

Transplantations rétiniennes : résultats, perspectives et interrogations

José A. Sahel
Saddek Mohand-Said
Thierry Lèveillard
Anne-Claire Fintz
Henri Dreyfus
David Hicks

La transplantation de cellules rétiniennes, inconcevable il y a peu d'années, apparaît aujourd'hui comme une perspective thérapeutique dans des affections dégénératives de la rétine encore incurables, comme les rétinopathies pigmentaires, ou rarement accessibles à un traitement comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Plusieurs équipes ont démontré la possibilité de transplanter des cellules rétiniennes isolées (épithélium pigmentaire, cellules neurales embryonnaires ou adultes) avec une survie et une différenciation partielle du greffon. Les greffes d'épithélium pigmentaire rétinien sont, en raison de phénomènes de rejet, progressivement remplacées par des techniques d'autogreffe (épithélium irien, translocation maculaire) en cours d'évaluation préclinique et clinique. Les greffes de cellules embryonnaires n'ont pas encore fait la preuve de leur efficacité en clinique. Les greffes de cellules photoréceptrices permettent, dans un modèle animal de dystrophie rétinienne consécutive à une mutation affectant sélectivement les bâtonnets, de ralentir considérablement la dégénérescence secondaire des cônes, par un effet paracrine ouvrant la voie à l'expérimentation clinique et à l'identification des facteurs de survie de ces cellules.

ADRESSES

J.A. Sahel : professeur des universités, praticien hospitalier. S. Mohand-Said : attaché associé, étudiant en thèse de sciences. T. Lèveillard : chargé de recherches à l'Inserm. A.C. Fintz : étudiante en thèse. H. Dreyfus : directeur de recherches à l'Inserm. D. Hicks : directeur de recherches à l'Inserm. Faculté de médecine, Université Louis-Pasteur, Clinique ophtalmologique et Laboratoire de physiopathologie rétinienne, Hôpitaux universitaires de Strasbourg, BP 426, 1, place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg Cedex, France.

Parmi les causes de cécité aujourd'hui prédominantes dans les pays dits développés, les affections rétiniennes occupent la première place. La première cause de cécité d'origine génétique est représentée par le groupe des dystrophies rétiniennes (rétinopathies pigmentaires, maladie de Stargardt...) qui ne sont actuellement accessibles à aucun traitement. Première cause de cécité après 50 ans, la dégénéres-

cence maculaire liée à l'âge (DMLA) ne relève d'un traitement palliatif que dans un pourcentage minime de cas à un stade tardif de l'affection dont il s'agit simplement de retarder les conséquences liées à la cécité. Ces deux groupes d'affection représentent la cible principale des tentatives de transplantations rétiniennes. Avant d'aborder l'aspect expérimental de ces recherches, il faut souligner d'emblée les difficultés liées à l'absence de modèle expérimental de

dégénérescence maculaire liée à l'âge. De ce fait, l'application à cette maladie ne représente qu'une extrapolation à partir de résultats expérimentaux observés sur des modèles animaux de dystrophie rétinienne.

Les transplantations rétiniennes ont suscité, au cours des dix dernières années, de nombreuses recherches expérimentales menées principalement par des équipes nord-américaines. Les résultats de ces premiers travaux ont été jugés par certaines d'entre elles suffisamment prometteurs pour qu'elles entreprennent depuis 1994 des tentatives d'application humaine [1-4]. Elles suscitent cependant aussi des interrogations majeures justifiant qu'un effort de recherche considérable soit mis en œuvre afin de proposer une stratégie cohérente susceptible de justifier scientifiquement et de valider cliniquement ces nouvelles approches thérapeutiques.

En dehors des tentatives effectuées au siècle dernier par Doremal au Danemark en 1873 et par Paul Chibret qui, il y a plus d'un siècle, avait proposé la greffe d'œil entier, l'histoire de la transplantation rétinienne commence par les travaux négligés pendant près de 30 ans de Royo et Quay en 1959 [5]. Ces auteurs avaient réussi à implanter dans la chambre antérieure d'animaux adultes un tissu foetal rétinien de rat. Ils avaient alors observé la survie cellulaire et quelques éléments de différenciation rudimentaire en photorécepteurs, données confirmées par del Cerro en 1985 [6]. C'est en effet à partir de 1984, et surtout de la fin des années 1980, que plusieurs équipes d'investigateurs ont concentré leurs efforts sur la transplantation de cellules rétiniennes. Ces initiatives souvent dispersées peuvent se classer en deux grandes rubriques.

- Un premier groupe de recherches s'est orienté vers la greffe de cellules de soutien, en l'occurrence d'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), avec deux types d'objectifs: induire une survie accrue des cellules photoréceptrices rétiniennes [3] puis, plus récemment, améliorer, après chirurgie, dans le cadre de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, la cicatrisation de la membrane de Bruch située sous l'épithélium pigmentaire rétinien et de la membrane choriocapillaire assurant la nutrition de la

rétiline externe [7].

- Un deuxième ensemble d'investigateurs s'est orienté vers la greffe de rétiline neurale, embryonnaire ou adulte, avec comme objectif, soit le remplacement neuronal avec rétablissement de connexions synaptiques [4, 8, 9], soit plus récemment, par notre groupe, l'induction d'un effet paracrine à partir de cellules transplantées améliorant la survie des cellules de l'hôte [10, 11].

Transplantation de l'épithélium pigmentaire rétinien : données expérimentales

En 1985 Gouras avait mis au point une technique de transplantation de l'épithélium pigmentaire d'origine humaine chez le singe [12]. Les premiers résultats encourageants concernant la transplantation de l'EPR ont été observés sur un modèle murin de dystrophie rétinienne: le rat RCS (*Royal College of Surgeons*) en 1988 [13]. Le rat RCS est un modèle de dystrophie rétinienne au cours de laquelle, à la suite d'une anomalie génétique encore non identifiée située au niveau de l'épithélium pigmentaire rétinien, le renouvellement des segments externes des bâtonnets par phagocytose n'est pas assuré, ce qui aboutit à l'accumulation de matériel provenant des segments externes et à une dégénérescence progressive de la couche de photorécepteurs. En raison de l'atteinte de l'EPR et du déficit de la phagocytose, ce mutant est souvent considéré comme proche de la DMLA.

Sur ce modèle, Li et Turner en 1988 [13], Sheedlo en 1989 [14], et Lopez et Gouras en 1989 [15] ont mis en évidence un ralentissement considérable de la dégénérescence des photorécepteurs après transplantation d'épithélium pigmentaire sain. On a observé une corrélation entre la densité de cellules transplantées et le nombre de photorécepteurs survivants, la présence après 48 heures de matériel phagosomique dans l'EPR transplanté, ainsi que des paramètres métaboliques normaux (distribution des pompes Na^+/K^+ ATPase) [3, 14, 16]. De plus, à un stade plus évolué de la maladie, l'angiogenèse compliquant la perte des photorécepteurs

semble ralentie [17]. Des résultats analogues ont été obtenus à partir de greffe d'épithélium pigmentaire humain chez le rat RCS [18]. Sur le plan fonctionnel, Coffey et Lund en 1995 [19] ont montré l'amélioration de tests comportementaux alors que Jiang *et al.* en 1994 [20] rapportent une amélioration de l'enregistrement électrorétinographique de la fonction rétinienne.

Le mode d'action de ces transplantations chez le rat RCS est probablement à mettre en relation avec un effet protecteur de l'administration de FGF-2 (*basic fibroblast growth factor*) sur ce même modèle [21]. D'autres facteurs neurotrophiques comme le CNTF (*ciliary neurotrophic factor*), le BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) et l'interleukine-1 β se sont avérés protecteurs sur les photorécepteurs dans des modèles de phototoxicité et chez des mutants murins [22, 23]. Les effets de facteurs neurotrophiques sur les photorécepteurs ont été confirmés par les travaux de Hicks *et al.* [24] – mettant en évidence celui du FGF-2 sur la survie

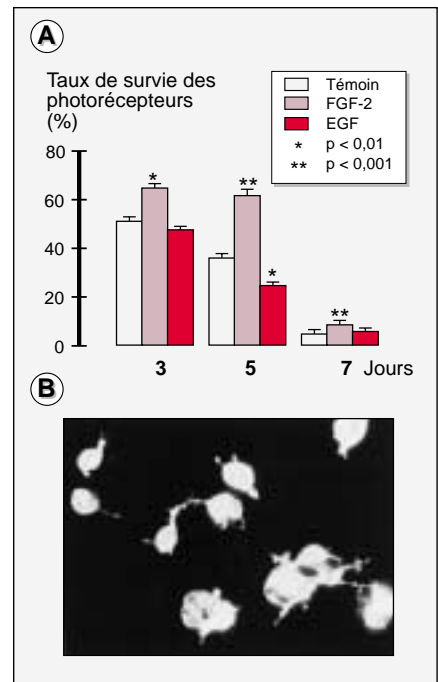


Figure 1. **Survie des photorécepteurs induits par le FGF-2.** A. Effet du FGF-2 et de l'EGF sur la survie in vitro des photorécepteurs purifiés à partir de rétines de jeunes rats. B. Photorécepteurs purifiés après 4 jours in vitro, immunomarqués par l'anti-opsine.

des photorécepteurs *in vitro* – prolongés récemment par la démonstration d'un effet direct de FGF-2 sur la survie des photorécepteurs (figures 1A et 1B) [25]. Il faut cependant souligner des difficultés d'interprétation liées au modèle animal sur lequel ces effets ont été observés. En effet, d'une part, plusieurs exemples de discordance entre les effets observés chez le rat et dans d'autres modèles comme la souris ou le poulet ont été rapportés [26, 27]; ainsi, le FGF-2 induit la différenciation des bâtonnets dans la rétine de rat *in vitro* [24], mais est, selon les auteurs, sans effet [27] ou inducteur de l'apoptose des bâtonnets chez le poulet [28]. D'autre part, le rat RCS est un modèle sans équivalent clinique. En effet, la mutation n'a pas été identifiée chez cet animal mais la lésion semble exprimée au niveau de l'épithélium pigmentaire. Or, l'immense majorité des mutations identifiées actuellement dans les dystrophies rétiniennes humaines se situe au niveau des photorécepteurs, et plus particulièrement des bâtonnets. De plus, les effets observés chez le rat RCS n'ont, dans un certain nombre de cas, pas été retrouvés sur des modèles de souris mutantes porteuses de mutations identiques à celles constatées chez l'homme (souris *rd*, souris transgéniques) [22].

Essais cliniques

Des greffes d'épithélium pigmentaire ont été mises en œuvre chez l'homme en 1994 pour la première fois par Gouras et Algvere [1] dans le cadre de formes évoluées de dégénérescence maculaire liée à l'âge. Au stade tardif de cette affection, l'évolution s'effectue le plus souvent vers une atrophie de la couche nutritive vasculaire de la choroïde, la choriocapillaire, de très importants remaniements de la membrane de Bruch séparant la choriocapillaire de l'épithélium pigmentaire, une atrophie de l'épithélium pigmentaire et une atrophie des photorécepteurs [30]. Une autre complication, moins fréquente (20%), mais souvent plus rapidement évolutive, est la formation d'une néovascularisation à partir de la choriocapillaire (figures 2A et 2B). Les néovaisseaux traversent la membrane de Bruch, émanant de

capillaires choroïdiens, prolifèrent dans l'espace sous-rétinien en intrication étroite avec l'épithélium pigmentaire, aboutissant à la formation de cicatrices fibrovasculaires, à des complications hémorragiques et œdémateuses, et à une perte fonctionnelle rapide [30].

La forme atrophique n'est actuellement accessible à aucun traitement et seul un petit pourcentage de patients (15%) présentant une néovascularisation située en dehors de la zone fovéolaire centrale est accessible à une photocoagulation au laser permettant de retarder d'environ 18 mois la perte de vision centrale, dans 50% des cas.

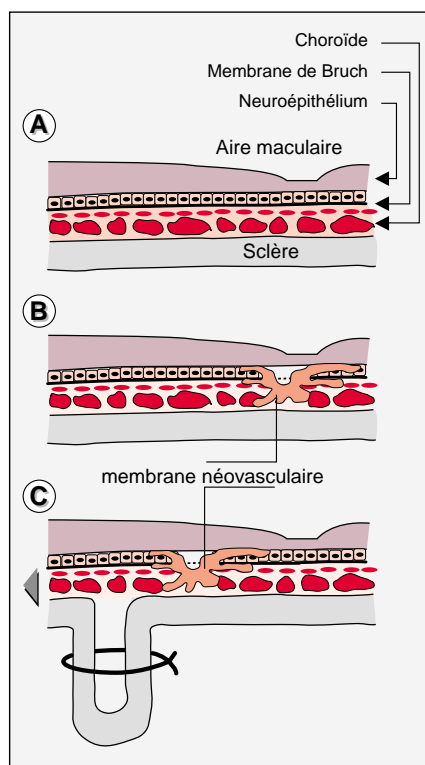


Figure 2. Coupe schématique d'une rétine au niveau de la région maculaire. A. Rétine normale. B. rétine présentant une membrane néovasculaire sous-maculaire. C. Un plissement scléral à distance de la région maculaire permet de créer un léger déplacement relatif du plan neurorétinien par rapport aux plans choroïdien et pigmentaire. Cela permet de détruire par photocoagulation au laser la membrane néovasculaire sans léser la macula dont elle se retrouve éloignée et à la macula de se retrouver en regard d'une zone saine de l'EPR.

Depuis le début des années 1990, une stratégie chirurgicale d'exérèse des néovaisseaux a été proposée avec mise en évidence de la faisabilité technique de cette chirurgie mais aussi d'importants remaniements induits au niveau des photorécepteurs, de l'épithélium pigmentaire et de la membrane de Bruch avec atrophie secondaire de la choriocapillaire [31]. C'est pourquoi la transplantation de l'épithélium pigmentaire, en remplacement des cellules excisées en même temps que les néovaisseaux, a été proposée [1]. La stratégie correspond ici plus à un adjuvant à la cicatrisation de la membrane de Bruch et de la choriocapillaire qu'à une restauration fonctionnelle. De fait, les résultats observés lors de la première expérimentation suédoise et des premiers essais effectués aux États-Unis ont mis en évidence l'absence de récupération fonctionnelle, mais surtout des complications à court et moyen termes liées à des phénomènes de rejet de l'épithélium pigmentaire [1]. En effet, ces cellules sont susceptibles de déclencher une réaction immunitaire cellulaire et humorale avec destruction progressive du greffon et apparition d'un œdème maculaire conduisant à une dégradation ultérieure de l'acuité visuelle [1, 7, 32]. C'est pour cette raison qu'un des essais en cours aux États-Unis impose le recours à une triple immunosuppression [7], stratégie difficilement envisageable à l'âge de survenue de la DMLA et en particulier à long terme.

Les perspectives d'autogreffe

Compte tenu de la justification théorique d'adjuvants à la cicatrisation de la membrane de Bruch et de l'épithélium pigmentaire, plusieurs alternatives ont été envisagées. L'une d'entre elles repose sur l'utilisation d'épithélium pigmentaire irien autologue prélevé en per-opératoire, ou plutôt une semaine avant l'intervention, avec mise en culture et implantation lors de la chirurgie sous-rétinienne. Les résultats préliminaires indiquent, chez le lapin, que cet épithélium pigmentaire irien est capable de former une monocouche sur la membrane de Bruch et même de phagocytter des segments externes

sans phénomène de rejet [33]. Cependant, de forts doutes planent sur la fonction métabolique de cet épithélium pigmentaire et irien, en particulier, le métabolisme de la vitamine A et sur l'induction d'un effet de survie sur les photorécepteurs. Des essais non publiés ont été effectués en Allemagne et aux États-Unis de greffes d'épithélium pigmentaire irien au cours de la chirurgie de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, sans résultats connus.

Une autre technique d'autotransplantation d'épithélium pigmentaire consiste en la rotation relative de la rétine neurale et de l'épithélium pigmentaire rétinien situé dans la région extramaculaire, parfois préservé lors de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (figure 3). Cette rotation peut être obtenue par décollement total de la rétine, suivi d'une rotation de la rétine elle-même après rétinotomie sur 360° [34], soit par un plissement scléral permettant une rotation de la sclère, de la choroïde et de l'épithélium pigmentaire [35]. La première technique, très longue et difficile, expose à d'importants risques de complications et impose toujours une chirurgie des muscles oculaires afin d'éviter les phénomènes de distorsion de l'espace visuel et de diplopie [34]. La technique de translocation provoque un déplacement maculaire maximal d'environ 1 mm, ce qui permet dans certains cas de déplacer dans la région extrafovéolaire des néovaisseaux qui étaient situés sous la macula (figures 2B et 2C). Ceux-ci deviennent dès lors accessibles à une photocoagulation. Les premiers résultats publiés par De Juan semblent encourageants [35]. Cette technique d'autotransplantation de l'épithélium pigmentaire rétinien peut être actuellement considérée comme la seule réellement applicable en clinique humaine, dans le cadre strict d'expérimentations contrôlées.

Transplantations neuronales

Les transplantations neuronales ont été essentiellement envisagées dans le cadre des dystrophies rétinienne. Rappelons que, dans ce groupe de maladies, des mutations identifiées pour la plupart au niveau des photorécepteurs, et en particulier des bâtonnets, abou-

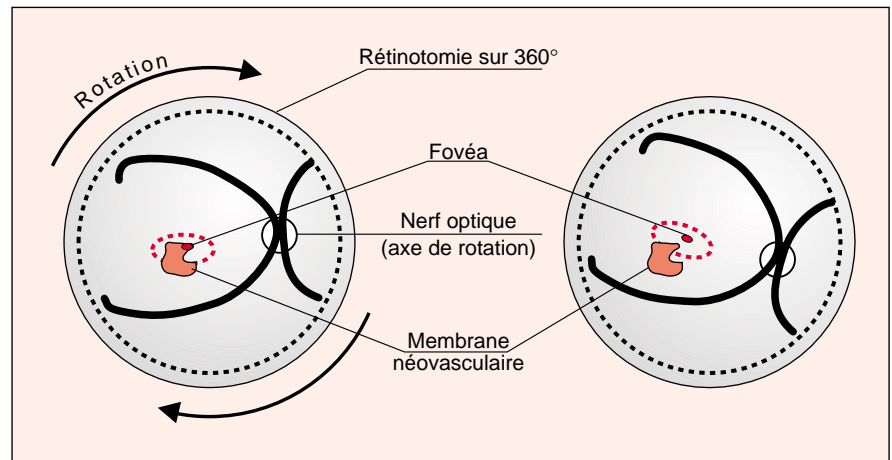


Figure 3. **Après une rétinotomie sur 360° la rétine neurale subit une légère rotation, selon l'axe du nerf optique, par rapport aux plans sous-jacents. La macula se retrouve alors en regard d'une zone saine de l'EPR et éloignée de la membrane néovasculaire qui sera alors détruite par photocoagulation au laser.**

tissent à la disparition par apoptose de ces cellules. Plusieurs équipes ont proposé leur remplacement par des transplantations de cellules embryonnaires ou de cellules adultes avec pour objectif la restauration fonctionnelle. Les principaux travaux expérimentaux ont été effectués par les équipes de Del Cerro dès 1985 [36] et de R. Aramant [37]. Ces deux équipes ont montré que l'injection de cellules immatures dissociées ou de fragments tissulaires dans l'espace sous-rétinien, permettait d'observer une survie cellulaire et certains indices de différenciation, c'est-à-dire la possibilité de marquage immuno-histochimique de types neuronaux rétinien au niveau des cellules greffées. Plus récemment, Aramant a décrit des phénomènes d'activation lumineuse au niveau des transplants [38]. Il faut cependant souligner que l'organisation tissulaire de ces transplants est fortement dysplasique puisque de très nombreuses rosettes, telles que celles observées lors des rétinoblastomes ou des dysplasies rétinienne, sont constantes dans ces transplants d'origine embryonnaire [36]. Ces anomalies d'alignement tissulaire ont été partiellement palliées par l'approche de Ehinger [39] qui a proposé l'implantation de tissu entier. L'agencement cellulaire est alors plus facilement respecté mais la connexion avec la rétine hôte est rendue impossible par la présence de l'ensemble des couches rétinienne.

Les modèles sur lesquels ces essais ont été réalisés sont représentés principalement par des rats chez lesquels une phototoxicité importante a abouti à la perte des photorécepteurs ou des mutants murins telle que la souris *rd* porteuse d'une mutation sur la sous-unité β de la phosphodiesterase avec une dégénérescence totale des bâtonnets.

Ces modèles présentent l'inconvénient d'une très petite taille rendant la méthode d'implantation variable dans ses effets et ses complications. D'autres modèles sont envisagés tels que des mutants spontanés chez le chat [40], le chien [41] ou, tout récemment, une souche de porc transgénique porteur de mutation dominante sur la rhodopsine [42]. L'avantage de ce dernier modèle est de simuler la situation clinique avec dégénérescence progressive des bâtonnets puis des cônes et de permettre une implantation chirurgicale analogue à celle réalisée chez l'homme ainsi qu'une évaluation fonctionnelle satisfaisante. En effet, l'évaluation fonctionnelle des résultats de la transplantation effectuée chez la souris ou le rat à partir de cellules embryonnaires s'est avérée très décevante. L'implantation de cellules adultes avait été proposée par Silvermann [9] dans le cadre de la dégénérescence par phototoxicité chez le rat avec, selon ses travaux, survie de la couche de photorécepteurs, voire rétablissement d'une connectivité.

Ces travaux, contestés, mais aussi ceux de l'équipe de Lund (*m/s* 1998, n° 3, p. 191) [43] sur l'implantation intracérébrale à proximité des centres visuels montrent la possibilité d'une reconnexion des cellules transplantées. Il semble cependant que le test fonctionnel principal utilisé (test photomoteur) et le faible nombre de reconnexions observées ne permettent pas d'espérer une véritable restauration fonctionnelle en clinique. Une expérimentation clinique a été menée par l'équipe de Del Cerro en Inde en 1995 et 1996. Les résultats qui n'ont été publiés que sous forme d'abstract et qui sont très contestés par la communauté scientifique font état d'une amélioration fonctionnelle obtenue chez deux patients sur huit. Le même type d'expérimentation, lorsqu'il a été réalisé aux États-Unis par De Juan en collaboration avec Del Cerro, n'a pas permis d'aboutir à des résultats concluants. Les difficultés d'interprétation des résultats fonctionnels après transplantation chez l'homme seront évoquées plus loin.

Effet paracrine de la transplantation neuronale

Une approche différente de la transplantation neuronale consiste à implanter des cellules saines afin qu'elles libèrent des facteurs de survie faisant défaut à la rétine au cours de la dégénérescence, mécanisme d'action probable de la greffe d'EPR chez le rat RCS. Cet effet paracrine pourrait trouver une place dans le cadre des rétinopathies pigmentaires en raison de la notion d'une dégénérescence séquentielle des deux populations de photorécepteurs, en l'occurrence les bâtonnets et les cônes. En effet, la symptomatologie visuelle présentée par les patients porteurs de rétinoopathie pigmentaire comporte initialement des signes d'atteinte des bâtonnets (troubles de l'adaptation à l'obscurité, rétrécissement du champ visuel) [30], puis d'atteinte des cônes (troubles de la vision des couleurs, rétrécissement du champ visuel central, perte d'acuité visuelle). Or, ce phénomène, noté aussi dans un modèle animal comme la souris *rd* depuis 1978 [44], ne pouvait plus être attribué à l'anomalie

causale depuis la mise en évidence de nombreuses mutations s'exprimant sélectivement au niveau des bâtonnets (rhodopsine, sous-unité β de la phosphodiesterase...). La mise au point de modèles transgéniques de mutations humaines a confirmé les observations cliniques et celles effectuées chez l'animal. Comme chez la souris *rd*, les mutants pour la rhodopsine chez la souris et le porc présentent une dégénérescence séquentielle des bâtonnets puis des cônes [44]. De plus, les modèles induisant l'élimination sélective des bâtonnets aboutissent eux aussi à la perte secondaire des cônes [45].

Nos travaux ont, dans un premier temps, cherché à établir la dépendance des cônes par rapport aux bâtonnets. Cela a été réalisé par deux techniques :

- la réalisation de transplants riches en bâtonnets adultes chez la souris mutante *rd* à un âge où la rétine hôte est dépourvue de bâtonnets [44] ;

- les expériences de co-cultures de rétines avec bâtonnets et rétines *rd* sans bâtonnets.

Nos résultats expérimentaux ont permis de prouver que la transplantation d'un tissu riche en bâtonnets permettait d'augmenter d'environ 25 % la survie des cônes, ce qui correspond à la quasi-totalité de la dégénérescence de cette population cellulaire pendant la période d'expérimentation (figure 4). Cet effet est observé à proximité, mais aussi à distance du transplant et n'est pas retrouvé lors d'expériences témoins réalisées par chirurgie sans implantation ou après implantation d'éléments de la rétine interne [10] (figure 5).

Des expériences de co-cultures mettant en présence, à travers des membranes semi-perméables, des explants de rétines *rd* âgées de 5 semaines, âge auquel l'ensemble des bâtonnets a dégénéré alors que les cônes sont au début de leur processus de dégénérescence, et des rétines encore riches en

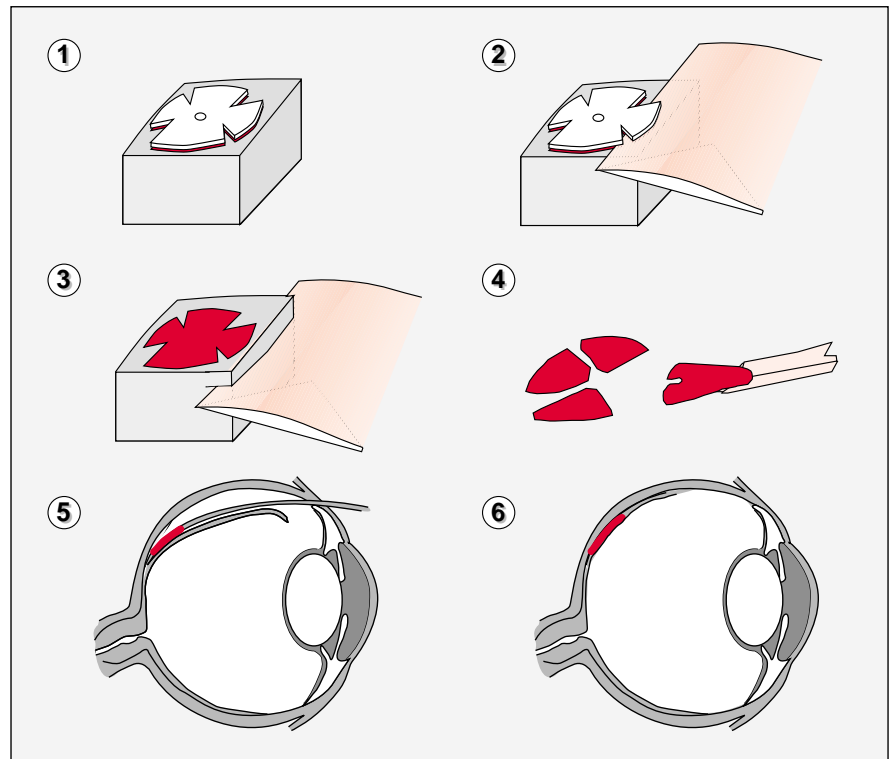


Figure 4. **Isolément et greffe des photorécepteurs.** La rétine donneuse est montée, photorécepteurs greffe vers le bas, sur un bloc de gélatine (1); on réalise alors à l'aide d'un vibratome des coupes progressives (2); une fois que la couche des photorécepteurs est atteinte, elle est prélevée avec une lamelle de gélatine qui permet de la garder dans son agencement anatomique (3). Des greffons sont découpés et chargés dans des canules de faible diamètre (4) et sont injectés dans l'espace sous-rétinien (5) où ils seront alors insérés (6).

bâtonnets (rétines mutantes jeunes, rétines normales jeunes ou adultes) ainsi que de multiples contrôles (milieux définis, rétines mutantes adultes) ont mis en évidence l'existence d'un signal diffusible présent dans les rétines avec bâtonnets et améliorant significativement la survie des cônes (50 % de la dégénérescence observée *in vitro*) (figures 6A et 6B). Ces résultats ont été obtenus grâce au recours à des méthodes de comptage cellulaire par stéréologie permettant l'estimation globale du nombre de cellules dans les rétines traitées, réduisant ainsi les variations régionales, écueil constant dans l'étude de la survie des photorécepteurs rétiniens chez l'animal mutant [46].

L'existence d'un facteur diffusible présent dans les rétines avec bâtonnets nous conduit à deux types de développement, l'un consistant à caractériser le (ou les) facteur(s) responsable(s), l'autre à préparer

l'application en clinique humaine, l'objectif étant ici de permettre le ralentissement de la dégénérescence des cônes et donc la préservation de la vision centrale quelle que soit la mutation causale.

Kaplan *et al.* (Saint-Louis, MI, USA) [4] et Jiang *et al.* (Boston, MA, USA) [47] n'ont pas observé de phénomènes de rejet lors de transplantations de bâtonnets. Cela semble lié à une expression moins importante des complexes d'histocompatibilité au niveau de ces cellules par rapport aux cellules de l'épithélium pigmentaire [32] et à un relatif privilège immunologique de l'espace sous-rétinien.

Conditions nécessaires au passage à l'expérimentation clinique

Les affections cibles de la transplantation chez l'homme sont actuelle-

ment limitées aux dystrophies rétiniennes touchant en France environ 30 à 40 000 personnes. On ne peut pas encore faire l'extrapolation à la dégénérescence maculaire liée à l'âge, en dehors du cas des translocations rétiniennes.

Un premier problème est lié à la disponibilité extrêmement réduite en France des tissus d'origine humaine et donc au cadre législatif et éthique dans lequel ces prélèvements doivent être pratiqués. Ce problème a déjà été examiné par l'Établissement Français des Greffes (*m/s* 1997, n° 3, p. 299). Une préoccupation évidente et majeure est la limitation des risques encourus par les patients lors de telles transplantations. Il faut noter que le tissu rétinien comme l'ensemble des tissus oculaires est très contaminant lorsqu'il est infecté par des prions ce qui impose, en l'absence de tests de dépistage, l'élimination soigneuse des donneurs à risque et le recours à toutes les précautions prévues par la loi, en particulier un âge des donneurs inférieur à 40 ans (circulaire DGS, 1995). Par ailleurs les conditions de sécurité microbiologique concernant les prélèvements, la préparation des tissus, la validation de leur viabilité, doivent être respectées. Le développement de l'instrumentation nécessaire à la transplantation chez l'homme n'a comporté, pour notre équipe comme pour d'autres, que peu de difficultés techniques compte tenu du développement considérable de la chirurgie vitréorétinienne, en particulier sous-rétinienne.

Un des principaux impératifs méthodologiques est représenté par une évaluation fonctionnelle satisfaisante des effets de la transplantation. Qu'il s'agisse d'une restauration fonctionnelle ou d'une stabilisation des fonctions visuelles, les résultats ne pourront être observés qu'à moyen et long termes. Sur le plan éthique, il est inconcevable de proposer une chirurgie sans implantation comme témoin. De ce fait, un bénéfice fonctionnel lié simplement à la réalisation d'un geste dans une affection jusqu'ici réputée incurable voire à l'expression et à la libération de cytokines induites par le geste chirurgical, peut perturber l'analyse. De plus, la notion d'une variabilité importante des épreuves fonctionnelles

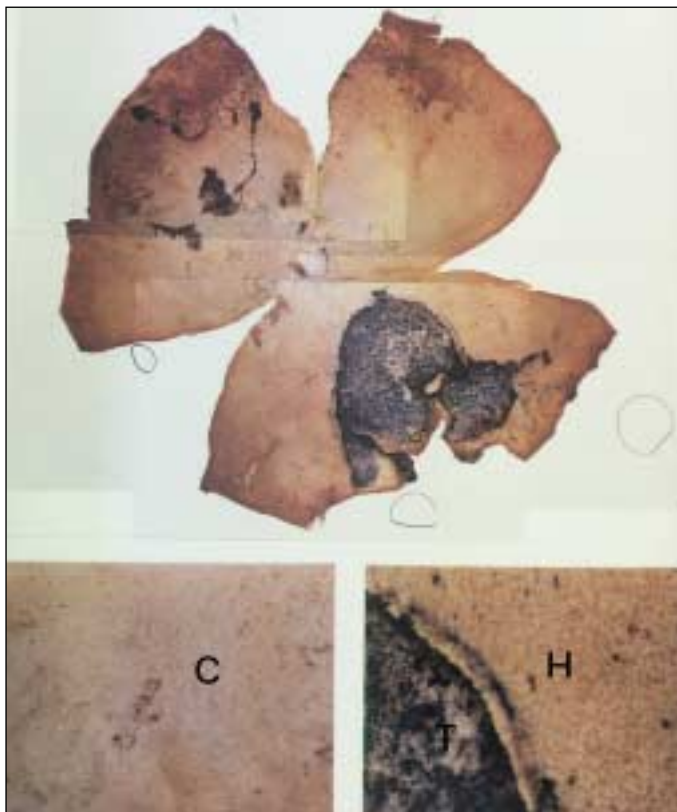
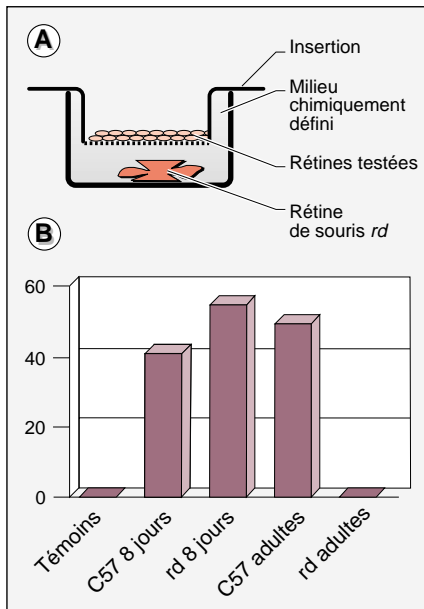


Figure 5. Montage à plat d'une rétine rd greffée avec une monocouche de photorécepteurs provenant d'une rétine d'une souris C57 saine. Double marquage immunocytochimique du transplant (T, en bleu avec l'anticorps anti-opsine = bâtonnets) et de la rétine hôte (H, en brun-rouge avec de la lectine de cacahuète = cônes). La rétine de l'œil adelphe montre une densité plus faible en cônes au niveau de l'aire correspondante (C).



chez les patients porteurs de dystrophies rétinienne est une donnée classique de la littérature [48, 49]. Les tests subjectifs (acuité visuelle, champ visuel) doivent donc être répétés, comparés et critiqués, mais surtout standardisés (échelle ETDRS) [49]. Les méthodes recourant à la micropérimétrie (projection de tests par ophthalmoscopie à balayage laser *in situ*) mais surtout par électrophysiologie (électrorétinogramme) sont indispensables. Compte tenu du caractère focal des effets observés, les méthodes d'électrophysiologie focale (électrorétinographie de type VERIS) s'avèrent ici d'un intérêt crucial [50]. La transition par les modèles tels que les porcs transgéniques restera nécessaire à toutes les étapes. Le modèle du chat d'Abyssinie porteur de deux mutations différentes, soit mutation *rdy* affectant la phosphodiesterase [40, 51], soit une mutation sur la IRBP (*inter retinal binding protein*) apparaît très utile en raison de la pos-

sibilité de réaliser des études électrophysiologiques et de comportement. De même, le setter irlandais dont la mutation a été identifiée (sous-unité β de la phosphodiesterase) [52] pourrait représenter un modèle fort utile.

Conclusions

La place de la transplantation rétinienne dans les dystrophies rétinienne et la dégénérescence maculaire liée à l'âge n'est pas encore établie. Les résultats expérimentaux sont partiellement encourageants, mais imposent des épreuves fonctionnelles chez l'animal et une rigueur méthodologique qui ne sont que progressivement mises en œuvre.

À l'heure actuelle, la translocation de l'épithélium pigmentaire et l'effet paracrine induit par la transplantation de bâtonnets dans les dystrophies bâtonnets/cônes (rétinite pigmentaire) apparaissent comme les deux perspectives les plus prometteuses. Elles doivent s'insérer dans le cadre d'autres approches thérapeutiques en cours de développement. L'une d'entre elles est représentée par l'emploi de facteurs de croissance (CNTF, FGF-2...) [21-23], facteurs dont l'application chez l'animal s'est avérée prometteuse. La deuxième approche est représentée par la thérapie génique visant, soit à corriger l'anomalie génétique [53], soit à administrer des facteurs neurotrophiques [54], ou enfin à inactiver une mutation dominante (ribozymes) [55]... A terme, la caractérisation des facteurs de survie des photorécepteurs, et tout particulièrement des cônes, pourrait conduire à une approche intégrant la pharmacologie aux thérapies cellulaire et génique, indépendamment de l'hétérogénéité génétique des dystrophies rétinienne touchant initialement les bâtonnets ■

RÉFÉRENCES

1. Algvare PV, Berglin L, Gouras P, Sheng Y. Transplantation of fetal retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration with subfoveal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1994; 232: 707-16.
2. Del Cerro M, Notter MFD, Cerro C, et al. Intraretinal transplantation for rod-cell replacement in light-damaged retinas. *J Neural Transplant* 1989; 1: 1-10.
3. Lavail MM, Li L, Turner JE, Yasumura D. Retinal pigment epithelial cell transplanta-

tion in RCS rats: normal metabolism in rescued photoreceptors. *Exp Eye Res* 1992; 55: 555-62.

4. Kaplan HJ, Tezel TH, Berger AS, Wolf ML, Del Priore LV. Human photoreceptor transplantation in retinitis pigmentosa. A safety study. *Arch Ophthalmol* 1997; 115: 1168-72.

5. Royo PE, Quay WB. Retinal transplantation from fetal to maternal mammalian eye. *Growth* 1959; 23: 313-36.

6. Del Cerro M, Gash DM, Notter MF, Wiegand SJ, Del Cerro C. Intraocular retinal transplants. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; 26: 1182-5.

7. Kaplan HJ, Tezel TH, DelPriore LV. Retinal pigment epithelial transplantation in age-related macular degeneration. *Retina* 1998; 18: 99-102.

8. Aramant R, Seiler M, Ehinger B, et al. Transplantation of human embryonic retina to adult rat retina. *Rest Neurol Neurosci* 1990; 2: 9-22.

9. Silverman MS, Hughes SE, Valentino TL, Luit Y. Photoreceptor transplantation: anatomic electrophysiologic, and behavioral evidence for the functional reconstruction of retinas lacking photoreceptors. *Exp Neurol* 1992; 15: 87-94.

10. Mohand-Said S, Hicks D, Simonutti M, et al. Photoreceptor transplants increase host cone survival in the retinal degeneration (*rd*) mouse. *Ophthalmic Res* 1997; 29: 290-7.

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

12. Gouras P, Flood MT, Kjeldbye H, Bilek MK, Eggers H. Transplantation of cultured human retinal pigment epithelium to Bruch's membrane of the owl monkey eye. *Curr Eye Res* 1985; 4: 253-65.

13. Li L, Turner JE. Inherited retinal dystrophy in the RCS rat: prevention of photoreceptor degeneration by pigment epithelial cell transplantation. *Exp Eye Res* 1988; 47: 911-6.

14. Sheedlo HJ, Li L, Turner JE. Functional and structural characteristics of photoreceptor cells rescued in RPE-cell grafted retinas of RCS dystrophic rats. *Exp Eye Res* 1989; 48: 841-54.

15. Gouras P, Lopez R. Transplantation of retinal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30: 1681-3.

16. Sheedlo HJ, Gaur V, Li L, Seaton AD, Turner JE. Transplantation to the diseased and damaged retina. *Trends Neurosci* 1991; 14: 347-50.

17. Seaton AD, Turner JE. RPE transplants stabilize retinal vasculature and prevent neovascularisation in the RCS rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33: 83-9.

18. Little CW, Castillo B, DiLorito DA, et al. Transplantation of human fetal retinal pigment epithelium rescues photoreceptor cells from degeneration in the Royal College of Surgeons rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 204-11.

RÉFÉRENCES

19. Whiteley SJ, Litchfield TM, Coffey PJ, Lund RD. Improvement of the pupillary light reflex of Royal College of Surgeons rats following RPE cell grafts. *Exp Neurol* 1996; 140: 100-4.
20. Jiang LQ, Hamasaki D. Corneal electroretinographic function rescued by normal retinal pigment epithelial grafts in retinal degenerative Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 4300-9.
21. Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM. Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by fibroblast growth factor. *Nature* 1990; 347: 83-6.
22. LaVail MM, Matthes MT, Yasumura D, et al. Protection of mouse photoreceptor by survival factors in retinal degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 592-602.
23. LaVail MM, Unoki K, Yasumura D, et al. Multiple growth factors, cytokines and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11249-53.
24. Hicks D, Courtois Y. Fibroblast growth factor stimulates photoreceptor differentiation *in vitro*. *J Neurosci* 1992; 12: 2022-33.
25. Fontaine V, Kinkl N, Sahel J, Dreyfus H, Hicks D. Survival of purified rat photoreceptors *in vitro* is stimulated directly by fibroblast growth factor-2. *J Neurosci* 1998 (sous presse).
26. Kirsch M, Fuhrmann S, Wiese A, Hofmann HD. CNTF exerts opposite effects on *in vitro* development of rat and chick photoreceptors. *NeuroReport* 1996; 7: 697-700.
27. Kirsch M, Lee MY, Wiese A, Hofmann HD. Evidence for multiple, local functions of ciliary neurotrophic factor (CNTF) in retinal development; expression of CNTF and its receptors and *in vitro* effects on target cells. *J Neurochem* 1997; 68: 979-90.
28. Fuhrmann S, Kirsch M, Hofmann HD. Ciliary neurotrophic factor promotes chick photoreceptor development *in vitro*. *Development* 1995; 121: 2695-706.
29. Yokoyama Y, Ozawa S, Seyama S, et al. Enhancement of apoptosis in developing chick neural retina cells by basic fibroblast growth factor. *J Neurochem* 1997; 68: 2212-5.
30. Sahel JA, Albert DM. Pathology of the retina. In: Albert DM, Jacobiek FA, eds. *Principles and practice of ophthalmology*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999 (sous presse).
31. Thomas MA, Dickinson JD, Melberg NS, Ibanez HE, Dhaliwal RS. Visual results after surgical removal of subfoveal choroidal neovascular membranes. *Ophthalmology* 1994; 101: 1384-96.
32. Zhang X, Bok D. Transplantation of retinal pigment epithelial cells and immune response in the subretinal space. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 1021-7.
33. Kohen L, Enzmann V, Schraermeyer U, et al. Ultrastructural findings after iris pigment epithelium transplantation into the subretinal space. XXIst Meeting of the Club Jules Gonin. Edinburgh, Scotland, August 1998, Abstract book, 108.
34. Eckardt C, Eckardt U, Conrad HG. Macular rotation combined with counter rotation of the globe in exudative macular degeneration. XXIst Meeting of the Club Jules Gonin. Edinburgh, Scotland, August 1998, Abstract book, 108.
35. De Juan E Jr, Loewenstein A, Bressler NM, Alexander J. Translocation of the retina for management of subfoveal choroidal neovascularization: a preliminary report in humans. *Am J Ophthalmol* 1998; 125: 635-46.
36. Del Cerro M, Gash DM, Rao GN, et al. Intraocular retinal transplants. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; 26: 1182-5.
37. Aramant R, Turner JE. Cross-species grafting of embryonic mouse and grafting of older postnatal rat retinas into the lesioned adult rat eye: the importance of cyclosporin A for survival. *Brain Res* 1988; 469: 303-7.
38. Seiler MJ, Aramant RB, Ball SL, Cai F. Light-dark shift S-antigen and rod transducin in photoreceptors of intact-sheet retinal transplants to adult light-damaged rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39 (suppl): S1051.
39. Ehinger B, Bergstrom A, Aramant RB, Zucker CL, Gustavii B, Adolph AR. Ultrastructure of human retinal transplants with long survival times in rats. *Exp Eye Res* 1991; 54: 447-60.
40. Curtis R, Barnett KC, Leon WK. An early-onset retinal dystrophy with dominant inheritance in the Abyssinian cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987; 37: 131-9.
41. Nilsson SEG, Wigstad A, Narfstrom K. Changes in the electroretinogram in Briard dogs with hereditary congenital night blindness and partial day blindness. *Exp Eye Res* 1992; 54: 291-6.
42. Petters RM, Alexander CA, Wells KD, et al. Genetically engineered large animal model for studying cone photoreceptor survival and degeneration in retinitis pigmentosa. *Nat Biotechnol* 1997; 15: 965-70.
43. Klassen H, Lund RD. Retinal transplants can drive a pupillary reflex in host rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 102: 102-8.
44. Carter-Dawson LD, LaVail MM, Sidman RL. Differential effect of the rd mutation on rods and cones in the mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1978; 17: 489-98.
45. McCall MA, Gregg RG, Merriman K, et al. Morphological and physiological consequences of the selective elimination of rod photoreceptors in transgenic mice. *Exp Eye Res* 1996; 63: 35-50.
46. LaVail MM, Matthes MT, Yasumura D, Steinberg RH. Variability in rate of cone degeneration in the retinal degeneration (rd/rd) mouse. *Exp Eye Res* 1997; 65: 45-50.
47. Jiang LQ, Hamasaki D. Corneal electroretinography function rescued by normal retinal epithelial grafts in retinal degenerative Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 4300-9.
48. Holopigian K, Greenstein V, Seiple W, Carr RE. Rates of change differ among measures of visual functions in patients with retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 1996; 103: 398-405.
49. Grover S, Fishman GA, Gilbert LD, Anderson RJ. reproducibility of visual acuity measurements in patients with retinitis pigmentosa. *Retina* 1997; 17: 33-7.
50. Seeliger M, Kretschmann U, Apfeldt-Sylla E, Ruther K, Zrenner E. Multifocal electroretinography in retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol* 1998; 125: 214-26.
51. Hussain AA, Curtis R, Leon A. Abnormal photoreceptor cGMP-phosphodiesterase in affected Rdy Abissinian cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30 (suppl): 309.
52. Clements PJM, Gregory CY, Peterson-Jones SM, Sargan DS, Bhattacharya SS. Confirmation of the rod cGMP phosphodiesterase beta subunit (PDEb) nonsense mutation in affected rcd-Irish setters in the UK and development of a diagnostic test. *Curr Eye Res* 1993; 12: 861-6.
53. Bennett J, Tanabe T, Sun D, et al. Photoreceptor cell rescue in retinal degeneration (rd) mice by *in vivo* gene therapy. *Nat Med* 1996; 2: 649-54.
54. Cayouette M, Gravel C. Adenovirus-mediated gene transfer of ciliary neurotrophic factor can prevent photoreceptor degeneration in the retinal degeneration (rd) mouse. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 423-30.
55. Dresner KA, Timmers AM, Hauswirth WW, Lewin AS. Ribozyme-targeted destruction of RNA associated with autosomal-dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 681-9.

Summary

Retinal transplantation: neurobiological problems and clinical perspectives

Retinal transplantation, formerly perceived as unrealistic, has become over the past decade a major clinical and biological undertaking in several laboratories and eye clinics. We describe the insights gained through the pioneering experimental works of Del Cerro *et al.*, Turner *et al.*, Gouras *et al.*, Silverman *et al.*, Aramant *et al.*, Lund *et al.* *e.g.* the survival of transplants, the lack of immune response to photoreceptors, their integration and expression of neuronal markers, but also the dysplastic arrangement into rosettes and the lack of a definitive proof for functionality. The rejection of retinal pigment epithelium transplants points towards the development of autotransplantation approaches (iris, macular translocation). The demonstration by our team of paracrine effects of transplanted photoreceptors on host cones in the *rd* mouse leads the way to human clinical trials and identification of cone survival factors.

TIRÉS À PART

J.A. Sahel.