, 1991, 57, 675-684.

Sarthy, P. V., Fu, M., et Huang, J. Developmental expression of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) gene in the mouse retina. Cell Mol Neurobiol, 1991, 11, 623-637.

Sarthy, V., et Egal, H. Transient induction of the glial intermediate filament protein gene in Muller cells in the mouse retina. DNA Cell Biol, 1995, 14, 313-320.

Schellini, S. A., Gregorio, E. A., Spadella, C. T., Machado, J. L., et de-Moraes-Silva, M. A. Muller cells and diabetic retinopathy. Braz J Med Biol Res, 1995, 28, 977-980.

Schlosshauer, B., Grauer, D., Dutting, D., et Vanselow, J. Expression of a novel Muller glia specific antigen during development and after optic nerve lesion. Development, 1991, 111, 789-799.

Schutte, M., et Werner, P. Redistribution of glutathione in the ischemic rat retina. Neurosci Lett, 1998, 246, 53-56.

Seed, B., et Sheen, J. Y. A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acyltransferase activity. Gene, 1988, 67, 271-277.

Selden, R. F., Howie, K. B., Rowe, M. E., Goodman, H. M., et Moore, D. D. Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. Mol Cell Biol, 1986, 6, 3173-3179.

Shiba, T., Inoguchi, T., Sportsman, J.R., Heath, W., Bursell, S., et King, G.L. Correlation of diacylglycerol and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. Am J Physiol, 1993, 265, 783-793.

Shichi, H. Biochemistry of vision, New-York, Academic Press, 1983.

Singh, A. D., Wang, M. X., Donoso, L. A., Shields, C. L., De Potter, P., et Shields, J. A. Genetic aspects of uveal melanoma: a brief review. Seminars in oncology, 1996, 23, 768-772.

Stein, H. A., Slatt, B. J., et Stein, R. M. A primer in ophthalmology: a text book for students, Toronto, Mosby, 1992.

Tomlinson, D. R. Mitogen-activated protein kinases as glucose transducers for diabetic complications. Diabetologia, 1999, 42, 1271-1281.

Tortora, G. J., et Grabowski, S. Principes d'anatomie et de physiologie, Anjou, Centre éducatif et culturel inc., 1994.

Traub, P. Intermediate filament, a review, Berlin, Springer-Verlag, 1985.

Truill, E., et Ganem-Albou, C. Ophtalmologie, Paris, Estem, 1995.

Vaughan, D. K., Erickson, P. A., et Fisher, S. K. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in rabbit retina: effect of fixation. Exp Eye Res, 1990, 50, 385-392.

Verderber, L., Johnson, W., Mucke, L., et Sarthy, V. Differential regulation of a glial fibrillary acidic protein-LacZ transgene in retinal astrocytes and Muller cells. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995, 36, 1137-1143.

Wakakura, M., et Foulds, W. S. Immunocytochemical characteristics of Muller cells cultured from adult rabbit retina. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1988, 29, 892-900.

Wang, A. M., Doyle, M. V., et Mark, D. F. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86, 9717-9721.

Watson, J. D., Gilman, M., Witkowski, J., et Zeller, M. ADN recombinant, Bruxelles, De Boeck Université, 1994.

Yoshida, A., Ishiguro, S., et Tamai, M. Expression of glial fibrillary acidic protein in rabbit Muller cells after lensectomy-vitreotomy. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1993, 34, 3154-3160.

Zografos, L. Les mélanomes de l'uvée et leur traitement. Revue médicale de la suisse romande, 1998, 118, 915-926.