

**Programme de la journée scientifique de l'axe**

**« Rétine et segment postérieur »**

**du**

**Réseau FRSQ de recherche en santé de la vision**

**Lundi 13 juin 2011**

**à**

**Amphithéâtre Justine Lacoste  
Hôpital Ste Justine  
Cote Sainte Catherine**

**Organisé par**

**Elvire Vaucher [elvire.vaucher@umontreal.ca](mailto:elvire.vaucher@umontreal.ca) et  
Christian Salesse [christian.salesse@crchul.ulaval.ca](mailto:christian.salesse@crchul.ulaval.ca)**

**8h15-8h30**  
**Inscription**  
**Jus, café et viennoiseries**

**Session de  
début de  
matinée**

**Modératrice : Elvire Vaucher**

<b>8H30-8h45</b>	Essential Role for Numb in Protein Sorting in Mouse Photoreceptor cells	<b>Vasanth Ramamurthy, Andreas Giessl, Demetra Koutroumbas, Yun-Zheng Le, Johann Helmut Brandstätter<sup>3</sup>, and Michel Cayouette</b>
<b>8h45-9h00</b>	CD36 est impliqué dans la formation de dépôts sous-rétiniens au cours de la dégénérescence maculaire liée à l'âge.	<b>Emilie Picard, Marianne Houssier, Kim Bujold, William Lubell, Allison Dorfman, Julie Racine, Pierre Lachapelle, Huy Ong, Florian Sennlaub, Sylvain Chemtob</b>
<b>9h00-9h15</b>	The p53 activators ASPP1 and ASPP2 regulate retinal ganglion cell death <i>in vivo</i> via regulation of fas and puma	<b>Ariel M. Wilson, Barbara Morquette, Elena Feinstein, Adriana Di Polo</b>
<b>9h15-9h30</b>	Existe-t-il une « calcium myristoyl switch » chez la GCAP-1 ?	<b>Philippe Calvez et Christian Saless</b>
<b>9h30-9h45</b>	GPR55 de la rétine au cerveau et son effet au cours du développement du système neurovisuel.	<b>Hosni Cherif, Alexandre Talbot et Jean- Francois Bouchard</b>
<b>9h45-10h00</b>	Oxygen exposure in newborn rats cause choroidal involution	<b>Zhuo Shao, Allison L. Dorfman, Martine Blais, Pierre Lachapelle, Pierre Hardy, Emilie Picard, Przemyslaw Sapieha, Sylvain Chemtob</b>
<b>10h00-10h30</b>	<b>Pause café</b>	

**Session de fin  
de matinée**

**Modérateur : Jean François Bouchard**

**10h30-10h45**

Longitudinal spectral domain optical coherence tomography evaluation during retinal neurodegeneration has quantitative predictive value for studies of neuroprotection in rats

*Lukas-Karim Merhi, M.V. Sarunic, J. Xu, Y. Bai, S. Lee, M. F. Beg, H.U. Saragovi*

**10h45-11h00**

Mimicking a progressive retinal degeneration with the photopic Hill and improving the quantification of clinical electroretinograms: it's about time... and frequency!

*Mathieu Gauvin, Jean-Marc Lina, Julie Racine, Pierre Lachapelle*

**11h00-11h15**

Implication possible de la dopamine dans les anomalies mesurées à l'électrorétinographie retrouvées chez les patients atteints de maladies psychiatriques

*Joëlle Lavoie, Martin Beaulieu, Marc Hébert*

**11h15-11h30**

Light induced retinopathy mimics age-related macular degeneration in rats: Histological, vascular and functional evidences.

*Polosa A and Lachapelle P*

**11h30-11h45**

Tumor necrosis factor- $\alpha$  and calcium permeable AMPA receptors mediate retinal ganglion cell death in experimental glaucoma.

*Jorge Luis Cueva Varga, Ingrid Osswald, Nicolas Unsain, Phil Barker, Derek Bowie, Adriana Di Polo*

**11h45-12h00**

Le role de PAR-2 dans la rétinopathie du prématuré

*Sitaras Nicholas, Joyal J, Shao Z, Zaniolo K, Sapieha P, Chemtob S*

**12h00-12h15**

Expression, purification et liaison membranaire des rétinols déhydrogénases 8 et 11

*Elodie Boisselier, Marie-Lou Audet, Mario Méthot, Line Cantin, Christian Salessé*

**12h15-13h30**

**Pause repas**

**Workshop sur la  
Neuroprotection rétinienne et la survie des photorécepteurs  
Présentation du Dr. Zack par H. Uri Saragovi (modérateur)**

<b>13h30-14h30</b>	A High Content Screen to Identify Retinal Neuroprotective Molecules	Donald Zack
	<b>Modérateur : Patrick Rochette</b>	
<b>14h30-14h50</b>	Redox-Active Neuroprotection	Leonard Levin
<b>14h50-15h10</b>	Neuronal and vascular protection in glaucoma: does galantamine do the trick ?	Adriana Di Polo
<b>15h10-15h30</b>	<b>Pause café</b>	
<b>15h30-15h50</b>	Homeostatic receptor-mediated mechanisms in the retina: neuroprotection versus neurotoxicity in vivo	H. Uri Saragovi
<b>15h50-16h10</b>	Free radicals, ocular aging, and neuroprotective strategies	Gilbert Bernier
<b>16h10-16h30</b>	<b>Période de questions pour les conférenciers du workshop</b>	
<b>16h30</b>	<b>Remise des prix pour les meilleures présentations</b>	

## Essential Role for Numb in Protein Sorting in Mouse Photoreceptor cells

Vasanth Ramamurthy<sup>1,2</sup>, Andreas Giessl<sup>3</sup>, Demetra Koutroumbas<sup>2</sup>, Yun-Zheng Le<sup>4</sup>, Johann Helmut Brandstätter<sup>3</sup>, and Michel Cayouette<sup>1,2,5</sup>

1. Institute de Recherches Cliniques de Montreal (IRCM), Montreal, QC.
2. Division of Experimental Medicine and Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University, Montreal, QC.
3. Department of Biology, Animal Physiology, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany
4. Department of Cell Biology, University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, OK, USA
5. Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC.

Proteins need to be targeted in a polarized manner to different cellular compartments to perform specific function. What are the cellular and molecular mechanisms regulating this process? The photoreceptor cell is an exquisite model to study polarized localization of proteins to a highly specialized compartment. The outer segment (OS), which is a stack of disk membranes surrounded by a plasma membrane, serves as an exclusive housing unit of a specific pool of proteins involved in phototransduction. As such, OS are critical for photoreceptor cell function and mutations in genes that affect the development and integrity of OS often lead to photoreceptor degenerative diseases in humans, but the mechanisms that regulate protein sorting in OS remain unclear. Recent studies have shown that Numb, an endocytic adapter protein, plays a part in regulating directional protein trafficking in migrating cells and neurons, raising the possibility that it might be involved in OS protein sorting. Consistent with this hypothesis, we found that Numb is expressed in a highly polarized manner exclusively in the proximal part of the photoreceptor OS, where protein sorting takes place. To study the role of Numb in OS, we have conditionally inactivated Numb and Numbl (Nbl; a homolog of Numb) in photoreceptors using a photoreceptor specific Cre mouse line (Opsin-Cre). Conditional double knockouts (cDKO) show abnormal accumulation of an OS plasma membrane protein, the cyclic nucleotide gated channel A1 (CNGC-A1), in cell bodies and inner segments of photoreceptors. Importantly, OS proteins localized to the disk membranes were not affected, suggesting a specific function for Numb in the localization of OS plasma membrane proteins. Interestingly, electron microscopy analysis of cDKO retinas revealed that the spatial arrangement of the OS was severely disrupted, which ultimately leads to retinal degeneration. Our results indicate that Numb function is required for polarized protein sorting to the OS of mouse photoreceptors, and identifies the Numb pathway as a potential player in photoreceptor function and degeneration in humans.

CD36 est impliqué dans la formation de dépôts sous-rétiniens au cours de la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age.

Emilie Picard<sup>1</sup>, Marianne Houssier<sup>2</sup>, Kim Bujold<sup>4</sup>, William Lubell<sup>3</sup>, Allison Dorfman<sup>5</sup>, Julie Racine<sup>5</sup>, Pierre Lachapelle<sup>5</sup>, Huy Ong<sup>4</sup>, Florian Sennlaub<sup>2</sup>, Sylvain Chemtob<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Département de Pédiatrie, Ophtalmologie et Pharmacologie, Centre de Recherche, Hôpital Ste Justine, Montréal, Québec, Canada,

<sup>2</sup>Centre de Recherche des Cordeliers, UMR S 872, Université Pierre et Marie Curie, Université Paris Descartes, Paris, F-75006 France

<sup>3</sup> Département de Chimie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>4</sup> Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>5</sup>Departments of Ophthalmology, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

**Introduction :** La DMLA débute avec la formation de dépôts lipidiques et protéiques, appelés drusen, dans l'espace sous-rétinien entre l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) et la membrane de Bruch (MB). Il en résulte une atrophie de l'EPR, une dégénérescence des photorécepteurs et une involution choroïdienne, processus caractérisant la forme sèche de la DLMA. Nous avons montré que le récepteur scavenger CD36 est indispensable à l'internalisation des lipides oxydés par l'EPR (Picard et al., Aging, 2010). Une souris déficiente en CD36, présente un épaissement de la MB, une dégénérescence rétinienne et une involution choroïdienne (Houssier et al. Plos Med, 2008 ; Picard et al., Aging, 2010). Nous étudions l'effet d'un traitement chronique par le peptide CP3(IV), un analogue de la famille des growth hormone-releasing peptides (GHRPs), ligand de CD36, sur l'épaississement de la MB induits au cours du vieillissement et dans le modèle de souris déficientes en apolipoprotéine E (ApoE<sup>-/-</sup>).

**Résultats :** Nous montrons que le traitement de souris WT âgées de 1 an par CP3(IV) pendant 9 semaines permet de réduire l'épaississement de la MB, l'accumulation de lipides et de oxLDL sous l'EPR et de restaurer la vascularisation choroïdienne, dépendamment de CD36. Des résultats analogues sont observés chez des souris ApoE<sup>-/-</sup> sous diète enrichie en lipides pendant 12 semaines.

Les cellules humaines ARPE19 traitées par POV-PC, ligand spécifique du site de liaison des lipides oxydés sur CD36, induit une mort des cellules dose-dépendant. Le traitement par CP3(IV) réduit la présence de fibres de stress. Les ARPE-19 et les cellules de l'EPR issues de souris nouveaux-nés en culture primaire, traitées avec CP3(IV), induit l'expression de CD36, et du transporteur lipidique Abca1, et réduit l'expression de VEGF. L'exposition par POV-PC induit une mort des cellules endothéliales choroïdiennes issues d'explants de choroïde de souris. Le traitement par CP3(IV) permet de protéger les cellules endothéliales dépendamment de l'expression de CD36.

**Conclusion :** En conclusion, nous montrons le rôle important de CD36 dans l'évacuation des lipides oxydés par l'EPR et que la modulation de l'expression de CD36 par CP3(IV) au niveau de l'EPR prévient les dépôts lipidiques dans la membrane de Bruch. De plus, CP3(IV) permet de restaurer la vasculature choroïdienne due à l'accumulation de lipides oxydés sous l'EPR conséquence d'une déficience en CD36 au cours du vieillissement.

## The p53 Activators ASPP1 and ASPP2 Regulate Retinal Ganglion Cell Death In Vivo Via Regulation of Fas and Puma

Ariel M. Wilson<sup>1</sup>, Barbara Morquette<sup>1</sup>, Elena Feinstein<sup>2</sup>, Adriana Di Polo<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Pathology and Cellular Biology, University of Montreal, Montreal, QC, Canada; <sup>2</sup>Research, Quark Pharmaceuticals Inc, Ness Ziona, Israel.

**Purpose:** The ASPP (Ankyrin-repeats, SH3-domain and Proline-rich-region-containing Protein) family members, ASPP1 and ASPP2, are essential regulators of p53 activity, but their role in the death of central nervous system neurons is unknown. Here, we addressed their function on retinal ganglion cell (RGC) loss in a model of acute optic nerve injury (axotomy) using novel siRNAs that selectively silence ASPP1 or ASPP2 gene expression in vivo.

**Methods:** Rat or mice (p53 null) RGCs were retrogradely labeled by application of Fluorogold to the superior colliculus prior to intraorbital optic nerve axotomy. siRNA against ASPP1, ASPP2 or GFP were administered by intravitreal injection at the time of axotomy and a week later. RGC densities were quantified on retinal whole mounts and data analysis and statistics were performed by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison post-test. ASPP1/2, Fas, Puma, and Bax protein levels were examined by retinal immunohistochemistry and western blot analysis.

**Results:** Remarkable RGC survival was found in axotomized p53 knockout mice retinas compared to wild-type littermate controls, demonstrating that RGCs die in a p53-dependent manner. We show that ASPP proteins are abundantly expressed in intact and injured RGCs, and that siRNAs against ASPP1 and ASPP2 lead to RGC survival. The combination of siRNA against ASPP1 and ASPP2 with brain-derived neurotrophic factor (BDNF) further increased the survival of injured RGCs. Combined therapy of ASPP1/2 siRNA with BDNF led to ~60% of surviving RGCs in treated eye, compared to ~40% in control eyes (n=4-6/group) at 2 weeks post-lesion. Our biochemical analysis of p53 downstream effectors, revealed a marked decrease in Puma and Fas levels in siASPP1- and siASPP2-treated retinas compared to controls, whereas Bax levels remained unaffected.

**Conclusions:** Our data demonstrate that p53 is an essential regulator of RGC death, and that targeted gene silencing of the p53 activators ASPP1 or ASPP2 effectively delays RGC death after acute optic nerve lesion. Importantly, we demonstrate that the neuroprotective effect of ASPP1 or ASPP2 depletion occurs via downregulation of the p53 targets Fas and PUMA.

## Existe-t-il une « calcium myristoyl switch » chez la gcap-1 ?

Philippe Calvez et Christian Salesse

LOEX / CUO–recherche, Centre de recherche du CHA, Hôpital du St-Sacrement, Centre hospitalier affilié universitaire (CHA).

Les neuroprotéines sensibles au calcium (NCS) forment une famille de 14 petites protéines exprimées dans le système nerveux central. Elles sont, pour la plupart, acylées au niveau N-terminal par un groupement myristoyl de 14 carbones. Les NCS possèdent également 4 motifs *EF-Hand* permettant la liaison du calcium. La recoverine ainsi que les protéines activatrices de la guanylate cyclase (GCAPs) représentent les seules NCS exprimées au niveau des photorécepteurs. Elles modulent la concentration du GMPc intracellulaire, le principal messenger de la phototransduction. L'activité de la recoverine est liée à l'extrusion de son groupement myristoyl. En effet, en absence de calcium, la recoverine adopte une structure globulaire dans laquelle ce myristoyl est enfoui dans le cœur de la protéine et maintenu dans une poche hydrophobe. La liaison du calcium par les motifs « EF-Hand » permet la libération de ce groupement myristoyl. Ce mécanisme est appelé *calcium myristoyl switch*. Il permet à la recoverine de lier les membranes des photorécepteurs et de complexer la rhodopsine kinase, son effecteur. Par contre, l'existence d'une telle *calcium myristoyl switch* pour la GCAP-1 est moins claire et fait ici l'objet d'une analyse détaillée de l'état des connaissances.

Étant donné les caractéristiques structurales communes des NCS, il a longtemps été présumé que toutes ces protéines comportaient une « calcium myristoyl switch ». Toutefois, sa mise en évidence s'est révélée compliquée. En effet, parmi les nombreuses structures de NCS connues à haute résolution, seules les structures de la GCAP-1 et de la recoverine myristoylées ont été déterminées en présence de calcium. Ces données ont montré l'extrusion du myristoyl de la recoverine alors que le myristoyl de la GCAP-1 est resté enfoui dans sa poche hydrophobe. Cependant, cette structure de la recoverine a été réalisée avec un 13-oxo-myristoyl. Il est possible que la présence de cet oxygène dans la chaîne carbonée ait favorisé l'extrusion de cet acide gras en diminuant son hydrophobicité. De ce fait, il est vraisemblablement erroné d'utiliser cette structure pour affirmer que la GCAP-1 ne possède pas de *calcium myristoyl switch*. Par ailleurs, certaines NCS pour lesquelles l'absence d'une *calcium myristoyl switch* avait été mise en évidence, sont maintenant identifiées comme possédant un mécanisme fonctionnel. En effet, l'utilisation d'approches biophysiques a récemment permis de mettre en évidence de façon indirecte une *calcium myristoyl switch* chez la GCAP-2, la fréquenine, la neurocalcine, l'hippocalcine et la VILIP-1. L'ensemble des travaux concernant l'étude de ce mécanisme chez les NCS suggère fortement que l'extrusion du myristoyl dépend de la proximité de ces protéines avec des membranes. Toutefois, les travaux rapportant l'influence du calcium sur la structure de la GCAP-1 ont en grande majorité été réalisés en milieu aqueux. Il est donc nécessaire d'étudier la mobilité du groupement myristoyl de la GCAP-1 dans des vésicules lipidiques en présence et en absence de calcium afin de vérifier l'existence d'une *calcium myristoyl switch* pour cette protéine. Il faudrait confirmer ces données en déterminant la structure de la GCAP-1 non acylée en présence et en absence de calcium par cristallographie.

**Information première:**

**Titre:** GPR55 de la rétine au cerveau et son effet au cours du développement du système neurovisuel.

**Auteur(s):** Hosni Cherif, Alexandre Talbot et Jean- Francois Bouchard

**Email contact:** hosni.cherif@umontreal.ca

**Affiliation:** École d'optométrie – Université de Montréal

**Résumé:**

Le but de cette étude est d'identifier la présence de GPR55 et sa contribution fonctionnelle, plus spécifiquement au niveau de la croissance et du guidage axonal. Nous tenterons également d'identifier les mécanismes moléculaires par lesquels GPR55 module ces effets. Des neurones corticaux provenant d'embryons murins (E14-15) et des explants rétinien ont été utilisés. Ils ont été traités à l'aide d'agonistes et d'antagonistes du récepteur GPR55 afin de vérifier leurs effets sur la morphologie du cône de croissance. À l'aide d'une technique d'immunobuvardage, différentes voies de signalisation ont été testées. L'effet de l'activation ou de l'inactivation de GPR55 sur le comportement du cône de croissance a été également évalué en temps réel à l'aide de micro-injections. Le traitement pharmacologique avec le lysophosphatidylinositol (LPI), un agoniste endogène de GPR55, a augmenté la taille du cône croissance et le nombre de filopodes. L'application d'O1602, un agoniste de GPR55, a induit des effets similaires. À l'inverse, le cannabidiol, un antagoniste de GPR55, les a diminués. Les résultats des tests de microinjections et de microscopie en temps réel confirment l'attraction des cônes de croissance en présence de LPI et leur répulsion en présence du cannabidiol. Nos résultats démontrent que l'action du GPR55 n'est pas médié par la voie de l'AMPc et de la protéine kinase A. Des tests préliminaires sur d'autres voies de signalisation (RhoA/ROCK, AKT et Erk $\frac{1}{2}$ ) suggèrent que RhoA et ROCK participent à l'effet médié par les agonistes et antagonistes de GPR55. Le récepteur GPR55 est présent au niveau du système nerveux visuel lors du développement. Son action module de façon importante le guidage axonal et est médiée par RhoA. L'identification de GPR55 comme cible pharmacologique pourrait s'avérer très importante pour le développement de stratégies visant le traitement de pathologies majeures telle la cécité et les désordres développementaux requérant une excellente compréhension des mécanismes impliqués dans la croissance et le guidage axonal lors du développement et lors de la régénération.

## Oxygen Exposure In Newborn Rats Cause Choroidal Involution (Zhuo Shao, Ph.D. candidate)

*Authors:* Zhuo Shao<sup>1,2</sup>, Allison L. Dorfman<sup>4</sup>, Martine Blais<sup>1</sup>, Pierre Lachapelle<sup>4</sup>, Pierre Hardy<sup>1</sup>, Emilie Picard<sup>1</sup>, Przemyslaw Sapielha<sup>3</sup>, Sylvain Chemtob<sup>1,2</sup>

### *Institutions:*

1. Department of Pediatrics Ophthalmology and Pharmacology, CHU Sainte-Justine Research Center, Montreal, Quebec, Canada;
2. Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, Quebec, Canada, H3G 1Y6;
3. Department of Ophthalmology, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada;
4. Department of Ophthalmology/Neurology–Neurosurgery, McGill University-Montreal Children's Hospital Research Institute, Montreal, Quebec, Canada,

**Retinopathy of prematurity (ROP) is the leading cause of blindness in newborns. This disorder is characterized by an initial dropout of retinal vasculature followed by retinal neovascular formation due to ischemic insult. Intriguingly, functional electroretinogram (ERG) studies in mild/moderate ROP patients reveal geographic discrepancies between areas of retinal vessel loss and those of functional compromise where vascular degeneration occurs predominantly in the periphery while ERG dysfunction is primarily confined to the central retina. Given these inconsistencies, we set out to investigate if abnormalities in choroidal vascular, the major oxygen contributor to the outer retina, may account for this disparity. Here we demonstrate in rat models of oxygen induced retinopathy (OIR) not only retinal vaso-obliteration but also pronounced choroidal degeneration specifically confined to the central regions of the retina accompanying photoreceptors damage. Moreover, we show that 15 deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) (a non-enzymatic product of prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>)) is a prominent contributor to the choroidal damage. Our findings demonstrate for the first time a prominent role for choroidal vascular decay in the development of ROP, and suggest that effective therapeutic strategies to counter ROP should consider choroidal preservation.**

## Longitudinal Spectral Domain Optical Coherence Tomography Evaluation During Retinal Neurodegeneration has Quantitative Predictive Value for Studies of Neuroprotection in Rats

Lukas-Karim Merhi<sup>1</sup>, M.V. Sarunic<sup>1</sup>, J. Xu<sup>1</sup>, Y. Bai<sup>2</sup>, S. Lee<sup>1</sup>, M. F. Beg<sup>1</sup>, H.U. Saragovi<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Engineering Science, Simon Fraser University, Burnaby, BC, Canada;

<sup>2</sup> Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, QC, Canada

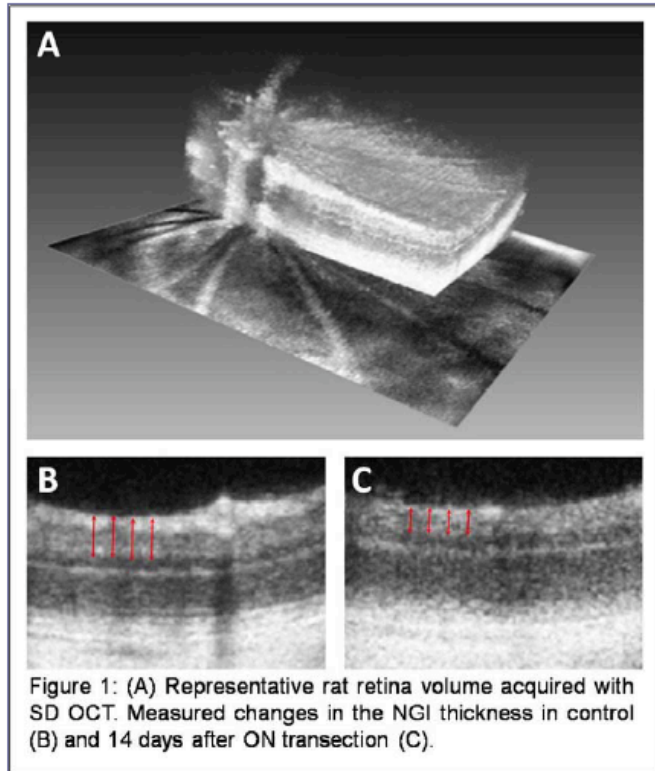


Figure 1: (A) Representative rat retina volume acquired with SD OCT. Measured changes in the NGL thickness in control (B) and 14 days after ON transection (C).

**Purpose:** To investigate Spectral Domain Optical Coherence Tomography (SD OCT) for quantitative high resolution measurement of retinal thinning in a longitudinal study of two rat models of optic nerve damage.

**Methods:** Microsurgeries were performed to induce an acute injury (optic nerve transection) or chronic elevated intra-ocular pressure (episcleral vein cauterization) in the right eye of 12 rats. The contralateral eye of each animal was maintained as a control. Half of the rats (3 from each group) received a neurotrophic neuroprotection treatment to slow the progression of axonal degeneration. Volumetric SD OCT imaging of both eyes was performed every second day over 14 days for the acute injury group, and every week over 6 weeks for the elevated IOP group. A representative rat retinal volume is presented in Fig 1 (a). The thickness of the combined Nerve Fiber Layer, Ganglion Cell Layer, and Inner Plexiform Layer (abbreviated NGL) was measured at a distance of 1.5mm from the ONH at 4 locations on each of 6 frames selected throughout the volume. The measurements from 3 volumes for each

eye (a total of 72 measurements per eye) were averaged and recorded. The difference in NGL thickness as observed through by SD OCT of a control and an acute injury eye after 14 days is presented in Fig 1 (b) and (c).

**Results:** The combined thickness of the NGL layers as measured by SD OCT in normal retinas was  $71 \pm 0.6 \mu\text{m}$ . The SD OCT measurements of NGL gradually decreased to a final thickness  $54.7 \pm 1.15 \mu\text{m}$  14 days after ON transection, while in the treated group it was  $60.8 \pm 0.33 \mu\text{m}$  (significant versus untreated,  $P \leq 0.001$ ). In the elevated IOP group, the SD OCT measurements of NGL thickness gradually decreased to  $51.2 \pm 2.6 \mu\text{m}$ , while in the treated group it was  $60.4 \pm 0.13 \mu\text{m}$  (significant versus untreated elevated IOP,  $p \leq 0.02$ ).

**Conclusions:** SD OCT was successfully demonstrated as a repeatable technique for quantitative measurements of retinal thinning in time course studies of acute and chronic injury to the optic nerve.

## Mimicking a Progressive Retinal Degeneration with the Photopic Hill and Improving the Quantification of Clinical Electroretinograms: It's About Time... and Frequency!

**Authors:** *Mathieu Gauvin*<sup>1</sup>, *Jean-Marc Lina*<sup>2</sup>, *Julie Racine*<sup>1</sup>, *Pierre Lachapelle*<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Department of Ophthalmology, McGill University, Montreal, QC, Canada; <sup>2</sup>Département de génie électrique, École de Technologie Supérieure, Montreal, QC, Canada.

**Purpose:** In response to a progressively brighter stimulus, the amplitude of the human photopic b-wave steadily increases to reach a maximum value following which a gradual decrease is noted despite even brighter flashes, a phenomenon known as the photopic hill (PH). We examined if the inverted PH (IPH: from Vmax to ERG to dimmest flash) could be used to model the progressive functional loss that characterizes several retinal degenerative processes and if the discrete wavelet transform (DWT) could more accurately quantify residual clinical ERGs. **Methods:** This study was conducted on photopic ERGs from normal subjects [n=85; flash stimuli: -2.62 to 0.64 log cd.sec.m<sup>-2</sup> in 17 steps of ~ -0.2 log-unit; background: 30cd.m<sup>-2</sup>] and from patients [n=55; flash intensity: 0.64 log cd.sec.m<sup>-2</sup>; background: 30cd.m<sup>-2</sup>; minimum of 3 visits; time interval: 5 to 25 years]. Descriptors derived from the DWT were used to quantify the ERGs and were compared to the traditional a-wave and b-wave amplitude measurements. Using these descriptors, normal luminance-response (L-R) graphs were computed and correlated with the functional loss that time would produce in the presence of retinal degeneration. Least square linear regression was used to fit the IPH model and the functional loss. For each patient we computed the corresponding number of years per stimulus decrement by scaling the IPH model to fit the pathological degeneration. We also computed the coefficient of determination (R<sup>2</sup>). When it was possible, we quantified the ERGs using the traditional method to evaluate the impact of the DWT on the model. **Results:** In normal, the IPH gradually decreased from 131.42±31.27µV (Vmax) to 0.71±0.12 µV (dimmest flash used) in two distinct pseudo-asymptotical steps: from 0.64 to -1.0 log cd.sec.m<sup>-2</sup> [R<sup>2</sup>=0.9741, slope: -33.20±4.38µV.s per decrement; 9 steps total] and from -1.0 to -2.62 [R<sup>2</sup>=0.8996, slope: -1.0324±0.18µV.s per decrement; 9 steps total]. Of interest, a significantly higher coefficient of variation (CV≈80%) was observed at the asymptotes intersection suggesting a light-sensitive threshold property of the retina. Pathological ERGs could always be fitted to this model. However, the intensity decrement equivalence between two consecutive ERG measures varied significantly between patients (CV>50%) and did not appear to be time dependent. The latter was most obvious in conditions where the two eyes were affected differently at the onset. For most patients (>55%), retinal function degenerated with a linear fashion (R<sup>2</sup>>0.8). In patients where more than two ERG measures were obtained, our model was sometime able to predict the time of occurrence of the next ERG value with 98% accuracy. The traditional measurements frequently failed to quantify residual ERGs while the DWT was still able to extract the hidden retinal response, leading to different prognosis. **Conclusions:** The two distinct pseudo-asymptotical steps that describe the IPH were never reported. The fact that the prognosis distributions are different with both analysis methods raises a question: Which of these techniques leads to the most accurate measurements? We believe that the DWT analysis is more precise. According to the preliminary results the IPH could be used to model the progression of some degenerative retinopathies, a feature that could possibly help in the staging and prognosis of these patients particularly when the DWT analysis is used. Supported by FFB (USA).

## **Implication possible de la dopamine dans les anomalies mesurées à l'électrorétinographie retrouvées chez les patients atteints de maladies psychiatriques**

**Joëlle Lavoie**<sup>1</sup>, Martin Beaulieu<sup>1</sup>, Marc Hébert<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre de recherche Université Laval Robert-Giffard, Québec

**Contexte et objectifs :** Des anomalies des fonctions rétiniennes ont été observées chez des patients affectés de certaines maladies psychiatriques comme le trouble affectif saisonnier (TAS) ainsi que chez des enfants à haut risque génétique de développer la maladie bipolaire ou la schizophrénie (EHR). Ces déficits ont été observés grâce à la technique d'électrorétinographie (ERG) qui permet une mesure objective du fonctionnement rétinien. Dans le cas des patients atteints du TAS, une diminution de la sensibilité des bâtonnets a été observée tandis que chez les EHR, une baisse de la fonction des bâtonnets a été retrouvée. Sachant que ces changements peuvent être liés à une dysfonction dopaminergique, l'objectif de cette étude est d'investiguer si les déficits observés sont reliés à un problème au niveau du fonctionnement des récepteurs dopaminergiques de type D1 ou D2 ou bien au niveau de l'expression de la dopamine.

**Méthodes:** Une ERG a été mesurée en condition photopique et scotopique chez différentes souris knockout (wildtypes (WT) vs homozygotes (HO)) soit pour le transporteur de la dopamine (DAT-KO) ce qui résulte en une augmentation de 5x du niveau de dopamine extracellulaire à la synapse, ou pour les récepteurs dopaminergiques de type D1 (D1R-KO) ou D2 (D2R-KO). À partir de l'amplitude des réponses obtenues, deux paramètres sont étudiés soit la sensibilité (logK) et la réponse maximale (Vmax) de la rétine.

**Résultats:** Chez les souris DAT-KO HO, on observe une diminution de la sensibilité rétinienne en mode scotopique représentée par une augmentation du logK (WT = -1.97 unités log, HO = -1.84 unités log; P = 0.0340). Pour leur part, les souris D1R-KO HO présentent une diminution marquée du Vmax lorsque mesuré en mode photopique (WT = 341.70  $\mu$ V, HO = 267.05  $\mu$ V; P = 0.0023) et scotopique (WT = 491.42  $\mu$ V, HO = 393.43  $\mu$ V; P<0.0001). Aucun changement rétinien n'est retrouvé chez les souris D2R-KO.

**Conclusion:** Les résultats obtenus démontrent l'implication de la dopamine et du récepteur D1 dans la modulation de la réponse de l'ERG. La diminution du Vmax en mode scotopique observée chez les souris D1R-KO homozygotes corrobore ce qui est observé chez les EHR, tandis que la baisse de sensibilité rétinienne retrouvée chez les souris DAT-KO corrobore ce qui est observé chez les patients atteints du TAS. Somme toute, la dopamine semble être un neurotransmetteur impliqué dans la modulation de l'ERG.

**Light induced retinopathy mimics age-related macular degeneration in rats:  
Histological, vascular and functional evidences.**

**Polosa A and Lachapelle P**

Ophthalmology/Neurology-Neurosurgery, McGill Univ/Montreal Children's Hospital,  
Montreal, QC, Canada.

**Purpose:** Light-induced retinopathy in albino Sprague-Dawley (SD) rats results in regional variations, with a preferential cells loss occurring in a defined region of the supero-temporal retina at a position where the macula would be if rats had one (Polosa et al., ARVO 2009). The present study examined if a similar region exists in pigmented Long-Evans (LE) rats known to be more resistant to light damage.

**Methods:** Juvenile (J; n=27) and adult (A; n=12) LE rats were exposed to a bright cyclic light (10 000lux) from postnatal day 14-28 (JLE) or for 6 consecutive days (ALE). Histological, vascular and functional [mfERGs] distribution of light damage along the supero-inferior axis was performed at different days post light exposure.

**Results:** In ALE, the outer retina was almost completely destroyed (with an abundant invasion of macrophages) in the same region (supero-temporal quadrant) as that previously reported in SD rats. The extent of this region increased ( $p < 0.05$ ) from  $736 \pm 66 \mu\text{m}$  at D1 to  $1602 \pm 208 \mu\text{m}$  at D31 and was accompanied by a similar ( $p < 0.05$ ) growth in the melanin deprived area adjacent to it from  $995 \pm 260 \mu\text{m}$  at D1 to  $1643 \pm 151 \mu\text{m}$  at D31 (normal LE rats:  $775 \pm 107 \mu\text{m}$ ). In the JLE retinas, despite a non-significant loss of melanin [P30:  $798 \pm 209$  and P120:  $987 \pm 207 \mu\text{m}$ ] no changes in ONL thickness could be observed from controls between P30-P35. By P35, ONL loss occurred in two phases: rapid cell death (P35-P50) followed by a slower progressive degeneration (P50-120). By P120, a greater damage to the same region of the superior retina as seen in adults became evident, however to a lesser extent. The inferior retina always revealed a limited and uniform distribution of light damage. Similar functional hemiretinal disparities could also be demonstrated with the mfERG, as well as a decrease in retinal vasculature.

**Conclusion:** Our results suggest that although pigmented rats are more resistant to light damage, light exposure nonetheless triggers a progressive degeneration within a defined region of enhanced susceptibility in the superior retina (similar to that observed in the albino strain) that can be demonstrated anatomically and electrophysiologically. As previously suggested (for albino rats), this region of maximal damage in the supero-temporal quadrant of the eye is situated in an area that would correspond to the macula, should rats have one. Interestingly, this supero-temporal region also lacks melanin pigment (as in the human macula) and age appears to be an important factor in determining the severity of damage, where older rats disclose a more severe retinopathy than younger ones. We therefore believe that our results provide strong evidence for the existence of a physiological macula in rats (both albino and pigmented) and consequently, the resulting light-induced retinopathy would represent a good animal model of the human age-related macular degeneration. Funded by NSERC

PhD Student

## **Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ and Calcium Permeable AMPA Receptors Mediate Retinal Ganglion Cell Death in Experimental Glaucoma.**

*Jorge Luis Cueva Vargas,<sup>1</sup> Ingrid Osswald<sup>2A</sup>, Nicolas Unsain<sup>2B</sup>, Phil Barker<sup>2B</sup>, Derek Bowie<sup>2A</sup>, Adriana Di Polo<sup>1</sup>.*

<sup>1</sup>Pathology and Cell Biology, University of Montreal, Montreal, QC, Canada;

<sup>A</sup>Pharmacology and Therapeutics, <sup>B</sup>Montreal Neurological Institute, <sup>2</sup>McGill University, Montreal, QC, Canada

**Purpose:** The primary mechanism of retinal ganglion cell (RGC) damage in glaucoma is not well understood. Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) has emerged as a key regulator of neuronal glutamate receptors in the central nervous system. Here, we tested the hypothesis that TNF- $\alpha$  mediates RGC loss in experimental glaucoma by stimulating plasma membrane insertion of calcium-permeable AMPA receptors (CP-AMPA) in these neurons.

**Methods:** RGC retrograde labeling was carried out by application of DiI onto the superior colliculus. Ocular hypertension (OHT) was induced a week later by injection of hypertonic saline into an episcleral vein in Brown Norway rats. The expression of TNF- $\alpha$  and its receptors, TNFR1 and TNFR2, was examined by RT-PCR, western blots and immunohistochemistry. Cell surface CP-AMPA were visualized using a cobalt (Co<sup>2+</sup>) staining technique. The following agents were independently injected into the vitreous chamber: i) the TNF- $\alpha$  inhibitor Etanercept; ii) the CP-AMPA blockers GYKI 52466 or Philantotoxin 343 (PhTX); or iii) the caspase-8 inhibitor Z-IETD-FMK. RGC neuroprotection was evaluated by quantification of RGC soma and axons.

**Results:** Gene and protein expression of retinal TNF- $\alpha$ , TNFR1 and TNFR2 were rapidly upregulated following OHT surgery and prior to RGC death. Co<sup>2+</sup> uptake, which occurs only through CP-AMPA, was markedly increased in RGCs of glaucomatous eyes compared to control eyes; and was selectively blocked by GYKI or PhTX. Intraocular injection of the TNF- $\alpha$  inhibitor (Etanercept) or the CP-AMPA blockers (GYKI, PhTX) led to RGC neuroprotection in experimental glaucoma. For example, GYKI and Etanercept promoted 82% and 81% RGC survival (n=8-10/group), respectively, compared to 68% in vehicle-treated controls (n=8) at 3 weeks of OHT. In contrast, caspase-8 inhibitors did not protect RGCs in this model.

**Conclusions:** Our data support a key role for TNF- $\alpha$  and CP-AMPA in RGC loss in experimental glaucoma.

## Le rôle de PAR-2 dans la rétinopathie du prématuré

Sitaras Nicholas<sup>1,2</sup>, Joyal J-S<sup>3</sup>, Shao Z<sup>3</sup>, Zaniolo K<sup>1</sup>, Sapieha P<sup>2</sup>, Chemtob S<sup>1,2,3</sup>

CHU Sainte-Justine Research Center, Department of Pharmacology<sup>1</sup>, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5

Maisonneuve-Rosemont Research Center, Department of Ophthalmology<sup>2</sup>, University of Montreal, Montréal, Quebec, Canada, H1T 2M4

Department of Pharmacology and Therapeutics<sup>3</sup>, McGill University, Montreal, Quebec, Canada, H3G 1Y6

**Introduction:** La rétine est un tissu hautement vascularisé qui contribue à l'irrigation et à l'homéostasie des neurones. Durant les périodes d'ischémies, comme dans les Rétinopathies Prolifératives (RPs), les neurones jouent un rôle important dans la revascularisation de la rétine en sécrétant des facteurs pour stimuler l'angiogenèse. En particulier, nous avons déjà démontré le facteur répulsif, la Sema3A sécrété par les cellules ganglionnaires (CGR), contribue à aggraver les RPs. Récemment, nous avons identifié le rôle du récepteur PAR-2, exprimé sur les CGRs, dans l'angiogenèse durant le développement. Cependant, sa contribution dans les RPs n'a malheureusement jamais été établie.

**Méthodes:** Nous avons évalué l'expression du récepteur PAR-2 par Immunohistochimie et Western blot lors de la vasooblitération (VO) et la néovascularisation (NV) chez les souris ayant subi une hyperoxie (75 % O<sub>2</sub>) de P7 à P12 (modèle de rétinopathie induite par l'oxygène (RIO)). Afin de déterminer le rôle de PAR-2 sur la Sema3A, nous avons évalué son expression par qPCR en temps-réel après une injection intraoculaire de son agoniste peptidique, SLIGRL, chez les souris RIO. Des souris transgéniques n'exprimant pas PAR-2 (PAR2KO) ont été utilisées pour identifier le rôle du récepteur dans le modèle de RIO. Des lignées de cellules RGC-5 natives ou traitées avec un shRNA contre PAR-2 ont été utilisées comme modèle *ex vivo*.

**Résultats:** Chez les souris ayant subi le RIO, l'expression de PAR-2 est diminuée durant la phase de VO (P12) mais augmentée durant la phase de NV (P16). De plus, suite à l'injection de l'agoniste, SLIGRL, l'expression de la Sema3A dans la zone ischémique de la rétine est diminuée. In vitro, la stimulation des RGC-5 par SLIGRL augmente l'expression de VEGF, Ang-2 et TNF- $\alpha$ , mais diminue la Sema3A. Une augmentation de l'angiogenèse est aussi observée lorsque des explants d'aortes sont incubés avec le milieu conditionné de ces cellules RGC-5. Cet effet est aboli en utilisant les RGC-5 infectées avec le shPAR-2. In vivo, l'effet angiogénique de PAR-2 est aussi observé. En effet, les souris sauvages exposées à l'hyperoxie ont démontré une revascularisation plus rapide suite à l'injection de l'agoniste de PAR-2, ce que n'était pas observé chez les souris transgéniques PAR2KO.

**Conclusion:** Cette étude souligne l'importance des neurones dans les PRs. Le récepteur PAR-2, spécifique aux CGRs, joue un rôle important dans la revascularisation de la rétine suite à une hyperoxie.

Mr Sitaras est étudiant au doctorat dans le labo de Dr Chemtob / Dr Sapieha

## **Expression, purification et liaison membranaire des rétinoles déhydrogénases 8 et 11**

BOISSELIER, ELODIE; Audet, Marie-Lou; Méthot, Mario; Cantin, Line; Salesse, Christian. LOEX / CUO–recherche, Centre de recherche du CHA, Centre universitaire d’ophtalmologie, Hôpital du St-Sacrement, Centre hospitalier affilié universitaire de Québec (CHA) et Département d’ophtalmologie, Faculté de médecine, Université Laval, Québec.

**OBJECTIF:** L’absorption de la lumière par le pigment visuel, la rhodopsine, mène à l’isomérisation du 11-cis rétinol en tout-trans rétinol et à sa réduction en tout-trans rétinol. Ce dernier composé est ensuite isomérisé en 11-cis rétinol puis oxydé en 11-cis rétinol afin de régénérer la rhodopsine. Les rétinoles déhydrogénases (RDH) qui sont très peu caractérisées effectuent cette interconversion entre les formes rétinol et rétinol. On sait cependant que des mutations de la RDH5 et de la RDH12 sont responsables de dystrophies de la rétine. L’objectif de ces travaux consiste à surexprimer, purifier, mesurer l’interaction membranaire et à déterminer la structure de la RDH8 et de la RDH11.

**MÉTHODES:** La RDH11 contient un peptide transmembranaire en N-terminal. Ce peptide de 26 acides aminés a été obtenu commercialement. La RDH11 ainsi que la N-del RDH11 (un délétant des 26 premiers acides aminés en N-terminal) ont été clonés, surexprimés chez E.coli, purifiés par chromatographie d’affinité, puis concentrés par ultrafiltration. L’activité de la N-del RDH11 a été mesurée en présence de son substrat, le tout-trans rétinol; la réaction fut initiée par l’ajout de son cofacteur, le NADPH. Les produits de la réaction ont été analysés par HPLC. Des mesures de liaison membranaire ont été effectuées en injectant la RDH11, la N-del RDH11 ou le peptide en N-terminal dans la sous-phase d’une monocouche de phospholipides à l’interface air-eau. Leur structure secondaire et leur orientation ont été déterminées par spectroscopie infrarouge. La RDH8 a été clonée dans plusieurs vecteurs d’expression bactériens soit en fusion avec la glutathion-S-transférase (GST) ou avec la protéine de liaison du maltose (MBP), soit surexprimée avec une queue poly-histidine (poly-His) afin d’identifier les conditions optimales de purification. Différents tests de purification ont été effectués en présence de divers détergents pour améliorer la solubilité de la protéine.

**RÉSULTATS ET CONCLUSION:** Les résultats obtenus en HPLC démontrent une activité très élevée de la N-del RDH-11. La cinétique de liaison membranaire en monocouche varie comme suit : peptide en N-terminal > RDH11 > N-del RDH11, ce qui est cohérent avec leur structure. De plus, les mesures de spectroscopie infrarouge ont permis de confirmer la structure en hélice alpha du peptide en N-terminal et de déterminer son orientation, ainsi que de comparer la structure et l’orientation de la RDH11 et de la N-del RDH11. Pour la RDH8, les résultats obtenus avec ces méthodes seront également présentés.

Almasieh, M., Pouliot, M., Kelly, M.E., Casanova, C., Vaucher, E., **Di Polo, A.** Department of Pathology & Cell Biology and School of Optometry, University of Montreal

**Purpose:** A correlation between high intraocular pressure (IOP) and retinal ischemia has been established, but little is known about the relationship between neuronal and vasculature degeneration in glaucoma. We previously demonstrated that the acetylcholinesterase inhibitor galantamine protects retinal ganglion cells (RGCs) in glaucoma. Here, we asked whether galantamine-induced neuroprotection correlates with changes in the retinal microvasculature.

**Methods:** Chronic elevation of IOP was induced in Brown Norway rats by injection of a hypertonic saline solution into an episcleral vein (Morrison model). Treatment began on the first day of IOP increase by daily dose (3.5 mg/kg, i.p.) of galantamine. Neuroprotection was evaluated by quantification of RGC soma and axons, and by recording visual evoked potentials (VEPs) from the superior colliculus. The retinal vasculature was visualized by lectin immunohistochemistry or dextran, and the density of retinal capillaries was quantified. Regional ocular blood flow was assessed by quantitative autoradiography using N-isopropyl-p-14C-iodoamphetamine ([<sup>14</sup>C]-IMP), a diffusible radioactive tracer.

**Results:** At 5 weeks after ocular hypertension surgery, RGC death was accompanied by a dramatic reduction in the density of the retinal microvasculature. Galantamine-mediated protection of RGCs (69%, n=16) correlated with marked preservation of capillaries in the retinal fiber layer (70%, n=8) compared to vehicle (37% RGCs, n=14; 40% vessels, n=6). The preservation of vasculature correlated with marked restoration of the retinal blood flow in glaucomatous eyes and recovery of the VEP in the corresponding superior colliculus. Biochemical analysis indicated that blockers of muscarinic ACh receptors (mAChR) inhibited the neuro- and vaso-protective effects of galantamine.

**Conclusions:** Our data indicate that galantamine-mediated neuroprotection in glaucoma correlates with vasculature preservation. Our study supports a therapeutic role for galantamine in glaucoma and reveals mAChR as a potential clinical target for this neurodegenerative disease.

## **Redox-Active Neuroprotection**

Len Levin

Département d'ophtalmologie, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Université de Montréal.

Retinal ganglion cell (RGC) death is the irreversible result of all optic neuropathies, in most cases initially arising from damage to the RGC axon. Our studies over the past few years have demonstrated that the signal transduction pathway for axonal injury to RGCs invokes a burst of superoxide anion ( $O_2^-$ ) within the RGC body. We also showed that agents that block thiol oxidation, a likely target of superoxide anion, also prevent RGC death equivalent to neuroprotection with neurotrophic factors. Thus, our data indicate that this is an important signaling pathway for RGC death in optic nerve disease. We hypothesized that agents that specifically block thiol oxidation at physiologically relevant concentrations would inhibit RGC death in culture and in animal models of optic neuropathy, with eventual translation to use in patients. To do this, we have produced derivatives of tris-(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP), modified to cross cell membranes, which could act as prodrugs, be protected from oxidation, and target RGCs. We now demonstrate the chemical, biological, and neuroprotective qualities of these compounds *in vitro* and *in vivo*.

## **Neuronal and vascular protection in glaucoma: does galantamine do the trick ?**

Almasieh, M., Pouliot, M., Kelly, M.E., Casanova, C., Vaucher, E., **Di Polo, A.**

Department of Pathology & Cell Biology and School of Optometry, University of Montreal

**Purpose:** A correlation between high intraocular pressure (IOP) and retinal ischemia has been established, but little is known about the relationship between neuronal and vasculature degeneration in glaucoma. We previously demonstrated that the acetylcholinesterase inhibitor galantamine protects retinal ganglion cells (RGCs) in glaucoma. Here, we asked whether galantamine-induced neuroprotection correlates with changes in the retinal microvasculature.

**Methods:** Chronic elevation of IOP was induced in Brown Norway rats by injection of a hypertonic saline solution into an episcleral vein (Morrison model). Treatment began on the first day of IOP increase by daily dose (3.5 mg/kg, i.p.) of galantamine. Neuroprotection was evaluated by quantification of RGC soma and axons, and by recording visual evoked potentials (VEPs) from the superior colliculus. The retinal vasculature was visualized by lectin immunohistochemistry or dextran, and the density of retinal capillaries was quantified. Regional ocular blood flow was assessed by quantitative autoradiography using N-isopropyl-p-14C-iodoamphetamine ([14C]-IMP), a diffusible radioactive tracer.

**Results:** At 5 weeks after ocular hypertension surgery, RGC death was accompanied by a dramatic reduction in the density of the retinal microvasculature. Galantamine-mediated protection of RGCs (69%, n=16) correlated with marked preservation of capillaries in the retinal fiber layer (70%, n=8) compared to vehicle (37% RGCs, n=14; 40% vessels, n=6). The preservation of vasculature correlated with marked restoration of the retinal blood flow in glaucomatous eyes and recovery of the VEP in the corresponding superior colliculus. Biochemical analysis indicated that blockers of muscarinic ACh receptors (mAChR) inhibited the neuro- and vaso-protective effects of galantamine.

**Conclusions:** Our data indicate that galantamine-mediated neuroprotection in glaucoma correlates with vasculature preservation. Our study supports a therapeutic role for galantamine in glaucoma and reveals mAChR as a potential clinical target for this neurodegenerative disease.

## **A Balance of Neuroprotective versus Neurotoxic Mechanisms in Glaucoma**

H Uri Saragovi, Marinko V. Sarunic, Pauline Dergham, Hinyu Nedev, Alba Galan, Mei Young, Delia Sivori, Kenneth E. Neet, Fabian S Lerner, Yujing Bai.

Neurotrophins such as NGF or BDNF normally provide neuroprotection and maintenance of neuronal function and phenotype. In experimental glaucoma there is up-regulation of neurotrophins. The receptors for neurotrophins are also up-regulated, including a truncated form of TrkC, TrkC.T1. However, neurotrophins are not able or sufficient to provide long-lasting neuroprotection.

Thus, we asked (A) whether endogenous factors negatively modulate neurotrophin signals; (B) whether there are conflicting actions by each neurotrophin receptor: “neurotoxic” p75 (expressed primarily in glia), versus “neuroprotective” Trk receptors (expressed primarily in RGCs); and (C) what is the role of TrkC.T1 (expressed primarily in glia).

In human glaucoma and rat experimental glaucoma models we detected up-regulation of  $\alpha$ 2-macroglobulin, a soluble protein which is directly neurotoxic to RGCs. Activated retinal glia secretes  $\alpha$ 2-macroglobulin in glaucoma but not in optic nerve axotomy.  $\alpha$ 2-macroglobulin is up-regulated in a p75-receptor-dependent manner: p75 antagonists block it, and p75 agonists induce it. The p75 receptor also is implicated in the up-regulation of TNF- $\alpha$ , but surprisingly the TrkC.T1 receptor also has a key role in regulating TNF- $\alpha$ . Using p75 antagonists and a genetic knockout of TrkC.T1 receptor, we demonstrated the concept of reducing neurotoxicity to promote RGC survival and preservation of the nerve fiber layer in glaucoma. The mechanism is by reducing production of  $\alpha$ 2-macroglobulin and TNF- $\alpha$ .

Moreover,  $\alpha$ 2-macroglobulin negatively modulates NGF-TrkA action, thereby neutralizing intrinsic neuroprotective mechanisms. To promote neuroprotection we used a mutant form of NGF, NGF-C, that is not neutralized by  $\alpha$ 2-macroglobulin and can activate TrkA receptors. NGF-C promotes RGC survival in experimental glaucoma, but wild type NGF does not. Similarly, direct activation of TrkA or TrkB receptors with selective agonists also provides RGC neuroprotection and preservation of the nerve fiber layer.

In conclusion, in neurodegenerative processes there is a balance of p75 and TrkC.T1 actions in glia and TrkA/TrkB actions in RGCs. Antagonists of p75, TrkC.T1, or  $\alpha$ 2-macroglobulin reduce neurotoxicity. Selective agonists of TrkA or TrkB provide direct neuroprotection. This work may help to design better strategies for glaucoma and other neurodegenerative disorders.

## **Free radicals, ocular aging, and neuroprotective strategies**

Gilbert Bernier

Département d'ophtalmologie, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Université de Montréal.

Oxidative damage to cellular macromolecules and DNA is believed to represent a prime cause of cellular and tissue aging. Aerobic respiration by mitochondria metabolism represents one of the main sources of free radicals and this effect is counteracted by the presence of free radicals scavenging molecules in mitochondria that are encoded by the cellular genome. We have reported that Bmi1, a transcription factor of the Polycomb group gene family, regulates lifespan and the rate of brain and ocular aging in mice through indirect, positive regulation of antioxidant genes expression in neurons. We present new evidences here that over-expression of Bmi1 in cultured neurons is highly neuroprotective. We will discuss about the underlying mechanism and possible therapeutic applications for neurodegenerative diseases.