



Etude des mécanismes de maintenance et de spécification des cellules souches et progénitrices de la rétine du xénope

Nicolas Mazurier

► To cite this version:

Nicolas Mazurier. Etude des mécanismes de maintenance et de spécification des cellules souches et progénitrices de la rétine du xénope. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA11T101 . tel-00980574

HAL Id: tel-00980574

<https://theses.hal.science/tel-00980574>

Submitted on 18 Apr 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Sud XI

Spécialité : Neurosciences

Par

Nicolas Mazurier

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris-Sud XI

Etude des mécanismes de maintenance et de spécification des cellules souches et progénitrices de la rétine du xénope

Thèse présentée et soutenue le 19 décembre 2012 devant le jury composé de :

Laurent Théodore	Président du jury
Eric Bellefroid	Rapporteur
Marie-Paule Felder Schmitbuhl	Rapporteur
Anne-Hélène Monsoro-Burq	Examineur
Carlos Parras	Examineur
Muriel Perron	Directeur de thèse

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Sud XI

Spécialité : Neurosciences

Par

Nicolas Mazurier

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris-Sud XI

Etude des mécanismes de maintenance et de spécification des cellules souches et progénitrices de la rétine du xénope

Thèse présentée et soutenue le 19 décembre 2012 devant le jury composé de :

Laurent Théodore	Président du jury
Eric Bellefroid	Rapporteur
Marie-Paule Felder Schmitbuhl	Rapporteur
Anne-Hélène Monsoro-Burq	Examineur
Carlos Parras	Examineur
Muriel Perron	Directeur de thèse

Remerciements

Après trois ans de thèse et de longs mois passés à l'écriture de ce manuscrit, je me rends compte à quel point l'entourage professionnel et personnel est important. Ce cheminement ne peut se faire seule mais est basé sur l'échange, le partage, l'entraide, l'amitié... C'est seulement à cet instant où cette aventure touche à sa fin, que je me rends compte à quel point ce traditionnel exercice des remerciements s'impose. Je souhaite donc adresser mes remerciements à tous ceux qui ont participé de près, de très près même et de plus loin à cette aventure.

A tous les membres du jury, Laurent Théodore, Eric Bellefroid, Marie-Paule Felder Schmitbuhl, Anne-Hélène Monsoro-Burq et Carlos Parras qui ont accepté de juger ce travail de thèse.

A Muriel Perron, ma directrice de thèse qui m'a accueilli dans son équipe pour mon stage de master 2 et qui m'a donné envie de continuer en thèse. Merci Muriel de m'avoir communiqué ton goût pour la science, de m'avoir guidé tout au long de ces quatre années, de m'avoir aidé à remettre mes idées au clair mais aussi pour tout le temps que tu as consacré à la correction de ce manuscrit. J'espère que mon travail dans ton laboratoire a été à la hauteur de ton exigence scientifique.

A Morgane Locker pour sa participation au projet Ascll, ses idées et sa plume affûtée. A Odile Bronchain pour tous ses petits tuyaux de biologie moléculaire mais aussi pour son aide sur les analyses in silico.

A Johanna Hamdache pour m'avoir appris à manipuler ces xénopes, pour avoir fait en sorte que les grosses journées du mardi se passent bien. A Christophe de Meideros, notre animalier, pour son attention envers les xénopes, nos discussions et les moments passés près de la seine à guetter nos cannes à pêche. A Marie Ange Richard pour son aide, sa bonne humeur perpétuelle et ses mousses au chocolat.

A Karine Parain pour ses nombreuses hybridations in situ réalisées à la perfection, pour m'avoir formé et aidé lors de mes tous premiers pas au laboratoire. Travailler avec toi

sur des projets communs comme le crible m'a appris, à travers les défis que nous nous sommes lancés, à être plus rigoureux mais aussi encore plus rapide. Qui aura la plus belle in situ ? Qui finira en premier ?

A Pauline Cabochette pour sa bonne humeur, son humour, son aide et son soutien sans faille. A Magdalena Hidalgo pour avoir pris la relève de l'organisation des réunions du laboratoire et ses conseils avisés.

A Caroline Borday pour ses nombreuses aides tout au long de ces quatre ans jusqu'à l'écriture de ce manuscrit. Merci Caro pour ta gentillesse, tes nombreux conseils qui m'ont beaucoup apportés, ta bonne humeur, pour m'avoir sans cesse encouragé, écouté et soutenu dans les moments difficiles. Travailler avec toi a été un réel plaisir.

A Pauline Maurin et Ujjwal Banerjee, mes stagiaires, qui m'ont donné l'occasion de découvrir l'encadrement et de transmettre à mon tour.

A tous les autres membres et anciens du laboratoire, Albert Chesneau, Ferdinand Kaya, André Mazabraud et Guillermo Veg. Warif El Yakoubi et JP Dullin, mes compagnons de thèses avec qui j'ai beaucoup échangé, Jean Pierre Müller, Chantale, Emmanuelle Maillard, Gabriele Colozza et Isabelle.

A ma famille pour avoir supporté ma mauvaise humeur surtout de ces derniers mois, compris mes priorités et m'avoir toujours laissé faire mes propres choix. A mes amis que j'ai un peu mis de côté mais je suis de retour et surtout à Julia pour son soutien, sa patience, sa compréhension et pour son aide précieuse au quotidien.

Merci à vous tous !

Ah oui, merci aussi à mon ordinateur qui m'a beaucoup fait transpirer mais qui a tenu le coup jusqu'à la fin...

Résumé

Au cours de ma thèse, mes projets de recherche ont visé à mieux comprendre les mécanismes moléculaires contrôlant la prolifération et la spécification des cellules progénitrices dans la rétine du xénope à travers trois projets principaux.

Le réseau de régulation qui contrôle la spécification des cellules progénitrices vers les sous-types neuronaux est à ce jour très peu connu. C'est dans ce contexte que j'ai étudié le rôle du facteur de transcription à domaine bHLH, *Ascl1*, dans la détermination des sous-types rétiniens au cours du développement. Par des approches *in vivo* de gain et perte de fonction d'*Ascl1*, des expériences d'épistasie et la recherche de ses cibles transcriptionnelles, j'ai pu mettre en évidence qu'*Ascl1* (i) est impliqué dans la genèse des neurones GABAergiques rétiniens, (ii) qu'il est épistatique sur des facteurs glutamatergiques tels que *Neurog2*, *NeuroD1* ou *Atoh7*, (iii) que son activité GABAergique est conférée par son domaine basique de liaison à l'ADN et (iv) que cette activité implique la régulation directe du facteur de transcription *Ptf1a*. Ces données ajoutent donc une nouvelle pièce au réseau transcriptionnel gouvernant la spécification des sous-types GABAergiques au cours du développement de la rétine.

La mise en place correcte des types et sous-types cellulaires de la rétine nécessite une coordination avec le moment de sortie du cycle cellulaire des progéniteurs rétiniens. Dans ce contexte, j'ai contribué à l'avancée d'un projet visant à étudier le réseau de signalisation contrôlant la prolifération des précurseurs de la rétine. Par des approches *in vivo*, génétiques et pharmacologiques, cette étude a montré que les voies Wnt et Hedgehog s'antagonisent pour réguler l'activité proliférative des cellules souches et progénitrices rétiniennes. Nos données préliminaires suggèrent que ces voies agissent de façon opposée à la fois sur la sortie et sur la cinétique du cycle cellulaire. Ce travail nous a conduit à proposer un modèle selon lequel ces voies Wnt et Hedgehog réguleraient la balance entre prolifération et différenciation dans la rétine post-embryonnaire.

Enfin, dans le but d'élargir nos connaissances sur les réseaux de signalisation et les réseaux transcriptionnels impliqués dans le contrôle de la prolifération et de la détermination cellulaire dans la rétine, j'ai également contribué à la recherche de nouveaux marqueurs spécifiques des différentes populations cellulaires rétiniennes au travers d'un crible à grande échelle par hybridation *in situ*. De nombreux gènes spécifiquement exprimés dans les cellules souches ou les cellules progénitrices constituent des gènes candidats pour de futures approches fonctionnelles.

Table des matières

<i>Liste des abréviations.....</i>	<i>4</i>
<i>Liste des figures.....</i>	<i>5</i>
<i>Avant propos.....</i>	<i>7</i>

I. Introduction

1. L'œil des vertébrés.....	10
1.1. Anatomie et fonction de l'œil	10
1.2. Structure de l'épithélium pigmenté et de la neuro-rétine.....	12
1.3. Développement embryonnaire de l'œil.....	16
1.3.1. L'induction, un phénomène clef dans la mise en place de l'œil.....	18
1.3.2. Induction du territoire oculaire	19
1.3.3. Les facteurs de transcription impliqués dans la spécification du territoire oculaire "Eye Field transcription factors".....	19
1.3.4. Scission du territoire oculaire, mise en place des champs optiques	22
1.3.5. Régionalisation des vésicules optiques et formation des cupules optiques ..	23
2. La spécification des cellules rétinienne.....	27
2.1. Histogenèse de la rétine et lignage des progéniteurs rétinien.....	27
2.1.1. Ordre de naissance des types cellulaires conservé chez les vertébrés	27
2.1.2. La multipotence des progéniteurs rétinien	28
2.2. Les facteurs extrinsèques impliqués dans la rétinogenèse.....	29
2.2.1. Facteurs de croissance et voies de signalisation	29
2.2.2. Rôle des facteurs extrinsèques dans le rétrocontrôle des neurones sur les progéniteurs.....	30
2.2.3. Le modèle de compétence.....	31
2.3. Régulation transcriptionnelle de la rétinogenèse : les facteurs intrinsèques.....	32
2.3.1. Les gènes proneuraux : historique	32
2.3.2. Rôle des facteurs bHLH au cours de la rétinogenèse	34
2.3.3. Autres facteurs de transcription	35
2.3.4. Les combinaisons de facteurs de détermination	36
2.3.5. Régulation de la séquence temporelle de naissance des types cellulaires ...	38
2.3.5.1. Régulation des facteurs de détermination par les EFTFs	40
2.3.5.2. Cascade transcriptionnelle des facteurs de détermination.....	41
2.3.5.3. La voie Notch/Delta dans le contrôle de l'identité temporelle.....	42
2.3.5.4. Régulation post-transcriptionnelle.....	45

2.3.6.	Hétérogénéité des progéniteurs.....	47
2.3.7.	Lignage stéréotypé ou stochastique	48
2.3.8.	A quel moment du cycle cellulaire les progéniteurs sont-ils déterminés ?..	50
2.3.9.	Influence du cycle cellulaire sur le destin neural et <i>vice versa</i>	51
2.3.10.	Influence du mode de division symétrique versus asymétrique sur le destin neural.....	53
2.3.11.	L'implication des mécanismes épigénétiques au cours de la rétino-genèse .	54
2.3.12.	Stabilisation du destin cellulaire	55
2.3.13.	Conclusion : une multitude de mécanismes impliquée dans la rétino-genèse ..	55
3.	Les sous-types cellulaires rétinien-s et leur détermination	57
3.1.	Les sous-types neuronaux rétinien-s : généralités et classification.....	57
3.2.	Les facteurs connus dans leur spécification.....	61
3.3.	Remise en cause du modèle « Stepwise ».....	67
3.4.	Rôle du gène proneural <i>Ascl1</i> dans la spécification des neurones GABAergiques	69
3.4.1.	<i>Ascl1</i> , un territoire d'expression complémentaire avec les gènes <i>Neurogenin</i>	69
3.4.2.	Rôle d' <i>Ascl1</i> et <i>Neurog2</i> dans la spécification des sous-types GABAergiques et glutamatergiques	72
3.4.2.1.	Les interactions entre <i>Ascl1</i> et <i>Neurog2</i>	73
3.4.2.2.	L'influence du contexte	74
3.4.3.	<i>Ascl1</i> est aussi impliqué dans la spécification d'autres sous-types cellulaires	75
3.4.4.	Rôle dans la rétino-genèse.....	75
3.4.4.2.	Rôle dans le choix du destin neuronal	75
3.4.4.1.	Etudes de lignages	76
4.	La neurogenèse adulte	78
4.1.	La zone marginale ciliaire des vertébrés.....	78
4.2.	Découverte des cellules souches neurales chez les mammifères.....	79
4.3.	Remise en question de l'existence des cellules souches neurales de la rétine....	81
4.4.	D'autres sources potentielles de cellules souches neurales	81
4.5.	Les mécanismes moléculaires impliqués dans la maintenance et la prolifération des cellules souches rétinien-nnes.....	82
4.5.1.	Les facteurs extrinsèques	82
4.5.1.1.	Les facteurs de croissance	82
4.5.1.2.	La voie Hedgehog.....	83

4.5.1.3. La voie Wnt	84
4.5.1.4. La voie Notch/Delta.....	86
4.5.2. Les facteurs intrinsèques.....	87

<i>Objectifs de la thèse.....</i>	88
-----------------------------------	-----------

II. Résultats

1. Contrôle de la détermination cellulaire : Rôle du facteur de transcription Ascl1 dans la spécification des neurones GABAergiques de la rétine du xénope.....	92
2. Contrôle de la balance prolifération/différenciation cellulaire : Rôle des voies de signalisation Wnt et Hedgehog dans les précurseurs rétiniens.....	96
3. Recherche de nouveaux acteurs de la prolifération et de la détermination cellulaire de la rétine.....	105
3.1. Identification de nouveaux marqueurs rétiniens	105
3.2. Analyses fonctionnelles de nouveaux marqueurs des cellules progénitrices rétiniennes.....	108
3.2.1. Les marqueurs des cellules progénitrices issus du crible à grande échelle.....	108
3.2.2. Une approche gène candidat : le facteur Dlx2	111
3.2.3. Etude des gains de fonction des candidats sélectionnés	112

III. Discussion et perspectives

1. Rôle du gène Ascl1 dans le contrôle de la détermination cellulaire dans la rétine	116
2. Rôle des voies Wnt et Hedgehog dans le contrôle de la balance prolifération/différenciation cellulaire dans la rétine.....	124
3. Recherche de nouveaux marqueurs rétiniens.....	128

IV. Conclusion générale

<i>Bibliographie.....</i>	135
<i>Annexes.....</i>	159

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNnc	ARN non codant
bHLH	basic Helix Loop Helix
BMP	Bone Morphogene Protein
BrdU	Bromodeoxyuridine
CCG	Couche des Cellules Ganglionnaires
CDKi	inhibiteurs de Kinases Dépendantes des Cyclines
CldU	5-Chloro-2'-deoxyuridine
CNE	Couche Nucléaire Externe
CNI	Couche Nucléaire Interne
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CSR	Cellules Souches Rétiniennes
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
EFTFs	Eye Field Transcription Factors
EGF	Epidermal Growth Factor
EPR	Epithélium Pigmenté Rétinien
ES	Embryonic Stem Cells
EST	Expressed Sequence Tag
FGF	Fibroblast Growth Factor
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GFP	Green Fluorescent Protein
Hh	Hedgehog
IddU	Iododeoxyuridine
IGF	Insulin like Growth Factor
miARN	micro ARN
PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide
P-H3	Phospho-Histone H3
RBP	Ribonucleoprotein
SE	Ectoderme de Surface
TGF	Transforming Growth Factor
UTR	Untranslated Region
ZMC	Zone Marginale Ciliaire

Liste des figures

Figure N°	Titre	Page
1	Structure de l'œil	11
2	Structure de la neuro-rétine	13
3	Représentation schématique des photorécepteurs à bâtonnets (à gauche) et cônes (à droite).	14
4	Séparation du territoire oculaire chez le xénope	17
5	Développement précoce de la cupule optique et du cristallin	17
6	Le développement de l'œil	18
7	Spécification du territoire oculaire par les EFTFs	20
8	Réseau génétique contrôlant la spécification du territoire oculaire	21
9	Les étapes d'induction des trois territoires de la vésicule optique	24
10	La formation d'une cupule optique dans des cultures 3D de cellules embryonnaires de souris	26
11	Ordre de naissance des types cellulaires rétiniens au cours du développement	27
12	Les signaux extrinsèques déterminent le destin neuronal dans la rétine	29
13	Le Modèle de compétence	32
14	Structure et fonction du domaine bHLH	34
15	Exemple de l'effet combinatoire des gènes <i>Ascl1</i> , <i>NeuroD4</i> et <i>Chx10</i>	37
16	Le mode combinatoire	38
17	Contrôle temporel du destin neuronal chez la drosophile	39
18	L'identité temporelle par IKAROS	40
19	Les progéniteurs rétiniens requièrent <i>Pax6</i> pour acquérir leur multipotentialité	41
20	Schéma de la cascade transcriptionnelle en aval de <i>Foxn4</i>	42
21	Représentation schématique de la voie de signalisation Notch-Delta	43
22	Représentation schématique du mécanisme d'inhibition latérale par la signalisation Notch	43
23	La migration nucléaire intercinétique et l'Influence de Notch sur la neurogenèse	45
24	Exemple d'action des miARNs sur le destin neural chez le xénope	46
25	Modèle de développement de lignages distincts	49
26	Reconstruction d'un lignage de progéniteurs rétiniens de rat	50
27	Interactions entre les régulateurs du cycle cellulaire et les déterminants du destin neural	53
28	Schéma représentant une division symétrique et asymétrique	53
29	Des interactions entre différentes fonctions cellulaires impliquées dans la rétino-genèse	56
30	Les neurotransmetteurs les plus abondants de la rétine : le GABA (en bleu) et le glutamate (en rouge)	58
31	Les sous-types cellulaires rétiniens	59
32	Exemple de sous-types de cellules amacrines chez la souris	61
33	Spécification des sous-types de cônes M et S	62

34	Les facteurs de la famille LIM impliqués dans la genèse des sous-types de cellules horizontales	63
35	Contrôle transcriptionnel de la spécification des sous-types de cellules amacrines	64
36	Proposition d'un modèle de lignages conduisant à la détermination des sous-types neuronaux dans la rétine	66
37	Les nièces de cellules ganglionnaires expriment <i>Barhl2</i>	67
38	Le modèle « Stepwise »	68
39	Des territoires d'expression complémentaires des gènes <i>Ascl1</i> et <i>Neurogenin</i> dans le tube neural dorsal	70
40	Co-localisation des gènes <i>Ascl1</i> et <i>Neurog2</i> dans la zone ventriculaire du tube neural dorsal	71
41	Expression des gènes <i>Ascl1</i> et <i>Neurog2</i> dans les progéniteurs rétiniens de souris	72
42	Cascade de régulation impliquée dans la genèse des neurones GABAergiques et glutamatergiques	74
43	Un modèle de lignage des progéniteurs <i>Ngn2</i> ⁺ et <i>Ascl1</i> ⁺	77
44	Structure de la Zone Marginale Ciliaire (ZMC) du xénope	79
45	Localisation des cellules souches neurales dans l'œil adulte de mammifère	80
46	La voie de signalisation Hedgehog	84
47	La voie de signalisation canonique Wnt	85
48	Effet synergique de la combinaison <i>Ascl1/Neurog2</i>	93
49	Indice mitotiques après perturbations des voies Wnt et Hedgehog dans la ZMC	99
50	L'activation de la voie Wnt augmente la durée du cycle cellulaire dans la ZMC	100
51	Les voies de signalisation Hedgehog et Wnt agissent de façon opposée sur la durée du cycle cellulaire dans la ZMC	101
52	Durées du cycle cellulaire des précurseurs de la ZMC après perturbations des voies Wnt et Hedgehog	103
53	Identification de 6 nouveaux marqueurs des cellules progénitrices de la ZMC	109
54	Le territoire d'expression du gène <i>Dlx2</i> est restreint à une petite population de cellules progénitrices de la ZMC	112
55	Principe de la technique de lipofection <i>in vivo</i>	113
56	Un effet proneural classique de la surexpression de <i>Dlx2</i>	114
57	Représentation schématique du principe du BiFC « Bimolecular fluorescence complementation »	118
58	Rôle d' <i>Ascl1</i> au cours de la rétinogenèse	120
59	<i>In Vivo</i> Mosaic Labeling of Single RPCs	122
60	Le territoire d'expression de <i>Sfrp-2</i> est restreint à la ZMC	127
61	De nouvelles cibles des voies Wnt et Hedgehog	130
62	Les phases du cycle cellulaire	161
63	Principe de la méthode de double marquage pour l'étude de la cinétique du cycle cellulaire	164
64	Courbe de détermination des durées du cycle cellulaire	166

Avant propos

Les grandes fonctions neuronales telles que le comportement, l'apprentissage, la mémoire ou les émotions sont largement dictées par la vision (Rodieck, 1998). La rétine a d'ailleurs été surnommée par certains neurobiologistes « *la fenêtre du cerveau* » (« *window to the brain* », Dowling 1987). En outre, contrairement au cerveau, elle présente une facilité d'accès et donc permet aisément des diagnostics chez l'homme ou des expérimentations chez l'animal. Par conséquent, John E Dowling a qualifié la rétine selon l'expression suivante, titre de son livre : *The Retina, an approachable part of the brain* (Dowling, 1987). Il n'est donc pas surprenant que près de 30% des 12 000 gènes répertoriés dans la base de données OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) soient associés aux mots « *eye* », « *vision* » ou « *visual dysfunction* » (Swaroop et al. 2011). Les neurobiologistes s'intéressent donc depuis des décennies au développement et au fonctionnement de ce tissu neural.

Dès le début du 20^{ème} siècle, Hans Spemann mis en évidence des interactions cellulaires au cours du développement de la rétine, découverte qui mena aux concepts d'induction et de centre organisateur (Spemann, 1938). La compréhension des bases physiologiques de la fonction visuelle a donné lieu à des études pionnières, il y a plus de 30 ans, qui ont valu le prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 1981 aux neurobiologistes Roger Sperry, David Hubel et Torsten Wiesel. En revanche, il a fallu attendre la fin du 20^{ème} siècle pour commencer à mettre en lumière les mécanismes moléculaires à l'œuvre au cours du développement de la rétine et entrevoir des réponses aux questions suivantes : quelles sont les gènes et voies de signalisation qui permettent (i) d'induire le champ optique en fin de gastrulation (ii) de générer ensuite la vésicule optique, la cupule optique puis la rétine neurale (iii) de spécifier au sein de cette rétine les différents types et sous-types cellulaires rétinien (iv) d'orchestrer les étapes de différenciation et migration cellulaire et enfin (v) d'établir les connections synaptiques nécessaires à la transmission du signal visuel ? Ce sont les avancées majeures de la biologie moléculaire et de l'imagerie de ces deux dernières décennies qui nous permettent aujourd'hui d'avoir des éléments de réponse à ces questions.

Bien que le neuro-anatomiste Ramon y Cajal avait décrit depuis le 19^{ème} siècle la multitude de types cellulaires rétinien (Cajal, 1892), pour des raisons de simplicité, la plupart

des études sur la spécification des progéniteurs rétinien se limitent aux six classes majeures de neurones. Ces dernières années cependant, les processus moléculaires qui sous-tendent la complexité et l'extraordinaire diversité cellulaire au sein de la rétine intéressent de plus en plus les « rétiniobiologistes » et constitue la problématique majeure de mes travaux de thèse.

A l'origine de cette diversité cellulaire se trouvent les cellules souches multipotentes. Jusque dans les années 1990, le monde de la neuroscience considérait que la formation des neurones était stoppée précocement dans la vie d'un individu. A l'époque le célèbre neurobiologiste, Ramon y Cajal écrivait « We are born with a certain number of brain cells which decrease with age. Everything must die in the brain or spinal cord – nothing can regenerate » (Cajal, 1902). Sa théorie inébranlable affirmait que le système nerveux adulte ne connaissait pas de renouvellement cellulaire. Là aussi, la révolution de la biologie moléculaire a permis à la biologie des cellules souches neurales de voir le jour depuis un peu plus d'une quinzaine d'années. En ce qui concerne la rétine, une succession de découvertes majeures, de remises en cause et de controverses se sont succédées depuis l'an 2000, alternant espoirs et déceptions, dans un contexte où le potentiel thérapeutique de ces cellules est considérable. Au cours de ma thèse, je me suis intéressé aux mécanismes moléculaires qui gouvernent l'état « souche » (« *stemness* ») de ces cellules souches rétinien.

I. Introduction

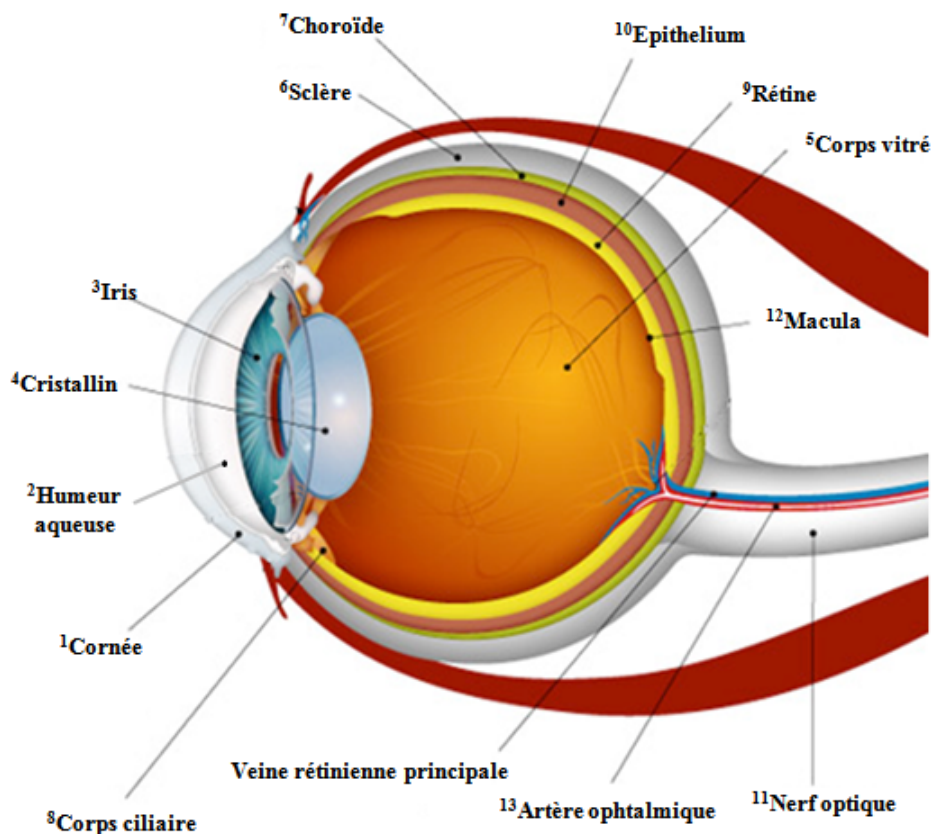
1. L'œil des vertébrés

Avant de présenter les processus de spécification des cellules rétiniennes, il est essentiel de bien comprendre l'anatomie et les différentes étapes du développement de la rétine. Je vais donc dans ce chapitre fournir les bases et les récentes données sur les mécanismes d'induction et de spécification ayant lieu au cours du développement précoce de la rétine.

1.1. Anatomie et fonction de l'œil

La vision recouvre l'ensemble des mécanismes physiologiques par lesquels la lumière émise ou réfléchiée par l'environnement détermine les détails des représentations sensorielles, comme les formes, les couleurs, les textures, le mouvement, la distance ou le relief.

L'œil est l'organe de la vision. C'est une structure de forme sphérique qui possède plusieurs parties distinctes d'un point de vue fonctionnel (**Figure 1**). La rétine constitue le tissu dédié à la capture de l'information lumineuse et à sa transmission, sous forme de signaux électriques, vers le cerveau.



¹La **cornée** est un tissu transparent formant la surface la plus externe de l'œil qui permet de former une barrière contre l'environnement extérieur. Elle est riche en fibres nerveuses nociceptives : le contact avec un objet induit le clignement de l'œil et la sécrétion lacrymale protégeant ainsi celui-ci des débris et des attaques bactériennes. La cornée constitue la première lentille traversée par la lumière et joue un rôle clef dans la focalisation de la lumière sur le cristallin ainsi que le filtrage des rayons UVs.

²L'**humeur aqueuse** située entre la cornée et le cristallin est sécrétée par le corps ciliaire et permet à la fois de conserver une parfaite transparence de ces deux lentilles mais également d'assurer la nutrition des structures vasculaires qui l'entourent. Elle est filtrée et renouvelée en permanence.

³L'**iris** est une structure maculaire pigmentée qui donne sa couleur à l'œil. L'iris, perforé en son centre (pupille) joue le rôle de diaphragme. Sa contraction permet d'adapter continuellement la quantité de lumière pénétrant dans l'œil en fonction des conditions de luminosité.

⁴Le **cristallin** est un tissu épithélial, qui correspond à la deuxième lentille traversée par la lumière, et est responsable de la projection fine de l'image sur la rétine. Celui-ci se déforme sous l'action du muscle ciliaire et permet la mise au point sur un objet en fonction de son éloignement.

⁵L'**humeur vitrée**, aussi appelée corps vitré, occupe 80% du volume de l'œil chez l'homme et remplit la chambre postérieure entre le cristallin et la rétine. Elle est constituée en grande partie de fibres de collagène et d'eau formant ainsi un gel transparent. Ses fonctions sont principalement de maintenir une pression pour conserver la rétine en place et protéger les structures de l'œil en absorbant les chocs et en réduisant les déformations mécaniques.

⁶La **sclère** ou sclérotique est la tunique la plus externe. Elle est formée d'un tissu conjonctif dense et peu vascularisé, et remplit ainsi un rôle de protection de l'œil. Du côté antérieur, cette sclérotique est remplacée par la cornée.

⁷La **choroïde**, ⁸le **corps ciliaire** et ³l'**iris** forment la tunique vasculaire. La choroïde est une membrane fortement vascularisée et riche en mélanocytes lui conférant une coloration brune et limitant les éventuelles réflexions indésirables de la sclère qui pourraient perturber la formation de l'image et diminuer l'acuité visuelle.

¹²La **macula**, ou tache jaune est une zone de la rétine caractérisée par une forte concentration en cônes : c'est à cet endroit que l'acuité visuelle est maximale.

⁹La **rétine** constitue la tunique la plus interne. Elle est composée d'une couche pigmentaire, ¹⁰l'**épithélium** qui empêche la lumière de diffuser dans l'œil. La neurorétine est renfermée de nombreux photorécepteurs (cônes et bâtonnets) et de cellules traitant et acheminant l'information visuelle vers le cerveau par ¹¹le **nerf optique**. Cette structure fait partie intégrante du système nerveux central (SNC).

La vascularisation est réalisée par ¹³l'**artère ophtalmique** qui passe par le nerf optique et donne l'artère centrale de la rétine qui se divise en deux branches pour se terminer par un réseau d'artéioles. Les artéioles se poursuivent en un réseau de capillaires très fins au niveau des cellules bipolaires. Ces capillaires sont retrouvés partout sauf entre la papille et ¹²la **macula**. La région maculaire est quant à elle irriguée par les vaisseaux choroïdiens situés en arrière de la rétine.

Figure 1 : Structure de l'œil (Schéma tiré de <http://smartvision.blog.com/eye/>).

1.2. Structure de l'épithélium pigmenté et de la neuro-rétine

L'organisation de la rétine est fortement conservée chez les vertébrés. Elle constitue une fine couche translucide en contact par sa face arrière avec un tissu appelé l'épithélium pigmenté rétinien (EPR), lui-même en contact avec la choroïde.

L'EPR forme une monocouche de cellules pigmentées qui synthétisent la mélanine. La membrane basale de ces cellules est au contact des segments externes des photorécepteurs alors que le côté apical fait face à la choroïde. Les fonctions de cet épithélium sont multiples comme la phagocytose des segments externes des photorécepteurs, le renouvellement de la rhodopsine par le cycle visuel ou le transport trans-épithélial grâce à un ensemble de canaux ioniques, transporteurs ou co-transporteurs (Strauss, 2005). Il joue également un rôle dans l'absorption des photons n'ayant pas été captés par les photorécepteurs, la sécrétion de facteurs de croissance ou d'immunosuppresseurs. Une perte de l'une de ces fonctions conduit généralement à des atteintes sévères des fonctions visuelles et en particulier à une dégénérescence de la rétine.

La rétine constitue un excellent modèle d'étude du système nerveux central en biologie du développement du fait de son accessibilité, de son organisation très structurée et de sa composition en un nombre limité de types cellulaires. C'est en effet une structure laminaire composée de trois couches nucléaires renfermant les six types principaux de neurones : les photorécepteurs à cônes et à bâtonnets, les cellules horizontales, les cellules bipolaires, les cellules amacrines et ganglionnaires (**Figure 2**). Il existe aussi différents types de cellules gliales dont les seules ayant une origine commune avec les neurones rétiniens sont les cellules de Müller (Turner and Cepko, 1987). Ces cellules ont une structure et une fonction considérées comme proches de celles de la glie radiaire.

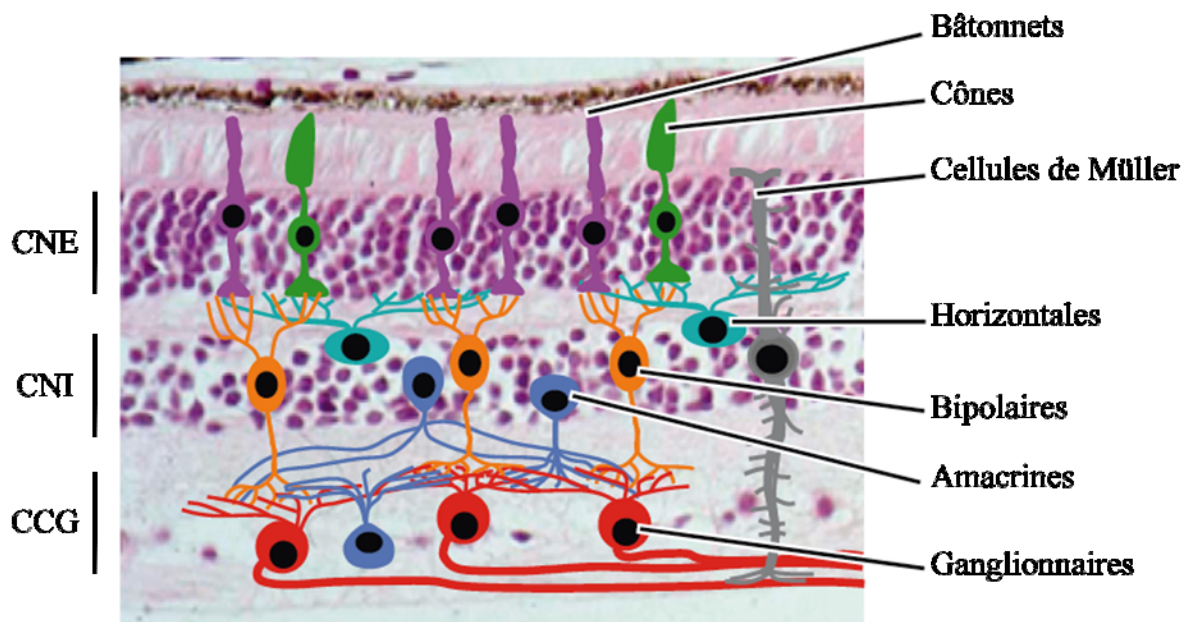


Figure 2 : Structure de la neuro-rétine. Région centrale d'une coupe de rétine. Schéma des différents types cellulaires. CNE, couche nucléaire externe ; CNI, couche nucléaire interne ; CCG, couche des cellules ganglionnaires (d'après Bassett and Wallace, 2012).

La couche nucléaire externe (CNE) : Elle est composée par les corps cellulaires des photorécepteurs. Les photorécepteurs sont des neurones sensoriels hautement spécialisés capables de convertir l'énergie lumineuse en signal électrique grâce à la présence de pigments permettant le déclenchement de la photo-transduction. La rétine est composée de deux types de photorécepteurs : les cônes, responsables de la vision photopique (vision des couleurs), et les bâtonnets, responsables de la vision scotopique (vision en condition de faible luminosité). Les photorécepteurs sont composés de quatre parties : un segment externe, un segment interne, un corps cellulaire et une terminaison synaptique (**Figure 3**).

Le segment externe est formé d'un empilement de disques enchâssés dans la membrane de la cellule. Ce sont ces disques qui contiennent les photopigments sensibles à la lumière (les opsines). Le segment externe permet de distinguer les deux types de photorécepteurs : les bâtonnets présentent un long segment externe cylindrique avec beaucoup de disques alors que les cônes ont un segment externe plus court et effilé avec peu de disques. Les pigments visuels présents dans les segments externes des cônes sont de plusieurs types et possèdent différents types d'opsines. L'Homme et les grands singes sont dit trichromates et possèdent trois types de cônes différents classés selon leur sensibilité à la lumière : L (long), M (medium), S (short). Les types L ont un maximum d'absorption dans le jaune (564 nm), ceux

de types M dans le vert (533 nm) et ceux de types S dans le bleu (437 nm). Les autres mammifères sont eux dichromates. Chez les rongeurs par exemple, la rétine n'est composée que de cônes de type S (opsine bleue) et M (opsine rouge et verte). Le segment interne contient quand à lui de nombreux organites cellulaires et possède une intense activité métabolique. Le corps cellulaire comprend essentiellement le noyau. La terminaison synaptique, ou pied cellulaire, forme la synapse entre l'axone du photorécepteur et les cellules bipolaires et horizontales.

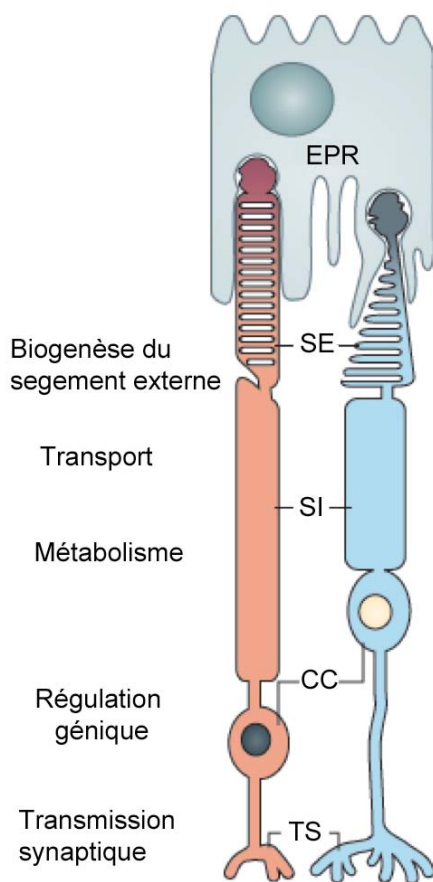


Figure 3 : Représentation schématique des photorécepteurs à bâtonnets (à gauche) et cônes (à droite). Les photorécepteurs sont constitués de quatre différentes régions : le segment externe (SE) associé à l'épithélium pigmenté rétinien (EPR) ; le segment interne (SI) contenant toute la machinerie du métabolisme ; le corps cellulaire (CC) incluant les noyaux et la terminaison synaptique (TS) (d'après Swaroop, 2010).

La couche nucléaire interne (CNI) : Cette couche contient les corps cellulaires des interneurons (cellules horizontales, bipolaires et amacrines) et des cellules gliales de Müller :

- Les cellules horizontales sont connectées latéralement à plusieurs cônes, bâtonnets et neurones bipolaires. Leur rôle est d'inhiber l'activité des cellules avoisinantes. Cette suppression sélective de certains signaux nerveux s'appelle l'inhibition latérale et son rôle

général est d'augmenter l'acuité d'un signal sensoriel. Par exemple, lorsqu'un signal lumineux atteint la rétine, certains photorécepteurs sont fortement illuminés et d'autres beaucoup moins. En supprimant le signal de ces photorécepteurs moins illuminés, les cellules horizontales assurent que seul le signal des photorécepteurs bien illuminés est transmis aux cellules ganglionnaires, améliorant ainsi le contraste et la définition du stimulus visuel.

- Les cellules bipolaires sont responsables de la transmission du signal nerveux des photorécepteurs vers les cellules ganglionnaires.
- Les cellules amacrines sont reliées aux cellules bipolaires, aux autres cellules amacrines et aux cellules ganglionnaires. Bien que la grande majorité des cellules amacrines soient situées dans la partie proximale de la CNI, certaines de ces cellules dites « déplacées » sont retrouvées dans la CCG. Dans des conditions de luminosité élevée, les cellules amacrines connectées aux bâtonnets réagissent à la lumière et transmettent un message excitateur aux cellules ganglionnaires de type ON tandis qu'un message inhibiteur est envoyé aux cellules ganglionnaires de type OFF. Lorsque la lumière décroît, les cellules amacrines ne sont plus excitées, les cellules ganglionnaires OFF ne sont donc plus inhibées et leurs antagonistes ne sont plus excités. Dans ce cas précis, elles jouent un rôle régulateur de l'action des cellules ganglionnaires en fonction de la luminosité. Hormis cet exemple, le rôle physiologique des cellules amacrines est encore mal connu.
- Les cellules de Müller sont les principales cellules gliales de la rétine. Elles n'ont pas de rôle dans la transmission du signal visuel mais du fait de leur disposition radiale de part et d'autre de la rétine neurale, elles jouent un rôle primordial dans l'homéostasie rétinienne. Elles assurent à la fois la cohérence et le métabolisme des structures (nutrition des cellules et évacuation des déchets). En effet, ces cellules entretiennent des relations symbiotiques avec les neurones en fournissant des substrats énergétiques, en éliminant le dioxyde de carbone, en rééquilibrant les concentrations en K^+ et en participant, avec l'épithélium pigmenté, à la phagocytose des neurones dégradés. Leurs caractéristiques de cellules souches dormantes et leur potentiel neurogénique seront discutés dans le chapitre 4.

La couche des cellules ganglionnaires (CCG) : Cette couche est constituée des corps cellulaires des cellules ganglionnaires qui reçoivent l'influx nerveux provenant des cellules

bipolaires après modulation par les cellules amacrines. Elles transmettent l'information au cerveau à travers leurs axones qui se rejoignent pour former le nerf optique. Elle utilise le glutamate comme neurotransmetteur mais contrairement aux autres cellules de la rétine, elles sont capables de produire un potentiel d'action. Se trouvent également dans cette couche les corps cellulaires de quelques cellules amacrines appelées « displaced amacrine » (Perry, 1979).

L'ensemble des fibres de ces neurones est regroupé en deux couches acellulaires. **La couche plexiforme externe (CPE)** contient les synapses entre les axones des photorécepteurs et les cellules horizontales et bipolaires. **La couche plexiforme interne (CPI)** est quant à elle constituée par les fibres des cellules bipolaires, amacrines et ganglionnaires.

Derrière l'apparente simplicité de la composition de la neuro-rétine telle que je vous l'ai décrite, avec seulement six types de neurones, se cache une complexité supplémentaire provenant de l'existence de nombreux sous-types cellulaires. Ces sous-types très peu étudiés jusqu'à maintenant feront l'objet d'un chapitre particulier dans la suite de cette thèse (chapitre 3).

1.3. Développement embryonnaire de l'œil

L'œil des vertébrés dérive de formations issues de plusieurs feuillets embryonnaires : l'ectoderme et le mésoderme. Alors que le cristallin, la cornée et l'iris dérivent de l'ectoderme, la neuro-rétine et l'épithélium pigmenté dérivent du neuro-ectoderme.

Chez le xénope, les territoires présomptifs de l'œil se mettent en place très tôt durant le développement embryonnaire, entre de la gastrulation et le début de la neurulation. En effet, des expériences de lignage ont montré que 9 blastomères au stade 32 cellules, localisés au pôle animal, sont compétents pour générer les cellules à l'origine des tissus de la rétine mature (Huang and Moody, 1993). Les champs optiques forment alors un territoire unique dans la région la plus antérieure de la plaque neurale avant de se séparer en deux domaines distincts en fin de neurulation (**Figure 4**).



Figure 4 : Séparation du territoire oculaire chez le xénope. Illustration en vue dorsale de la plaque neurale antérieure d'embryons de xénope. Dans les premiers stades, il y a un seul territoire oculaire au niveau de la plaque neurale antérieure. Celui-ci est ensuite scindé en deux territoires optiques (adapté de Li et al., 1997).

C'est au moment de la fermeture du tube neural que l'évagination de ces deux expansions latérales, à partir du prosencéphale, forme les vésicules optiques. Celles-ci entrent alors en contact avec l'ectoderme de surface et induisent la formation des placodes cristalliniennes (cristallins présomptifs) (Henry et al. 1990; Furuta et al. 1998). Ces dernières apparaissent alors comme un épaissement de l'ectoderme au voisinage des vésicules optiques (**Figure 5**).

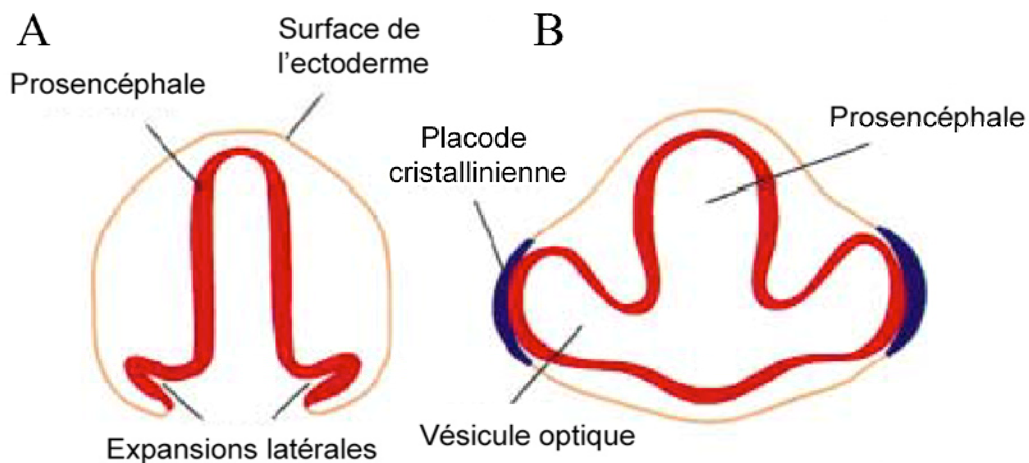


Figure 5 : Développement précoce de la cupule optique et du cristallin. (A) Les sillons optiques commencent à s'évaginer du diencéphale vers l'ectoderme de surface. (B) Les vésicules optiques sont en contacts avec l'ectoderme qui par la suite se différenciera en placodes cristalliniennes (d'après Oliver and Gruss, 1997).

Par la suite, les vésicules optiques s'invaginent et forment les cupules optiques. La cupule optique se compose alors de deux couches. La couche externe qui donnera l'EPR et la couche interne qui formera la neuro-rétine (**Figure 6**).

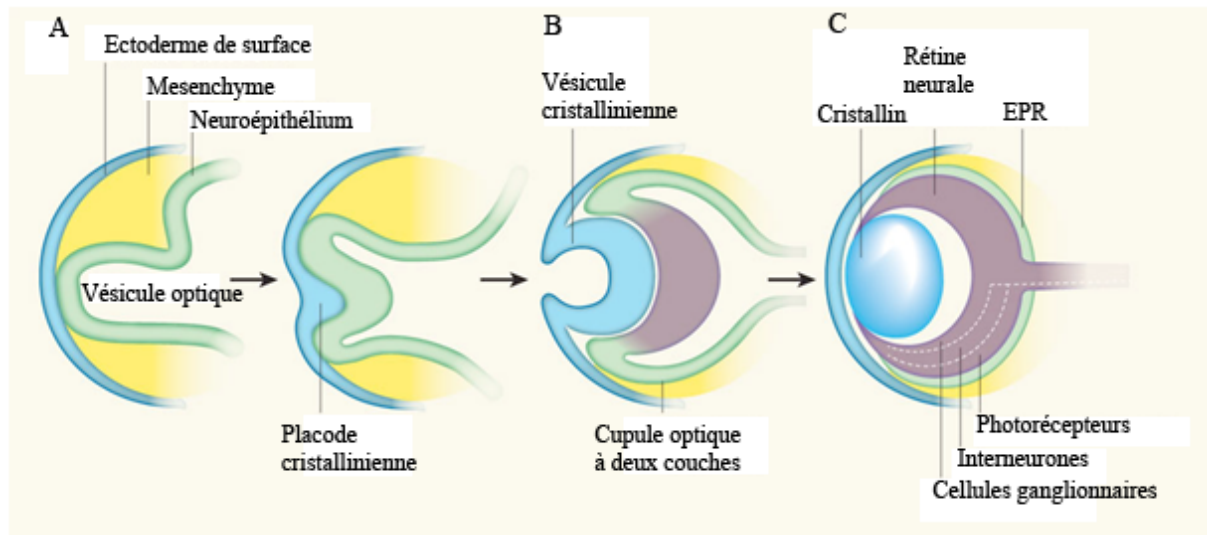


Figure 6 : Le développement de l'œil. (A) à des stades précoces, l'ectoderme de surface s'épaissit et s'invagine avec le neuroépithélium sous-jacent de la vésicule optique. (B) la couche interne de la cupule optique bistratifiée forme la rétine neurale alors que la couche externe donne l'EPR. (C) La rétine neurale mature se compose de ses trois couches : photorécepteurs, interneurons et cellules ganglionnaires (d'après Ali and Sowden, 2011).

1.3.1. L'induction, un phénomène clef dans la mise en place de l'œil

Tous ces mouvements cellulaires sont soumis à des phénomènes d'induction indispensables à la formation de l'œil. L'induction est l'action par laquelle une cellule ou un groupe de cellules émet un message vers une ou un groupe de cellules capables de le recevoir.

Historiquement, ces phénomènes ont été mis en évidence par Spemann en 1901 et Lewis en 1904 montrant que le champ morphogénétique de la vésicule optique est capable d'induire la formation du cristallin. En effet, par l'utilisation d'une aiguille, Spemann a détruit le territoire présomptif de la vésicule optique d'une grenouille sans endommager l'ectoderme de surface. Le résultat fut que le cristallin n'était plus capable de se développer. Il a ainsi tiré la conclusion que la vésicule optique était nécessaire à la formation du cristallin (Spemann, 1901). Ses observations ont été confirmées par Lewis quelques années plus tard. Dans ses

expériences, Lewis a prélevé la vésicule optique d'un embryon au stade neurula puis l'a transplantée sous l'ectoderme dans une région ne produisant normalement pas de cristallin. Dans la région du tissu rétinien greffé, il a observé la formation d'un cristallin et en a déduit que la vésicule optique est suffisante pour l'induction du cristallin (Lewis, 1904).

Parmi les nombreux travaux réalisés par la suite, ceux de Grainger dans les années 1990 ont beaucoup contribué à l'identification de la cascade d'inductions ayant lieu lors de la formation de l'œil. Les vésicules optiques en formation induisent l'ectoderme en placode cristalliniennne. Ces placodes induisent alors la formation des cupules optiques à partir des vésicules optiques. Ensuite, les vésicules cristalliniennes induisent à la fois la différenciation des cupules optiques en rétines et la formation de cornée à partir de l'ectoderme. Enfin, les rétines induisent la différenciation des vésicules cristalliniennes en cristallins (Grainger, 1990). Il existe donc une communication étroite entre la vésicule optique et les précurseurs du cristallin pour un développement coordonné de ces deux structures.

1.3.2. Induction du territoire oculaire

La formation du territoire optique nécessite que les cellules de la plaque neurale antérieure adoptent une identité rétinienne. Cette identité est acquise en réponse à une série d'évènements d'induction impliquant en particulier les voies de signalisation FGF (Fibroblast Growth Factor), Wnt et BMP (Bone Morphogenetic Protein) (revue dans Esteve and Bovolenta, 2006). Ces étapes de spécification conduisent aussi à une surexpression du gène *Otx2* (*Orthodenticle homeobox 2*) et d'un groupe de facteurs de transcription : Les « Eye Field Transcription Factors » (EFTFs, voir ci-dessous).

1.3.3. Les facteurs de transcription impliqués dans la spécification du territoire oculaire “Eye Field transcription factors”

Au cours des années 1990, les chercheurs se sont focalisés sur l'identification de facteurs de transcription exprimés dans le territoire oculaire afin de mieux comprendre les mécanismes

moléculaires impliqués dans la spécification de ce territoire. Ces différents gènes sont regroupés sous le terme « Eye Field Transcription Factors » (EFTFs) (Zuber, 2003 ; Zuber, 2010).

Au sein des EFTFs sont retrouvés les gènes, *Six3* (*Six homeobox 3*), *Rax* (aussi appelé *Rx*, *Retinal and anterior neural fold homeobox*), *Pax6* (*Paired box6*), *Lhx2* (*LIM homeobox*), *Tbx3* (*T-box3*, aussi nommé *ET*), *Six6* (*Six homeobox 6*) et *Nr2e1* (*Nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1*). L'expression coordonnée de ces facteurs est restreinte à une zone correspondant au territoire présomptif de la rétine (**Figure 7**).

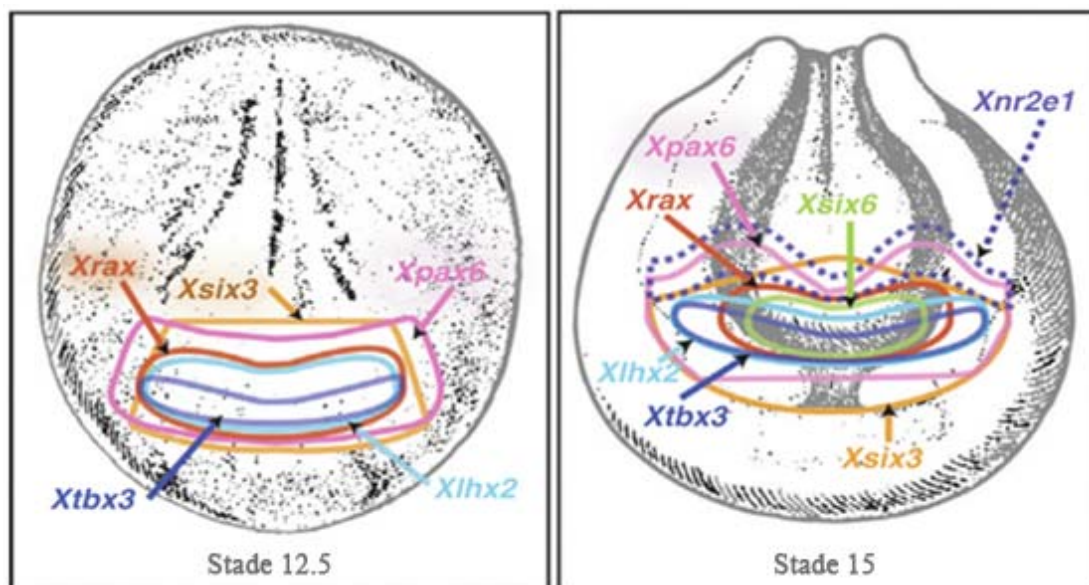


Figure 7 : Spécification du territoire oculaire par les EFTFs. Illustration de la dynamique et du patron d'expression chevauchant des EFTFs à un stade précoce (à gauche) et tardif (à droite) de la spécification du territoire oculaire (Zuber, 2010).

Grâce à ce progrès majeur, ce groupe de facteurs, hautement conservés au travers de l'évolution, a pu être mis en évidence comme nécessaire pour la formation de l'œil. En effet, l'inactivation fonctionnelle des EFTFs *Pax6*, *Rax*, *Lhx2*, *Six3* et du gène *Otx2* (*Orthodenticle homeobox 2*) provoque aussi bien chez les amphibiens, les poissons, les rongeurs que chez l'homme l'absence d'yeux ou la présence d'yeux anormaux (Hill et al., 1991 ; Mathers et al., 1997 ; Porter et al., 1997 ; Hollemann et al., 1998 ; Chow et al., 1999 ; Isaacs et al., 1999, Zuber et al., 1999 ; Wawersik and Maas, 2000 ; Yu et al., 2000 ; Loosli et al., 2001, 2003 ; Tucker et al., 2001 ; Carl et al., 2002 ; Li et al., 2002 ; Andreazzoli et al., 2003 ; Lagutin et al.,

2003 ; Voronima et al., 2004). De plus, la surexpression de *Pax6*, *Six3*, *Rx* et *Otx2* peut conduire à une augmentation de la taille de l'œil ou à la formation d'yeux ectopiques (Oliver et al., 1996 ; Mathers et al., 1997 ; Andreazzoli et al., 1999 ; Chow et al., 1999 ; Loosli et al., 1999 ; Zuber et al., 2003 ; Bernier et al., 2000 ; Chuang and Raymond, 2001). Une étude plus récente a mis en évidence que la surexpression des EFTFs dans des cellules souches embryonnaires pluripotentes puis transplantées sur le flanc d'embryons entraîne la formation d'yeux ectopiques (Vicizian et al., 2009). L'ensemble de ces données démontrent un rôle majeur de ces facteurs dans la formation précoce de l'œil mais quels sont les mécanismes par lesquels ils contrôlent la spécification des champs optiques ?

Les EFTFs sont tout d'abord capables d'agir en synergie et d'interactions fonctionnelles telles que la formation de dimères ou de multiples niveaux de régulation (**Figure 8**) (Zuber et al., 2003 ; Mikkola et al. ; 2001 ; Li et al., 2002 ; Stenman et al., 2003).

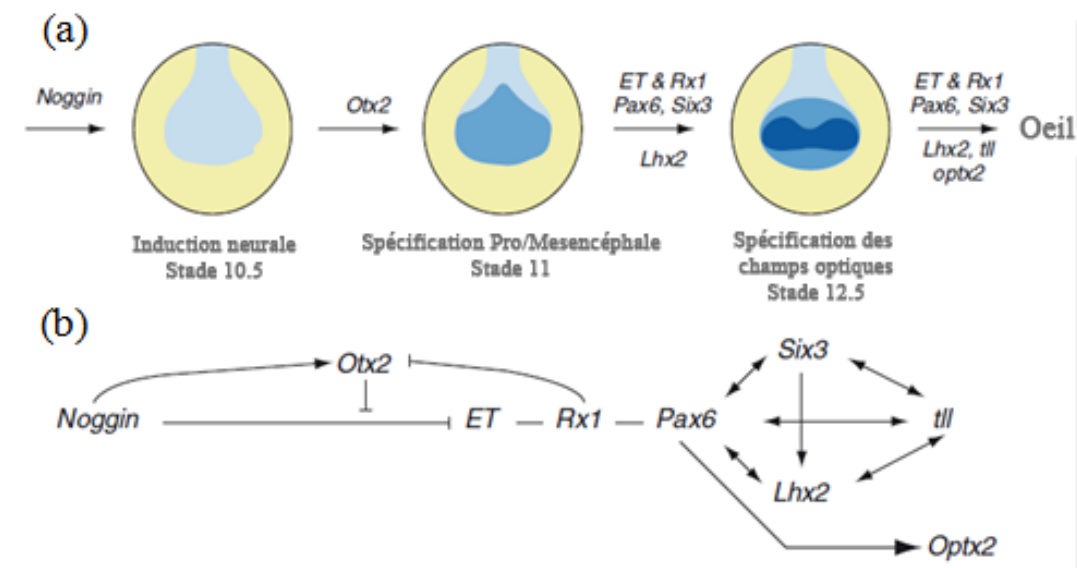


Figure 8 : Réseau génétique contrôlant la spécification du territoire oculaire. (a) Un modèle simplifié de l'induction du territoire oculaire dans la plaque neurale antérieure des vertébrés incluant les facteurs de transcriptions majeurs. (b) Les interactions génétiques ayant lieu lors de la spécification du territoire oculaire. Le bleu clair indique la plaque neurale, le bleu la zone d'expression d'*Otx2* et le bleu foncé représente le territoire optique. Les flèches et les barres en (b) indiquent une induction ou une répression de l'expression des gènes cibles. Par exemple, *noggin* réprime l'expression de *ET* alors que *ET* induit l'expression de *Rx1* (d'après Zuber et al., 2003).

Il a aussi été mis en évidence que différentes voies de signalisation peuvent réguler l'expression des ETFTs et *vice versa*. Par exemple, dans la plaque neurale d'un embryon de poisson zèbre, la voie non canonique Wnt induit l'expression de *Rx3* (Cavodeassi et al., 2005). A l'inverse, une étude a montré que la voie BMP peut être inhibée au niveau des champs optiques par un ETFT répresseur, *Six3* (Gestri et al., 2005). Cependant, les acteurs impliqués dans la coordination de l'expression et les interactions fonctionnelles des ETFTs restent encore à étudier.

1.3.4. Scission du territoire oculaire, mise en place des champs optiques

La séparation du territoire optique a lieu sous l'influence de signaux sécrétés par le mésoderme préchordal. En effet, des expériences pratiquées dans les années 1930 ont montré que sa suppression chez des embryons d'amphibiens entraîne une malformation caractérisée par un œil unique : la cyclopie (Adelman, 1930, 1934 ; Mangold, 1931).

Les signaux émanant de cette région tels que Shh (Sonic hedgehog) et Nodal, importants pour la formation de la ligne médiane, ont aussi été décrit comme requis pour la séparation du territoire oculaire. En effet, la perte de ces signaux entraîne un phénotype cyclopie (Hatta et al., 1991; Feldman et al., 1998 ; Nomura and Li, 1998 ; Song et al., 1999 ; Chiang et al., 1996 ; Kelley et al., 1996 ; Roesller et al., 1996). La nécessité de la signalisation Shh semble conservée chez les vertébrés car sa perte chez le poisson, la souris ou l'homme aboutit au même phénotype (Chiang et al., 1996 ; Roessler et al., 1996 ; Nasevicius and Ekker, 2000). Quelques années plus tard, une étude a permis d'établir un lien entre la signalisation Nodal et Shh. Les auteurs ont en effet démontré que la voie de signalisation Nodal peut directement jouer sur l'expression de Shh (Muller et al., 2000). D'autres études suggèrent que la signalisation EGF est aussi impliquée dans les mécanismes moléculaires de séparation du territoire optique (Pezeron et al., 2008; Zhang et al., 1998 ; Gritsman et al., 1999).

Lorsque la ligne médiane est mise en place, Shh est exprimé sous le contrôle de la signalisation Nodal. Shh va ensuite réprimer l'expression des ETFTs dans la ligne médiane, conduisant à deux régions définissant les champs optiques.

1.3.5. Régionalisation des vésicules optiques et formation des cupules optiques

Les cellules localisées dans les différentes régions des champs optiques vont ensuite générer trois compartiments de morphologie et de fonction distincts, qui donneront la rétine neurale, l'EPR et le nerf optique. Ces territoires expriment des gènes différents. Par exemple, au sein de la future rétine neurale, les facteurs *Pax6*, *Rx*, *Vsx2*, *Lhx2* ou *Chx10* y sont spécifiquement exprimés. *Otx2* et *Mitf* quant à eux sont des marqueurs du futur épithélium pigmenté rétinien tandis que les gènes *Pax2* et *Vax2* sont restreints à la région correspondant au futur nerf optique (Bharti et al., 2006; Chow and Lang, 2001). Des interactions entre ces facteurs de transcription contribuent à l'établissement des frontières entre ces territoires en développement. Par exemple, la formation de la frontière entre la rétine neurale et l'EPR est favorisée par des répressions transcriptionnelles réciproques entre *Chx10* et *Mitf* (Canto-Soler and Adler, 2006).

Ces gènes de régionalisation des vésicules optiques sont sous le contrôle de voies de signalisation (Agathocleous and Harris, 2009; Fuhrmann 2010). En effet, de multiples facteurs émanant des tissus environnants (le mésenchyme extra-oculaire, le nerf optique et l'ectoderme de surface) influencent la destinée des cellules selon leur position dans la vésicule optique. Par exemple, Shh provenant du prosencéphale ventral contrôle la spécification du nerf optique en activant l'expression de *Pax2* tout en inhibant celle de *Pax6* (Perron et al., 2003; Schwarz et al., 2000). Des facteurs de croissance de la famille des FGFs, sécrétés par l'ectoderme, spécifient la rétine neurale *via* l'inhibition de l'expression de *Mitf* et donc du destin EPR (Zhao et al., 2001 ; Kobayashi et al., 2010). Enfin, ce sont des facteurs de la famille du TGF β (transforming growth factor β), sécrétés par le mésenchyme périoculaire, qui induirait l'expression de gènes spécifiques de l'EPR et inhiberait celle des gènes marqueurs de la rétine neurale dans les cellules dorsales de la vésicule optique (**Figure 9**).

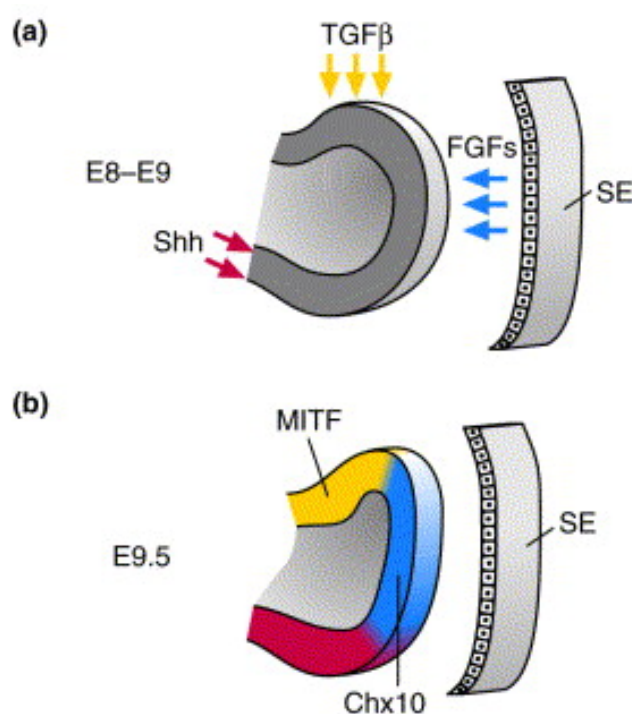


Figure 9 : Les étapes d'induction des trois territoires de la vésicule optique. (a) Régionalisation de la vésicule optique médiée par l'ectoderme de surface (SE) et le mésenchyme environnant d'où sont sécrétées les différents facteurs Shh, FGF et TGFβ. La mise en place des territoires présomptifs : la partie distale formera la rétine neurale, la partie proximale/dorsale donnera l'EPR et la partie ventrale le nerf optique. (b) Les facteurs extrinsèques permettent la régionalisation précoce de la vésicule optique. L'expression d'un grand nombre de facteurs de transcription est restreinte en réponse à ces signaux externes. Ici sont présentés les exemples de *Chx10* exprimé dans le territoire présomptif de la rétine neurale et de *Mitf* dont l'expression est restreinte à la région de l'EPR présomptif (Ashery-Padan and Gruss, 2001).

La spécification de la rétine neurale dépend donc des territoires environnant sécrétant des molécules qui régulent l'ensemble du réseau génétique impliqué dans la rétino-genèse. Une fois que la vésicule optique est formée, elle va à son tour s'invaginer pour former la cupule optique. Quels sont les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus ?

Un des principaux acteurs de la transformation de la vésicule optique en cupule optique est la signalisation de l'acide rétinoïque (Adler and Canto-Soler, 2007; Cvekl and Wang, 2009; revue dans Duester, 2009). En effet, en absence de cette signalisation la vésicule optique ne s'invagine pas en cupule optique (Mic et al., 2004). Un autre facteur clé dans la transition entre la vésicule et la cupule optique est *Lhx2* (*LIM homeobox protein 2*). En effet, chez des embryons *Lhx2*^{-/-}, la spécification du territoire oculaire et la morphogenèse de la vésicule optique ont bien lieu mais le développement est stoppé au moment de la formation de la cupule optique (Yun et al., 2009). De plus, cette équipe a mis en évidence que ce système passe par la régulation de la signalisation BMP.

L'ensemble de ces événements morphogénétiques dépend clairement d'interactions coordonnées entre la rétine, l'épiderme de surface et le mésenchyme extra-oculaire.

Cependant, la complexité des remaniements morphogénétiques et la multiplicité des signaux mis en jeu n'ont pas permis de déterminer sans ambiguïté l'implication de chaque tissu. En particulier, le rôle de l'épiderme de surface et du cristallin dans l'invagination de la vésicule optique reste l'objet de controverses (Okada, 2004).

Le débat a récemment été relancé avec la parution des travaux de l'équipe de Sasai. En effet, pour la première fois cette équipe japonaise a réussi à recréer, à partir de cellules souches embryonnaires murines ou humaines une rétine *in vitro*, dont l'organisation est la même que celle d'une rétine *in vivo*, en l'absence d'épiderme de surface. Cette équipe a eu l'ingénieuse idée de réaliser des cultures en trois dimensions sur du matrigel (Eiraku et al., 2011 ; Nakano et al., 2012). Le matrigel est une mixture gélatineuse protéique, dont la composition, la structure et les propriétés physiques constituent pour les cellules un substrat similaire aux matrices extracellulaires rencontrées dans leur milieu naturel. En associant des conditions de culture promouvant le destin neural à ce support matrigel, l'équipe japonaise a réussi à créer l'environnement adéquat pour que s'opèrent *in vitro* des mouvements morphogénétiques conduisant à la formation d'une rétine en trois dimensions (**Figures 10**).

Ces expériences inédites suggèrent que l'invagination de la cupule optique peut se faire intégralement en culture en l'absence totale d'épiderme de surface et du cristallin (Eiraku and Sasai, 2012 ; Eiraku et al., 2012 ; revue dans Perron, 2011).

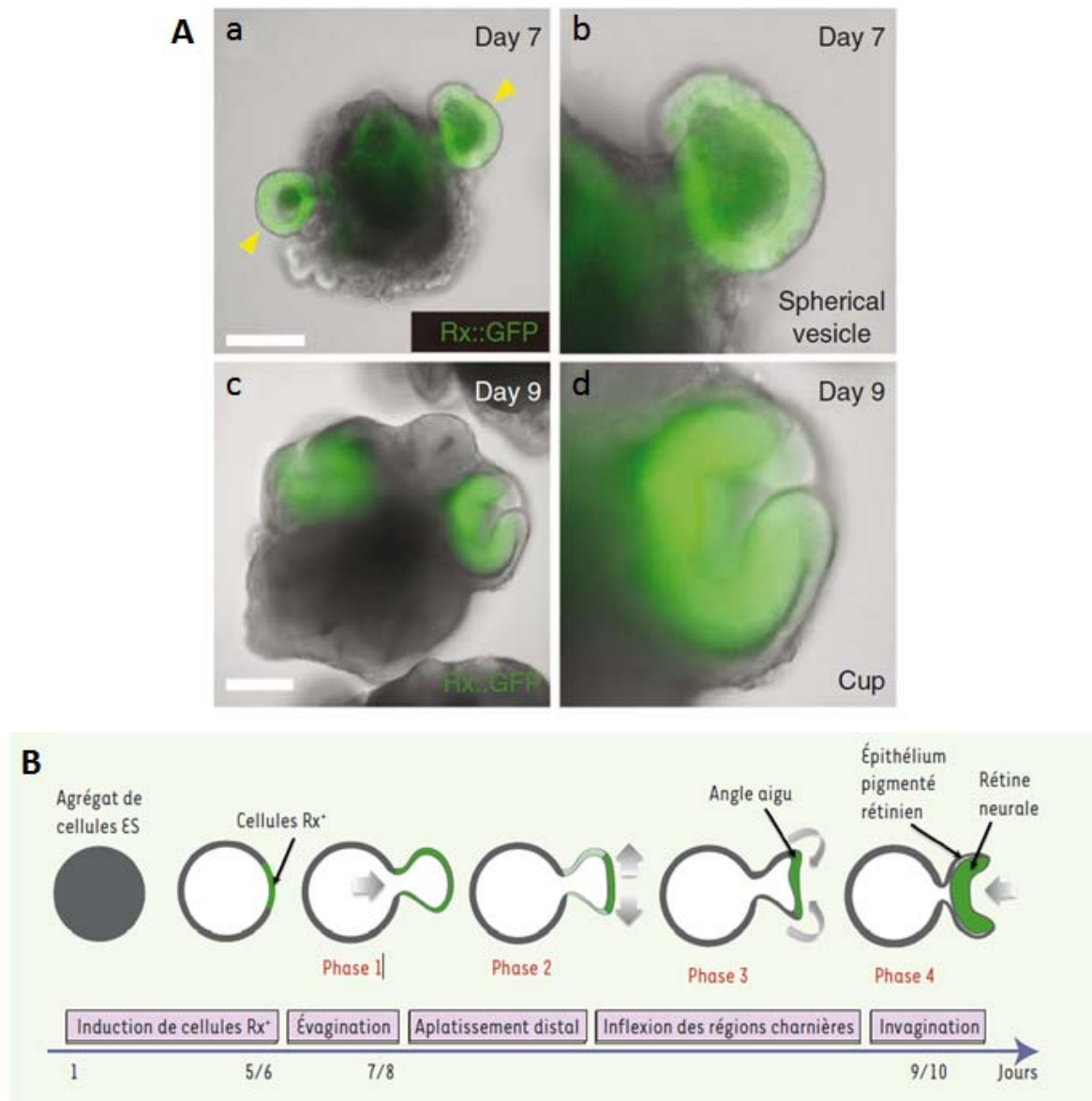


Figure 10 : A. La formation d'une cupule optique dans des cultures 3D de cellules embryonnaires de souris. (a-d) Formation spontanée de vésicules sphériques à partir d'ES exprimant le transgène *Rx :: GFP* (vert), marqueur de cellules rétiniennes, après 7 jours. (c-d) Formation de vésicules optiques par invagination après 9 jours. (b) agrandissement de A. (c) agrandissement de C (Eiraku et al., 2011). **B. Les différentes étapes de formation *in vitro* d'une rétine en 3D à partir de Cellules Souches Embryonnaires (CSE) de souris.** Cultivés en agrégats dans du matrigel, les CSE forment un épithélium. Certaines portions, exprimant le facteur rétinien Rx (en vert), vont s'évaginer. Des mouvements cellulaires d'aplatissement, d'inflexion et d'invagination vont ensuite se produire spontanément dans ces régions (flèches). Ainsi voit-on se développer progressivement une cupule optique. Quatre phases peuvent être distinguées dans ce processus : au cours de la **phase 1**, la vésicule optique a une forme hémisphérique ; en **phase 2**, l'expression de Rx diminue dans la partie proximale (vert clair) pour se restreindre uniquement à la partie distale qui s'aplatit ; la **phase 3** conduit à une réduction des angles de jonction entre les domaines de la rétine neurale et de l'épithélium pigmenté présomptif (à ce stade seule la rétine neurale exprime Rx, vert) ; lors de la **phase 4**, l'épithélium de la rétine neurale s'invagine pour former une cupule optique (d'après Perron, 2011).

2. La spécification des cellules rétiniennes

2.1. Histogenèse de la rétine et lignage des progéniteurs rétiniens

2.1.1. Ordre de naissance des types cellulaires conservé chez les vertébrés

Au cours de la rétino-genèse, les progéniteurs vont générer les six types de neurones et un type de cellules gliales dans un ordre hautement conservé chez les vertébrés (Holt et al., 1988; Young, 1985) (**Figure 11**). Les cellules ganglionnaires sont toujours les premières à naître suivies des cellules amacrines, horizontales et cônes puis les bâtonnets, bipolaires et enfin les cellules de Müller. L'histogenèse de la rétine peut prendre plusieurs semaines à quelques mois chez les mammifères. Alors que les premières cellules à bâtonnets commencent à être générées, la quasi totalité des cellules ganglionnaires sont post-mitotiques. Chez le xénope au contraire, l'histogenèse de la rétine est beaucoup plus courte. En 24h, la rétine centrale est complète nécessitant que toutes les cellules naissent presque simultanément (Jacobson, 1968 ; Holt et al., 1988).

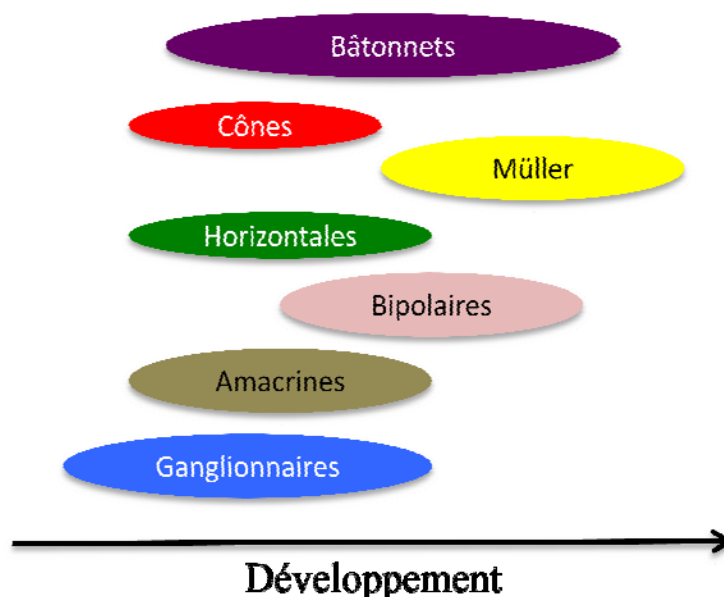


Figure 11 : Ordre de naissance des types cellulaires rétiniens au cours du développement. Les types cellulaires rétiniens naissent dans un ordre stéréotypé. Les cellules ganglionnaires sont les premières à naître et les cellules de Müller les dernières (d'après Klassen et al., 2004).

2.1.2. La multipotence des progéniteurs réiniens

L'ordre de naissance des types cellulaires montre que les progéniteurs réiniens sont déterminés de façon stéréotypés et pose un certain nombre de questions. Comment un progéniteur choisi-t-il un destin particulier ? Est ce que les neurones réiniens sont générés à partir d'un pool commun de progéniteurs ? Les progéniteurs sont-ils multipotents ?

Les nombreux travaux réalisés dans le passé permettent de répondre à une partie de ces questions. Je vais maintenant vous rapporter ces travaux qui commencent par des études de lignage des cellules réiniennes.

Les premières expériences de lignage utilisant des rétrovirus ou la peroxydase comme moyen de tracer les rétino blasts, montrent que la rétine neurale est générée à partir d'un pool commun de progéniteurs multipotents. En effet, ceux ci sont capables de donner tous les types de neurones incluant les cellules gliales de Müller (Holt et al., 1988; Turner and Cepko, 1987; Turner et al., 1990; Wetts and Fraser, 1988).

Cette multipotence semble être persistante tout au long du développement de la rétine comme le démontre une expérience de transfection virale tardive réalisée dans une rétine post-natale de rat. En effet, les progéniteurs post-mitotiques issus d'une même cellule sont capables de générer quatre paires différentes de neurones (deux bâtonnets, un bâtonnets et une cellule bipolaire ou une cellule amacrine et un bâtonnet plus une cellule de Müller) suggérant qu'ils ne sont toujours pas restreint à un destin particulier (Turner and Cepko, 1987).

D'après les précédentes expériences, le dogme de l'époque voulait que les progéniteurs réiniens forment une population homogène dont leur destinée est influencée par leur environnement (Turner et al., 1990). Un modèle possible fut proposé et suggère que des facteurs environnementaux (extrinsèques) guident localement et à eux seul la détermination des progéniteurs réiniens (**Figure 12**). Les chercheurs à l'époque ont donc testé l'impact de nombreux facteurs extrinsèques sur le destin neuronal dans la rétine.

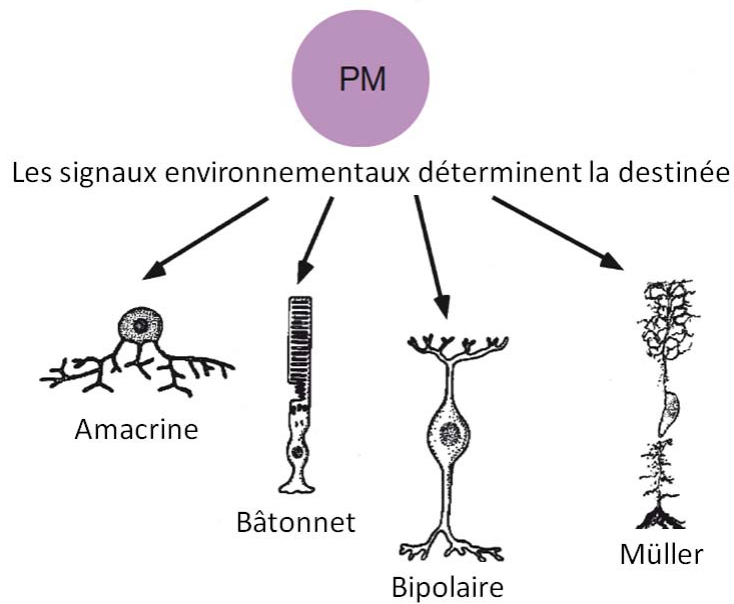


Figure 12 : Les signaux extrinsèques déterminent le destin neuronal dans la rétine. Un pool de progéniteurs homogènes et multipotents (PM) dont la détermination est influencé par l'environnement (adapté de Cepko, 1999).

2.2. Les facteurs extrinsèques impliqués dans la rétino-genèse

Les facteurs extrinsèques agissent de manière non autonome et correspondent à des molécules sécrétées de type neurotrophines, des facteurs de croissance ou des récepteurs solubles (Gurdon et al., 1998; Lawrence and Struhl, 1996). Pendant la rétino-genèse, il a été montré que plusieurs facteurs extrinsèques sont capables d'influencer les progéniteurs vers une destinée particulière.

2.2.1. Facteurs de croissance et voies de signalisation

Des études ont montré que le TGF α (Transforming Growth Factor α), l'EGF (Epidermal Growth Factor), le FGF, le NGF (Nerve Growth Factor), le LIF (Leukemia Inhibitory Factor) ou encore le CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) induisent ou inhibent certains types cellulaires dans la rétine (revue dans Cepko, 1999, Reh and Levine, 1998 ; Patel and McFarlane, 2000 ; Zhang et al., 2003).

Les facteurs extrinsèques sont capables de rediriger la destinée de progéniteurs post-mitotiques déjà engagés vers un type cellulaire particulier. Par exemple, des progéniteurs post-mitotiques déjà engagé vers un destin photorécepteurs peuvent être re-spécifiés vers un destin de cellules bipolaires par un traitement au CNTF (Bhattacharya et al., 2004; Ezzeddine et al., 1997; Schulz-Key et al., 2002). Cette donnée dénote une certaine plasticité des progéniteurs et montrent qu'ils sont compétents même après la sortie du cycle cellulaire à changer leur destinée.

Un rôle clair et conservé de ces facteurs chez différentes espèces de vertébrés n'est toutefois pas encore défini. Par exemple, le CNTF inhibe la différenciation des photorécepteurs à bâtonnets chez la souris (Ezzeddine et al., 1997; Neophytou et al., 1997; Schulz-Key et al., 2002), tandis que chez le poulet, il active l'expression de marqueurs des photorécepteurs à cônes (Fuhrmann et al., 1995; Xie and Adler, 2000).

2.2.2. Rôle des facteurs extrinsèques dans le rétrocontrôle des neurones sur les progéniteurs

La production du nombre approprié des types cellulaires de la rétine semble être contrôlée par un rétrocontrôle négatif provenant des neurones différenciés. Les cellules ganglionnaires par exemple sont capables d'inhiber leur propre production (Waid and McLoon, 1998 ; Gonzalez-Hoyuela et al., 2001). Un facteur qui pourrait jouer ce rôle inhibiteur est Sonic Hedgehog (Shh ; Waid and McLoon, 1998 ; Zhang and Yang, 2001 ; Wang et al., 2005). La molécule Shh sécrétée par les cellules ganglionnaires différenciées agirait comme un signal de rétrocontrôle négatif afin moduler la production de nouvelles cellules ganglionnaires à partir du pool de progéniteurs.

2.2.3. Le modèle de compétence

Il existe donc une multitude de facteurs extrinsèques impliqués dans la détermination des progéniteurs rétiniens. Cependant, l'existence de ces facteurs ne suffit pas pour expliquer la genèse des différents types cellulaires rétiniens au cours du développement. En effet, des expériences menées *in vitro* ont montré que les progéniteurs de stades embryonnaires précoces ne se différencient qu'en cellules « précoces », comme les cellules ganglionnaires, alors que les progéniteurs de stade tardifs ne se différencient qu'en cellules « tardives », comme les photorécepteurs à bâtonnets (Reh and Kljavin, 1989). Les progéniteurs précoces ne sont donc pas compétents pour générer des bâtonnets (Harris and Messersmith, 1992).

De nouvelles données ont définitivement permis d'invalider l'hypothèse que les facteurs extrinsèques jouent seuls sur la détermination des progéniteurs rétiniens. Dans ces expériences d'hétérochronie *in vitro*, les chercheurs ont placé des progéniteurs précoces dans un environnement tardif et *vice versa*. Ils ont ainsi pu mettre en évidence que des progéniteurs précoces conservent leur capacité à générer des types cellulaires précoces même dans un environnement tardif. Réciproquement, des progéniteurs tardifs cultivés dans un environnement précoces ne génèrent que des types cellulaires tardifs (Belliveau and Cepko, 1999; Belliveau et al., 2000).

L'ensemble de ces résultats ont amené à la proposition d'un nouveau modèle : le modèle de compétence (Cepko et al., 1996; Livesey and Cepko, 2001). Ce modèle suggère que la détermination des types cellulaires de la rétine est basée sur une capacité intrinsèque des progéniteurs à répondre à des signaux environnementaux et que ces états de compétences varient au cours du temps (**Figure 13**).

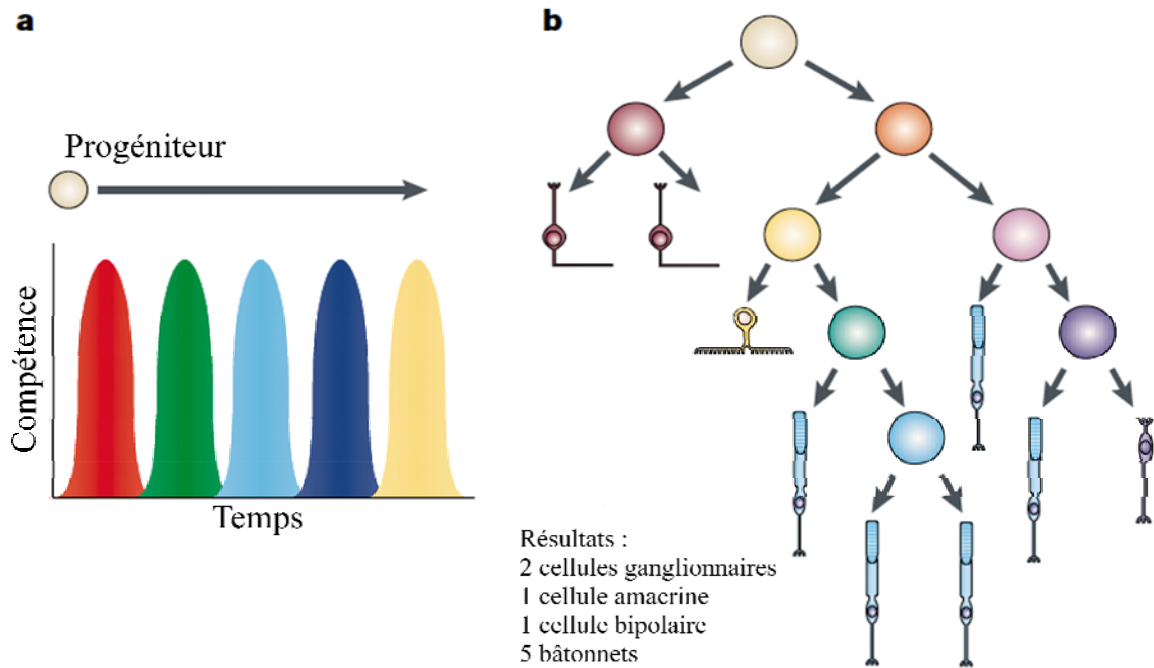


Figure 13 : Le Modèle de compétence. (a) un progéniteur passe par des vagues successives de compétence (indiqué par les différentes couleurs) au cours desquelles il n'est capable de générer qu'un sous ensemble de types cellulaires post-mitotiques. La clé de ce modèle est que les cellules sont différemment compétentes en fonction du développement. (b) Exemple d'un lignage construit en accord avec ce modèle. Les différentes couleurs montrent un état de compétence différent au cours du développement (d'après Livesey and Cepko, 2001).

A la suite de la proposition du modèle de compétence, de nombreuses études ont été consacrées à la recherche des facteurs intrinsèques responsables de ces différents états de compétence.

2.3. Régulation transcriptionnelle de la rétino-genèse : les facteurs intrinsèques

2.3.1. Les gènes proneuraux : historique

Les premiers gènes proneuraux ont été caractérisés en 1979 par des analyses génétiques de mutations réalisées chez la drosophile. Ainsi, une mutation dans le locus *achaete-scute* entraînait l'absence d'un type de neurones sensoriels, les organes sensoriels externes (Garcia-Bellido, 1979). Quatre gènes composent ce complexe et codent pour des facteurs de transcription à domaine bHLH (basic Helix-Loop-Helix) (Ghysen and Dambly-Chaudière,

1988). Par homologie de séquence, un autre gène proneural de drosophile a été identifié : *atonal* (Jarman et al., 1993). La perte de fonction de celui-ci entraîne l'absence d'autres types de neurones sensoriels dans le système nerveux périphérique mais aussi des photorécepteurs de la rétine (Jarman et al., 1995). Ces données ainsi que des expériences de gain de fonction ont amené à définir les facteurs proneuraux comme nécessaires et suffisants à la formation de neurones (Bertrand et al., 2002; Powell et al., 2008).

Les protéines proneurales présentent des caractéristiques communes à l'ensemble des protéines comportant un motif HLH (Murre et al., 1989). Le motif structural bHLH est classiquement rencontré dans la séquence protéique de molécules (facteurs de transcription) se liant à l'ADN sous forme dimérique. Cette structure se définit par deux hélices α amphipathiques (une face chargée et une face neutre) séparées par une boucle polypeptidique non structurée. L'assemblage en dimère s'effectue grâce à des interactions entre hélices amphipathiques de monomères distincts. Enfin, un domaine basique, situé du côté N-terminal de chacun des monomères, permet l'interaction de cette structure avec l'ADN (**Figure 14A, C**). La liaison à l'ADN s'effectue spécifiquement au niveau d'une séquence de 6 nucléotides CANNTG appelée Boîte E (E Box) (Chien et al., 1996). Cette fixation ne peut, par ailleurs, avoir lieu que si les complexes formés sont des hétérodimères. Pour jouer leur rôle de facteurs de transcription, les protéines proneurales doivent donc s'associer à des protéines à domaine bHLH ubiquitaires telles que les protéines E (Johnson et al., 1992; Massari and Murre, 2000), qui fonctionnent comme des activateurs (**Figure 14B**).

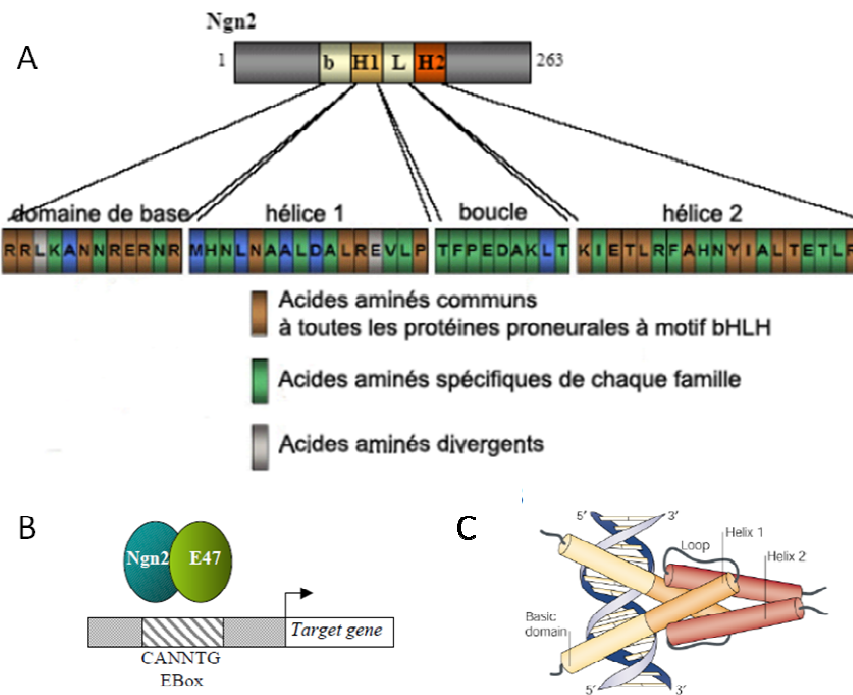


Figure 14 : Structure et fonction du domaine bHLH. (A) Séquence du domaine bHLH de la protéine Ngn2 de souris. Les couleurs indiquent le degré de conservation des acides aminés entre les protéines proneurales bHLH de famille différente. (B) Ngn2 hétérodimérise avec une protéine E pour se lier à une E box et activer la transcription des gènes cibles. (C) Représentation schématique de la structure d'un dimère bHLH lié à l'ADN.

Un certain nombre de molécules peuvent interférer avec l'activité des gènes proneuraux par l'intermédiaire de ces protéines E. Par exemple, les protéines Id sont des facteurs d'inhibition de la différenciation qui agissent comme des répresseurs passifs. En effet, la présence d'un domaine HLH dans leur séquence leur confère une grande affinité pour les protéines E mais l'absence de domaine basique ne leur permet pas de lier l'ADN. Ils entrent donc en compétition avec les protéines proneurales et séquestrent les protéines E en formant des hétérodimères ne pouvant plus se fixer à l'ADN (Yokota et al., 2001).

2.3.2. Rôle des facteurs bHLH au cours de la rétino-genèse

Ces dernières années de nombreuses études ont été consacrées à la mise en évidence de l'implication des facteurs à domaine bHLH préalablement découverts chez la drosophile pour la détermination neuronale dans la rétine de la souris ou du xénope (Hatakeyama and Kageyama, 2004; Ohsawa and Kageyama, 2008 ; Henningfeld et al., 2007). Par exemple, le gène *Atoh7* (précédemment appelé *Xath5* chez le xénope et *Math5* chez la souris) induit chez le xénope la genèse des cellules ganglionnaires dans la rétine quand il est surexprimé *in vivo*

(Kanekar et al., 1997). A l'inverse, la perte de fonction de ce facteur chez des mutants de poisson zèbre, *lakritz* (Kay et al., 2001) ou bien chez des souris mutantes (Brown et al., 2001; Wang et al., 2001) entraîne une forte diminution de la production de cellules ganglionnaires. Le gène proneural *Atho7* est donc nécessaire et suffisant pour la genèse des cellules ganglionnaires.

La question est maintenant de savoir si ce phénotype est uniquement dû à son effet proneural ou s'il est spécifique d'un type cellulaire particulier ? Est-ce que différents facteurs bHLH sont impliqués dans la spécification de chaque type cellulaire ?

D'autres facteurs de transcription à domaine bHLH présentent des profils différents en termes d'impact sur la détermination cellulaire de la rétine. Des expériences de gain de fonction ont par exemple montré que la surexpression des facteurs NeuroD, NeuroD4 et Neurog1 augmentent le nombre de photorécepteurs (Yang and Wang, 1998 ; Morrow et al., 1999 ; Perron et al., 1999). NeuroD ainsi que Ptf1a (*pancreatic transcription factor 1a*), un facteur de la famille Twist-bHLH sont impliqués dans la genèse des cellules amacrines et amacrines et horizontales respectivement (Fujitani et al., 2006 ; Nakhai et al., 2007 ; Kanekar et al., 1997 ; Brown et al., 1998, Ohnuma et al., 2002 ; Yang et al., 2003 ; Poggi et al., 2004). Par des approches de perte de fonction, il a été découvert que le gène *NeuroD* est requis pour la détermination des photorécepteurs, des cellules horizontales et des cellules amacrines (Morrow et al., 1998 ; Akagi et al., 2004). Les facteurs Ascl1 (précédemment nommé Mash1 chez la souris ou Xash1 chez le xénope) et NeuroD4 (précédemment nommé Math3 chez la souris et Xath3 chez le xénope) sont quant à eux requis pour la genèse des cellules bipolaires (Perron et al., 1999 ; revue dans Vetter and Brown, 2001).

Cependant, l'ensemble de ces facteurs est-il suffisant pour expliquer la diversité neuronale dans la rétine ?

2.3.3. Autres facteurs de transcription

La genèse des types cellulaires rétinien est aussi régulée par l'action d'autres types de facteurs de transcription tels que les facteurs à homeodomaine, à doigt de zinc, les leucines Zipper ou bien les récepteurs nucléaires.

Par exemple, la surexpression d'*Otx2* dans la rétine du poulet entraîne une augmentation du nombre de photorécepteurs alors que sa perte de fonction mène à une diminution (Nishida et al., 2003). A l'inverse, sa surexpression chez le xénope conduit à une diminution des photorécepteurs. Ces données démontrent qu'*Otx2* permet la détermination des progéniteurs vers un destin photorécepteurs.

D'autres facteurs comme les gènes à homeodomaine *Prox1*, *Chx10*, le gène *Foxn4* de type winged/helix forkhead, ou à domaine POU comme *Pou4f2* sont respectivement requis pour la spécification des cellules horizontales, bipolaires, amacrines et horizontales et ganglionnaires (Dyer et al., 2003 ; Burmeister et al., 1996 ; Li et al., 2004 ; Qui et al., 2008).

2.3.4. Les combinaisons de facteurs de détermination

Jusqu'à maintenant, nous avons vu que les nombreuses études sur l'impact des facteurs intrinsèques pour le choix du destin cellulaire se sont focalisées sur leur effet individuel. Cependant, l'hypothèse qu'ils puissent utiliser un mode combinatoire a été soulevée.

Des études ont en effet montré que le gain ou la perte de fonction de deux facteurs donne des résultats inattendus par rapport à ce que l'on aurait pu anticiper connaissant les phénotypes de leur gain ou perte de fonction seuls. Par exemple, la perte de fonction de *NeuroD4* ou *NeuroD* seuls n'affecte pas le nombre de cellules amacrines alors que des doubles mutants pour ces gènes en sont dépourvus (Inoue et al., 2002). De plus, alors que la surexpression d'*Ascl1* ou de *NeuroD4* seul entraîne une production plus importante de photorécepteurs et que le gain de fonction du gène à homeodomaine *Chx10* (*ceh-10 homeo domain containing homologue*) aboutit à la genèse de cellules de Müller, la surexpression combinée de *Chx10* avec *Ascl1* ou *NeuroD4* conduit à une augmentation des cellules bipolaires (**Figure 15**) (Hatakeyama et al., 2001, revue dans Ohsawa and Kageyama, 2008).

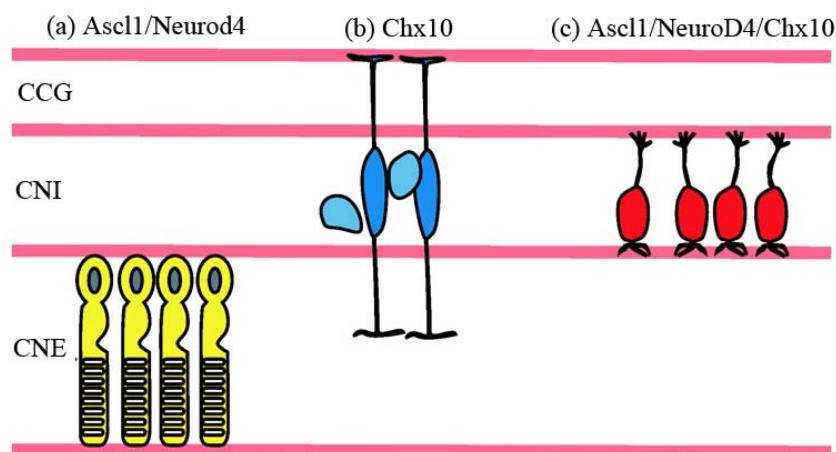


Figure 15 : Exemple de l'effet combinatoire des gènes *Ascl1*, *NeuroD4* et *Chx10*. Les expériences de gain montrent des effets individuels différents sur le destin neuronal dans la rétine que lorsqu'ils sont en combinaisons. (a) Surexpression d'*Ascl1* ou *NeuroD4* ; (b) surexpression de *Chx10* ; (c) Surexpression de *Chx10* en combinaison avec *Ascl1* ou *NeuroD4*. CCG, couche des cellules ganglionnaires ; CNI, couche nucléaire interne ; CNE, couche nucléaire externe (Ohsawa and Kageyama, 2008).

Ces résultats ont amené la communauté scientifique à rechercher de manière systématique les combinaisons entre les facteurs de détermination. Une équipe a particulièrement contribué à ces recherches. En effet, Wang et Harris ont en 2005 testé par surexpression *in vivo* chez le xénope, l'effet de la combinaison de huit gènes à homeodomaine (*Rx1*, *Six3*, *Pax6*, *Otx2*, *Otx5*, *Barhl2* et *Chx10*) et six gènes à domaine bHLH (*NeuroD*, *Neurog1*, *NeuroD4*, *Atoh7*, *Ascl1* et *Ash3*) sur la genèse des types cellulaires de la rétine, soit 288 combinaisons. Dans certains cas, de la même manière que ce qu'il a précédemment été décrit, la co-surexpression de deux facteurs conduit à l'apparition d'un nouveau phénotype. Dans d'autres cas, la co-surexpression entraîne un effet additif à celui observé lors de surexpression simple. Par exemple, l'impact de la surexpression combinée d'*Atoh7* et de *Barhl2* est doublé et correspond à la somme des effets individuels de ces deux facteurs sur les cellules ganglionnaires (Wang and Harris, 2005).

L'ensemble de ces quelques exemples démontre l'importance des combinaisons entre les facteurs bHLH mais aussi entre les facteurs bHLH et à homeodomaine pour la détermination des progéniteurs rétiniens (**Figure 16**). Jusqu'à maintenant, les tests de combinaisons se sont cantonnés à deux ou trois facteurs différents mais qu'en est-il de l'effet combinatoire de tous les facteurs exprimés dans une cellule ? Au cours du développement de la rétine, les

progéniteurs semblent exprimer des combinaisons complexes de facteurs de détermination qui seraient à la base de la diversité des neurones rétiniens.

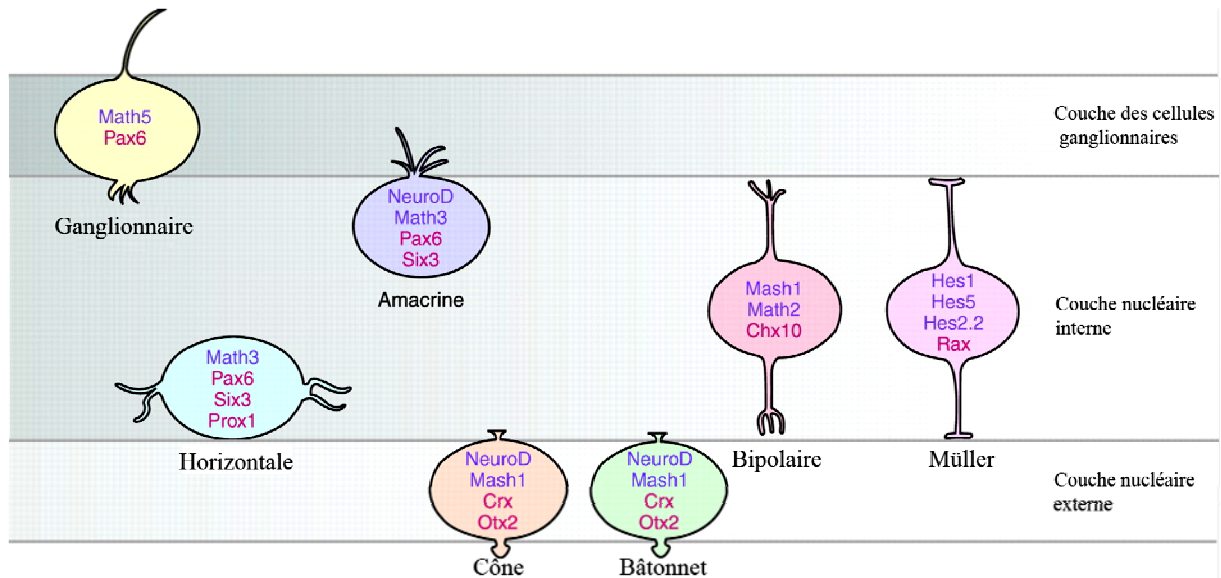


Figure 16 : Le mode combinatoire. Régulation de la spécification des types cellulaires rétiniens par des combinaisons de facteurs de transcription à homeodomaine (rouge) et à domaine bHLH (bleu) (adapté d'Ohsawa and Kageyama, 2008).

2.3.5. Régulation de la séquence temporelle de naissance des types cellulaires

Nous avons vu précédemment que ces facteurs de transcription influencent la destinée des progéniteurs multipotents. La question suivante est de comprendre comment la compétence des progéniteurs rétiniens est établie au cours du temps pour permettre de générer les différents types cellulaires selon un ordre bien précis.

Chez la drosophile, il a été mis en évidence qu'un lot de facteurs de transcription, Hunchback, Krüppel, Pdm et Castor, définit l'identité temporelle des neuroblastes (**Figure 17**) (Brody and Odenwald, 2005). Des homologues de ces facteurs de transcription clés pour l'identité temporelle des neuroblastes de drosophile ont été détectés dans la rétine de certains mammifères (Blackshaw et al., 2004; Elliott et al., 2008; Trimarchi et al., 2008).

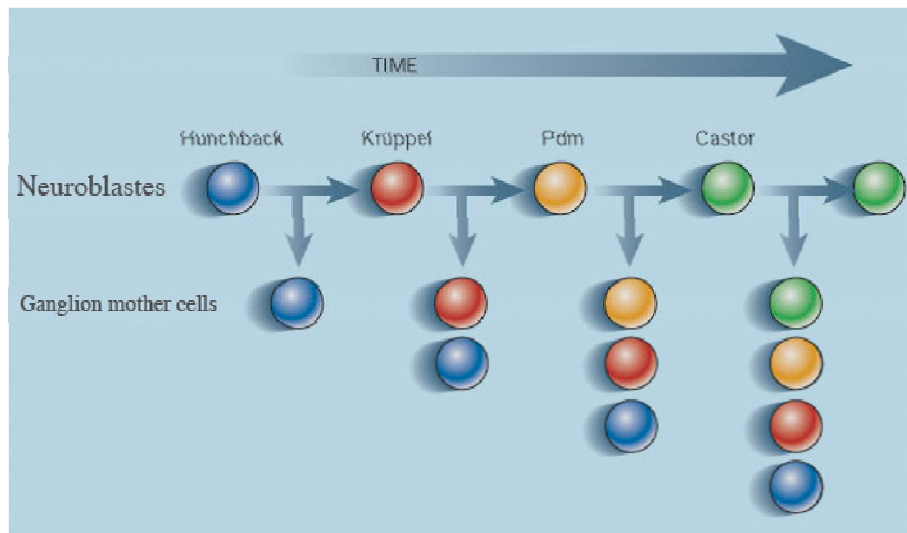


Figure 17 : Contrôle temporel du destin neuronal chez la drosophile. De la gauche vers la droite, les cellules progénitrices expriment quatre facteurs de transcription selon une séquence temporelle contrôlant l'ordre de production des neurones. Les neuroblastes expriment des facteurs de transcription différemment en fonction du temps et chacun d'eux génère une série de cellules mères ganglionnaires (d'après Livesey and Cepko, 2001).

Un orthologue de *hunchback* (*hb*), la protéine IKAROS de la famille des protéines à doigt de zinc 1 (codée par le gène *Ikzf1*, *Ikaros family zinc finger 1*), est par exemple présente dans des progéniteurs rétiniens précoces de souris mais pas dans des progéniteurs tardifs (Elliott et al., 2008). La question est donc : définit-elle une identité temporelle ?

Des rétines déficientes pour ce facteur présentent une réduction de la plupart des types cellulaires précoces. A l'inverse, une expression ectopique d'IKAROS dans des progéniteurs tardifs est suffisante pour induire la genèse des neurones rétiniens précoces. La surexpression d'IKAROS entraîne en contrepartie une réduction des cellules tardives (bipolaires et Müller) ce qui suggère que l'inhibition de ce facteur est requise pour la progression vers des stades plus tardifs. IKAROS apparait donc comme définissant une identité temporelle dans la rétine de souris, conférant une identité « précoce » aux progéniteurs dans lesquels il s'exprime. Des études complémentaires sont à envisager pour savoir si d'autres facteurs agissent dans le même réseau qu'IKAROS pour la détermination des fenêtres temporelles dans le lignage des progéniteurs rétiniens (Figure 18).

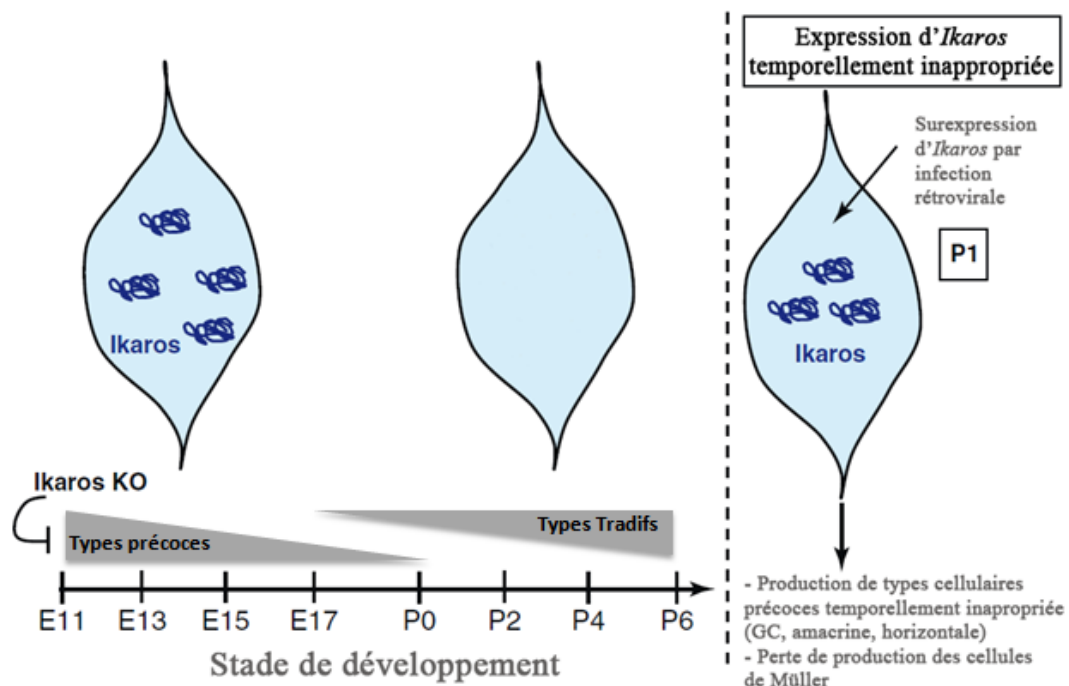


Figure 18 : L'identité temporelle par IKAROS, Chez la souris, l'identité temporelle des cellules progénitrices rétiniennes est définie par l'expression d'IKAROS. Les rétines délétées pour ce facteur présentent une réduction des neurones précoces alors que son expression à un temps inapproprié induit la production de neurones précoces (D'après Basset and Wallace, 2012).

2.3.5.1. Régulation des facteurs de détermination par les EFTFs

Les EFTFs impliqués dans la mise en place des champs optiques comme *Pax6*, *Six3* ou *Rx* seraient aussi impliqués dans la régulation des facteurs de transcription à domaine bHLH (Hirsch and Harris, 1997 ; Perron et al., 1998). Par exemple, une mutation conditionnelle de *Pax6* dans les progéniteurs rétiniens de souris au stade cupule optique conduit à une perte de l'expression de plusieurs gènes proneuraux à domaine bHLH tels que *Neurog2*, *Ascl1* ou *Atoh7*. De plus, il a été montré qu'*Atoh7* requière la présence de *Pax6* pour son activation (Riesenberg et al., 2009). Néanmoins, l'expression de *NeuroD* n'étant pas perdue, ceci suggère qu'il ne régule pas l'ensemble des facteurs de détermination. Ces résultats permettent d'expliquer pourquoi en l'absence de *Pax6*, les progéniteurs génèrent un excès de cellules (**Figure 19**) (Marquardt et al., 2001).

A travers la régulation d'une grande partie de facteurs, les EFTFs contribuent donc à l'acquisition de la multipotentialité des progéniteurs.

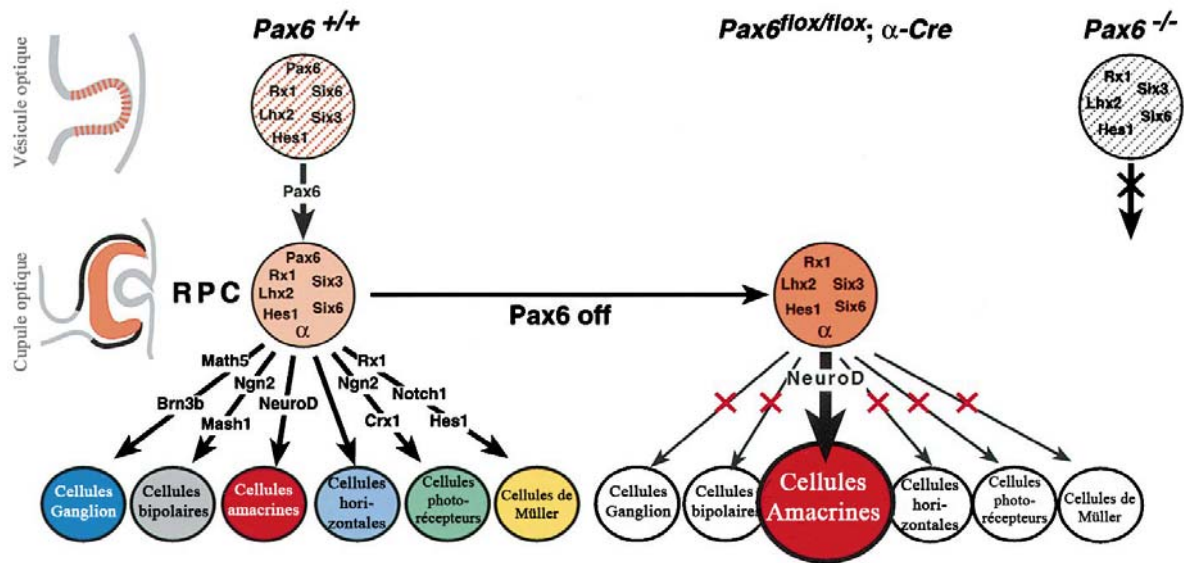


Figure 19 : Les progéniteurs rétiens requièrent *Pax6* pour acquérir leur multipotentialité. Les progéniteurs rétiens *Pax6*⁺ génèrent l'ensemble des types cellulaires via l'activation des facteurs de détermination (à gauche). La perte de fonction de *Pax6* conduit à la perte d'expression des facteurs de détermination excepté *NeuroD* (à droite). Les progéniteurs *Pax6*⁻ ne sont capables de se différencier qu'en cellules amacrine. RPC, Cellules Progénitrices Rétiniennes (d'après Marquardt et al., 2001).

2.3.5.2. Cascade transcriptionnelle des facteurs de détermination

En plus d'être régulé par les EFTFs, des études ont mis en évidence qu'ils sont capables de nombreuses interactions que ce soit direct ou indirect pour aboutir à la diversité neuronale dans la rétine. Ces gènes peuvent en effet jouer dans des cascades transcriptionnelles communes, s'activer ou s'inhiber les uns les autres.

Il existe en effet de nombreuses cascades transcriptionnelles entre les facteurs de détermination. Le facteur *Neurog2* par exemple est capable d'activer directement l'expression de *NeuroD* et indirectement l'expression de *NeuroD4* (Perron et al., 1999). Cette étude suggère que d'autres facteurs sont nécessaires à la cascade transcriptionnelle menant à la régulation de l'expression de *NeuroD4*. La spécification des cellules amacrine et horizontales est un autre bel exemple des interactions entre différentes familles de facteurs de détermination. Nous avons vu précédemment que *Foxn4* est requis pour la spécification des

cellules amacrines et horizontales. Plusieurs équipes ont pu démontrer que sa surexpression entraîne une activation de l'expression des gènes *NeuroD1*, *NeuroD4*, *Prox1* et *Ptf1a* (Fujitani et al., 2006; Inoue et al., 2002; Li et al., 2004). Cette donnée suggère que *Foxn4* est à la tête d'une cascade transcriptionnelle permettant de réguler la compétence des progéniteurs pour la spécification des cellules amacrines et/ou horizontales (**Figure 20**).

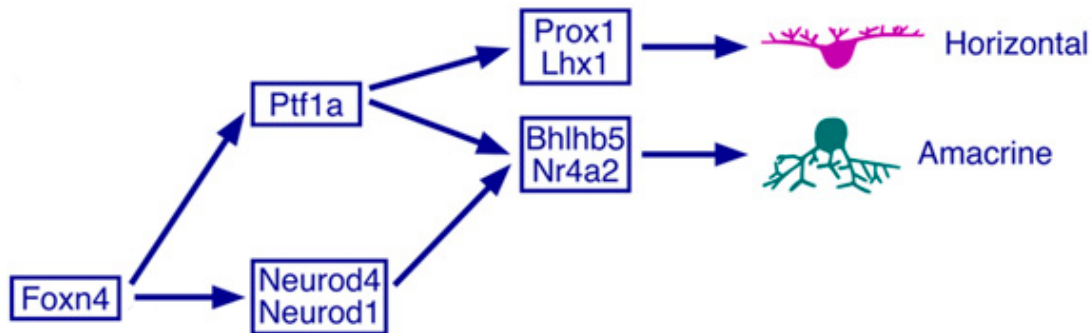


Figure 20 : Schéma de la cascade transcriptionnelle en aval de *Foxn4*. *Foxn4* pousse les progéniteurs rétiniens vers la spécification des cellules horizontales et amacrines via l'activation de l'expression de *Ptf1a*, *NeuroD4* et *NeuroD1* (d'après Luo et al., 2012).

Les facteurs de détermination sont aussi capables d'interagir physiquement ensemble. Les facteurs à domaine bHLH et à homeodomaine peuvent en effet former des complexes qui changent leur affinité pour des promoteurs spécifiques. La protéine codée par le gène à homeodomaine *Six3* par exemple est capable de se lier aux protéines *Atoh7*, *Ascl1* ou *NeuroD4* (Tessman et al., 2002).

2.3.5.3. La voie Notch/Delta dans le contrôle de l'identité temporelle

▪ L'inhibition latérale

La voie Notch/Delta a aussi été montrée comme essentielle dans la régulation de l'identité temporelle des progéniteurs rétiniens. Cette voie est connue pour réguler négativement les facteurs proneuraux et donc inhiber la spécification neuronale dans la rétine (Perron and Harris, 2000) (**Figure 21**).

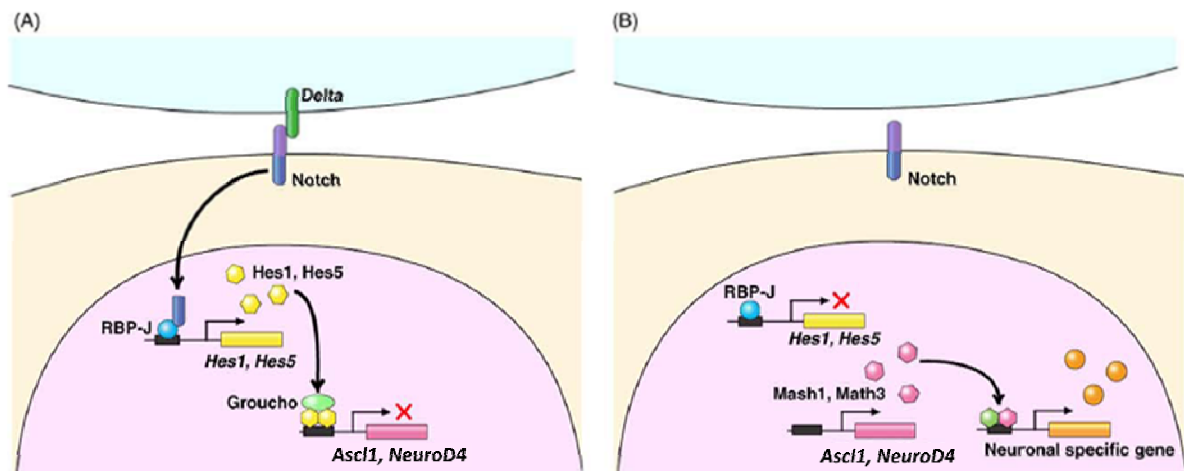


Figure 21 : Représentation schématique de la voie de signalisation Notch-Delta (A) L'activation du récepteur Notch par son ligand Delta aboutie à la cascade de signalisation suivante : Lorsque Notch est activé, son domaine intracellulaire ICD est clivé et donc capable de migrer dans le noyau pour s'associer au facteur de transcription RBPJ. Cette association permet l'activation de la transcription des gènes cibles, les répresseurs Hes1 et Hes5. Ces derniers vont à leur tour réguler négativement certains facteurs proneuraux à domaine bHLH tels qu'*Ascl1* ou *Neurog2*. (B) Lorsque Notch n'est pas activé les répresseurs Hes sont éteints, conduisant les facteurs bHLH à induire une spécification neuronale (d'après Hatakeyama and Kageyama, 2004).

La voie de signalisation Notch/Delta utilise un mode de communication entre cellules voisines appelé « inhibition latérale ». La cellule qui exprime une grande quantité de Delta inhibe les voisines d'une différenciation en neurones *via* Notch. Cette cellule à l'origine de l'inhibition latérale, recevant moins de signal Notch, peut alors se différencier (**Figure 22**) (Vetter and Brown, 2001).

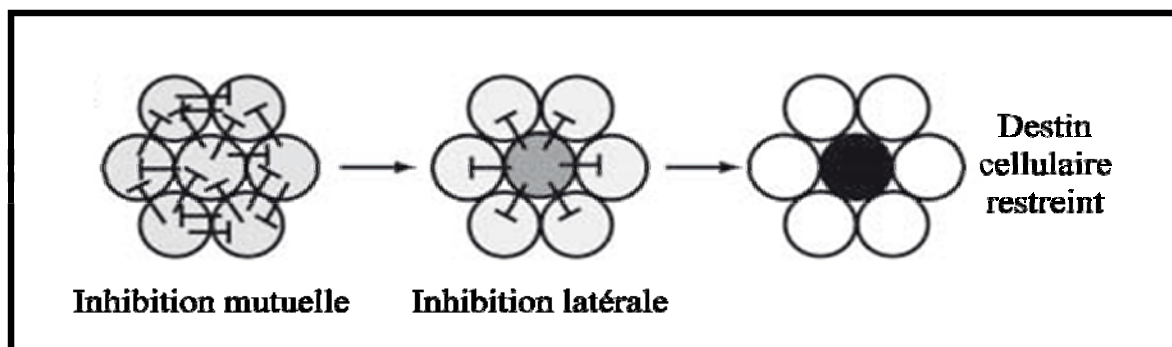


Figure 22 : Représentation schématique du mécanisme d'inhibition latérale par la signalisation Notch. En premier lieu, les cellules partageant le même destin (grises) envoient et reçoivent des signaux Notch : Inhibition mutuelle. Parmi elles, une cellule (gris foncé) va exprimer plus de ligand Delta et donc inhiber ses voisines d'une différenciation neuronale : Inhibition latérale (adapté de Lai, 2004).

Les mécanismes par lesquels une cellule va exprimer une plus grande quantité de Delta que ces voisines semblent plutôt stochastiques. Bien que les facteurs de détermination soient inhibés par la voie Notch, il a cependant été montré que certains d'entre eux comme Atoh7 peuvent réguler positivement l'expression de *Delta* (Vetter and Brown, 2001). Mais qui agit en premier ? Qu'est-ce qui pourrait contrôler le moment où les facteurs sont inhibés par la voie Notch de celui où cette inhibition est levée conduisant à l'activation de l'expression de delta pour un progéniteur donné ?

Plusieurs études réalisées dans la rétine du xénope ou du poulet ont montré que l'activation ou l'inhibition de la voie Notch modifie le moment où les progéniteurs sont déterminés provoquant des changements importants sur la genèse des types cellulaires rétinien (Dorsky et al., 1997; Dorsky et al., 1995 ; Henrique et al., 1997 ; Austin et al., 1995 ; Perron and Harris, 2000 ; Jadhav et al., 2006). Par exemple, l'activation ou l'inactivation de celle-ci maintient les progéniteurs en prolifération ou accélère la différenciation neuronale (Nelson et al., 2007 ; Alexson et al., 2006). Ces données suggèrent que la voie Notch/Delta permet d'aboutir à une genèse séquentielle des types cellulaires au cours de la rétino-genèse par le mécanisme d'inhibition latérale en assurant le maintien d'une partie des progéniteurs dans un état prolifératif.

▪ La Migration Nucléaire Intercinétique : MNI

En plus de l'inhibition latérale, un autre mécanisme permettrait de moduler au cours du temps le niveau du signal Notch reçu par les progéniteurs. Dans les zones prolifératrices, les progéniteurs établissent des connexions cytoplasmiques avec la face basale et apicale du neuroépithélium. Leur noyau est alors capable de migrer selon l'axe apical-basal en fonction de la phase du cycle cellulaire. Ce phénomène est appelé « migration nucléaire intercinétique » (MNI) (Del Bene, 2011). Des études ont montré que des mutants de poisson zèbre (*mok*) dont la MNI est perturbée présentent une perturbation de la neurogenèse dans la rétine (Del Bene et al., 2008). Sachant que Notch est exprimé selon un gradient apical-basal dans le neuroépithélium (Murciano et al., 2002), on peut supposer que les cellules progénitrices vont donc recevoir des signaux de Notch variables en fonction de leur migration (**Figure 23**) (Buchman and Tasai, 2008). L'ensemble de ces données suggèrent que la MNI est un système de contrôle de la différenciation neurale *via* la voie Notch et dans le temps puisque étroitement liée au cycle cellulaire (Baye and Link, 2008).

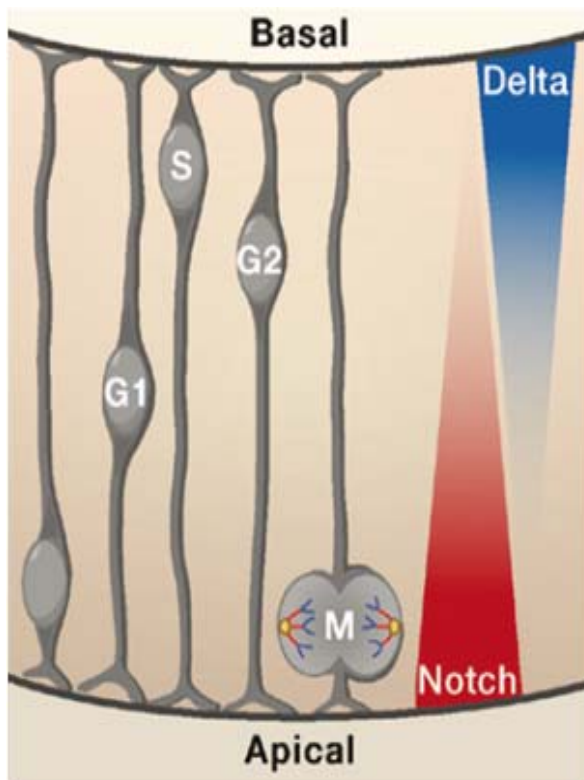


Figure 23 : La migration nucléaire intercinétique et l'influence de Notch sur la neurogenèse. Le noyau des progéniteurs migre selon la phase du cycle cellulaire. A gauche : une cellule entre dans le cycle cellulaire à la face apicale de la rétine. Le noyau migre alors vers la face basale du neuroépithélium rétinien quand il passe en phase G1 puis entre en phase S à la fin de la migration basale. Pendant la phase G2, le noyau migre dans le sens opposé vers la face apicale. La cellule entre en mitose (M) du côté apical. En fonction de la distance à laquelle migrent les cellules, elles sont soumises à des signaux variables de Notch. L'expression de Notch et l'activité de la voie Notch augmente en gradient vers la face apicale. Delta le ligand de Notch est quant à lui exprimé selon un gradient opposé. Du côté basal, les progéniteurs étant moins soumis à l'activité Notch peuvent sortir du cycle cellulaire pour se différencier (Buchman and Tasai, 2008).

2.3.5.4. Régulation post-transcriptionnelle

Une autre possibilité pour générer une identité temporelle est une régulation post-transcriptionnelle des facteurs de détermination. Il est intéressant de constater que les ARNm d'IKAROS sont présents tout au long de la rétino-genèse alors que la protéine est présente seulement dans des progéniteurs précoces (Elliott et al., 2008). Ceci suggère une possible régulation post-transcriptionnelle de ce gène. Une étude propose en effet que des micro ARN (miARN) pourraient jouer un rôle dans ce processus, d'autant plus qu'une centaine de ces molécules sont présentes dans la rétine des mammifères (Hackler et al., 2010; Karali et al., 2010).

De manière similaire à IKAROS, l'expression des gènes à homeodomaine *Otx5b* (*orthodenticle homolog 5-B*), *Vsx1* (*Visual system homeobox 1*) et *Otx2* sont temporellement régulés (Decembrini et al., 2006). En effet, le moment où les ARNm sont transcrits est décalé par rapport au temps où les protéines sont traduites. Dans cette étude, les auteurs ont pu

mettre en évidence que l'inhibition du processus miARN par la perte de l'enzyme dicer (dicer1, ribonucléase type III) modifie le patron d'expression séquentielle de ces protéines (Decembrini et al., 2008; Decembrini et al., 2006). Ceci suggère une régulation post-transcriptionnelle de ces gènes *via* les miARNs. Les chercheurs ont alors voulu identifier les miARNs responsables de cette régulation. Ils ont trouvé qu'un lot de quatre miARNs (miR-129, miR-155 et miR-222) contrôle la fenêtre temporelle de la traduction de *Vsx1* et *Otx2* dans des progéniteurs précoces. Compte tenu du rôle des gènes *Vsx1* et *Otx2* dans la spécification des cellules bipolaires, cette régulation post-transcriptionnelle régule ainsi la genèse de ce type cellulaire au stade approprié (Decembrini et al., 2009) (**Figure 24**).

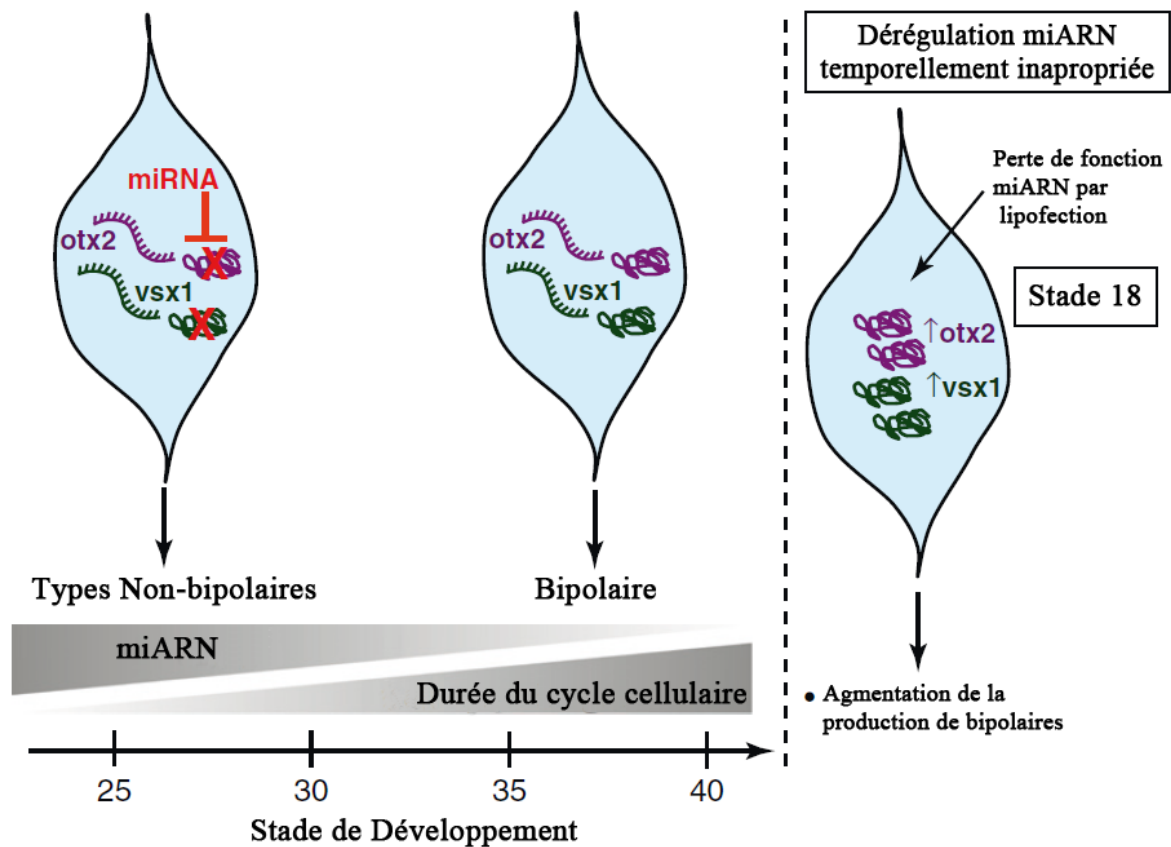


Figure 24 : Exemple d'action des miARNs sur le destin neural chez le xénope. Les ARNm des gènes *Otx2* et *Vsx2* sont présents dans les progéniteurs précoces mais ne sont traduits qu'à partir du stade 37. Un lot de miARN inhibe leur traduction jusqu'au stade approprié pour la naissance des cellules bipolaires. (à droite) L'inhibition du processus miARN entraîne une production temporellement inappropriée de ces cellules (adapté de Bassett and Wallace, 2012).

D'autres molécules telles que les protéines liant l'ARN (RBP) sont également impliquées dans cette régulation. Cependant, très peu d'études ont montré leur rôle dans la rétine. Parmi le peu de données à ce sujet, des expériences de gain et perte de fonction suggèrent que la protéine liant l'ARN *Seb4R* possède un effet proneural similaire aux facteurs de détermination et se positionne en aval de *NeuroD* et *Neurog2* (Boy et al., 2004). Les cibles de cette RBP et ses liens avec les gènes proneuraux restent néanmoins à découvrir.

2.3.6. Hétérogénéité des progéniteurs

Nous venons de voir que les progéniteurs sont intrinsèquement différents au cours du temps. Tel que le modèle de compétence le suggère, un progéniteur tardif possède une compétence différente d'un progéniteur précoce. Des expériences ont montré que certains marqueurs ne sont exprimés que dans une sous-population de progéniteur à un stade donné. Ces progéniteurs sont de plus restreints vers un destin en particulier. En effet, dans les années 90, il a été montré que des progéniteurs exprimant ces marqueurs (VC1.1 ou Syntaxin) génèrent préférentiellement des cellules amacriennes et horizontales (Alexiades and Cepko, 1997). Cette donnée est un premier élément de réponse à la question suivante : pourquoi les progéniteurs d'un même stade ne peuvent-ils pas donner tous les types cellulaires? Pour la première fois l'hypothèse que les progéniteurs forment une population hétérogène a été soulevée.

Par des approches transcriptomiques inédites à l'échelle d'un progéniteur unique, il a été confirmé qu'il existait une très grande hétérogénéité pour une population de progéniteur rétinien de même stade (Trimarchi et al., 2008). Par l'utilisation de puces à ADN, les auteurs ont comparé le profil d'expression de 42 cellules progénitrices rétinienne individuellement à des stades de développement identiques. Ils ont ainsi pu démontrer que les progéniteurs isolés présentent des profils transcriptomiques très hétérogènes particulièrement en termes de facteurs de transcription.

2.3.7. Lignage stéréotypé ou stochastique

Nous savons à présent que les progéniteurs réiniens forment une population hétérogène. La question est maintenant de savoir si cette variabilité est à l'origine d'un lignage stéréotypé ou plus aléatoires. Grâce à l'utilisation d'animaux transgéniques et à des techniques d'imagerie 4D, des études ont permis de donner des éléments de réponse à cette question en suivant le développement d'une sous population de progéniteurs.

Chez le poisson zèbre par exemple, l'expression d'*atoh7* définit un lignage reproductible où la cellule fille d'un progéniteur *atoh7+* adopte principalement un destin de cellules ganglionnaires alors que les autres adoptent un destin neuronal différent (Poggi et al., 2005). Plus récemment, il a été montré que l'expression des gènes *Vsx1* et *Vsx2* définissent un sous-ensemble cellulaire distinct (Vitorino et al., 2009). De plus, par des analyses de microscopie en temps réelle, il a été montré qu'une sous population de progéniteurs est exclusivement dédiée à la genèse de cellules horizontales (Godinho et al., 2007). Ces résultats penchent en faveur de l'hypothèse d'un lignage plutôt défini. Comme pour les cellules *atoh7+*, les cellules *Vsx1+* présentent un biais dans leur descendance puisqu'elles génèrent principalement des neurones bipolaires. Des cellules *Vsx2+* quant-à elles génèrent des cellules de Müller et des cellules bipolaires différentes de celles issues des cellules *Vsx1+* (**Figure 25**) (Vitorino et al., 2009). L'ensemble de ces données suggèrent que l'hétérogénéité des progéniteurs pourrait être à l'origine d'un lignage plutôt stéréotypé et minimise donc l'influence des facteurs extrinsèques.

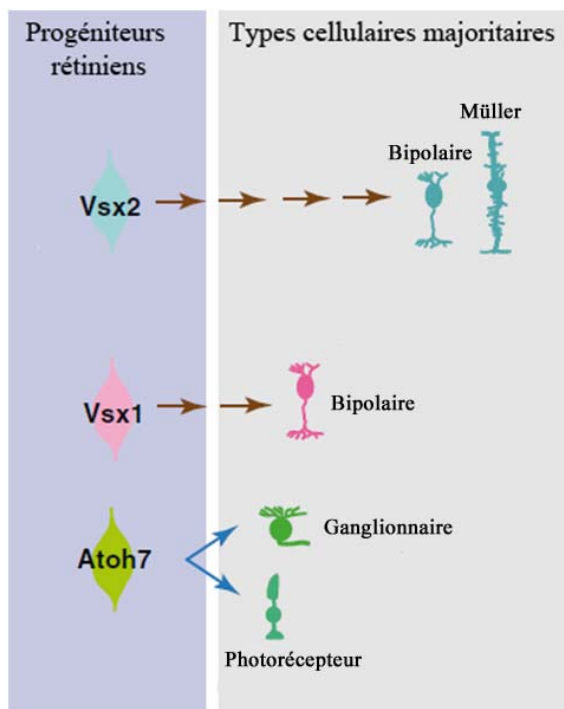


Figure 25 : Modèle de développement de lignages distincts. Les progéniteurs rétiniens *Vsx2*⁺, *Vsx1*⁺ et *Atoh7*⁺ génèrent des types cellulaires différents (adapté de Bassett and Wallace, 2012).

Afin de trancher entre l'hypothèse d'un lignage stéréotypé ou stochastique, l'équipe de Michel Cayouette a récemment développé un système *in vitro* permettant de reconstruire des arbres de lignage complet. Libre de toute influence du à l'environnement, il s'agit ici de suivre des progéniteurs de rats en culture clonale par vidéo microscopie et en « Time-laps » (Gomes et al., 2011). Les auteurs ont en parallèle construit des modèles prédictifs répondant à des règles simples dans le cas d'un lignage bien définis. Dans ces modèles, la probabilité qu'un progéniteur produise un type cellulaire particulier dépend de sa position dans le lignage et est différente de la fréquence à laquelle un type cellulaire est présent dans la rétine. Par comparaison entre les données obtenues *in vitro* et leurs modèles, ils ont pu mettre en évidence qu'il existait un patron plutôt aléatoire. Par exemple, la fréquence des divisions pour laquelle une cellule fille reste progénitrice et l'autre différenciée (Pr/D), les deux restent progénitrices (Pr/Pr) ou les deux deviennent différenciées (D/D) est fixe au cours du développement mais ne dépend pas du résultat de la division précédente (**Figure 26a**). De plus, les types cellulaires générés répondent à un modèle stochastique où la probabilité de générer un type en particulier est la même que la fréquence à laquelle un type cellulaire est présent dans une rétine mature. La fréquence des bâtonnets étant plus importante que celle des bipolaires, il y a donc, pour chaque division, une probabilité plus grande d'obtenir des cellules bâtonnets que des cellules bipolaires (**Figure 26b**).

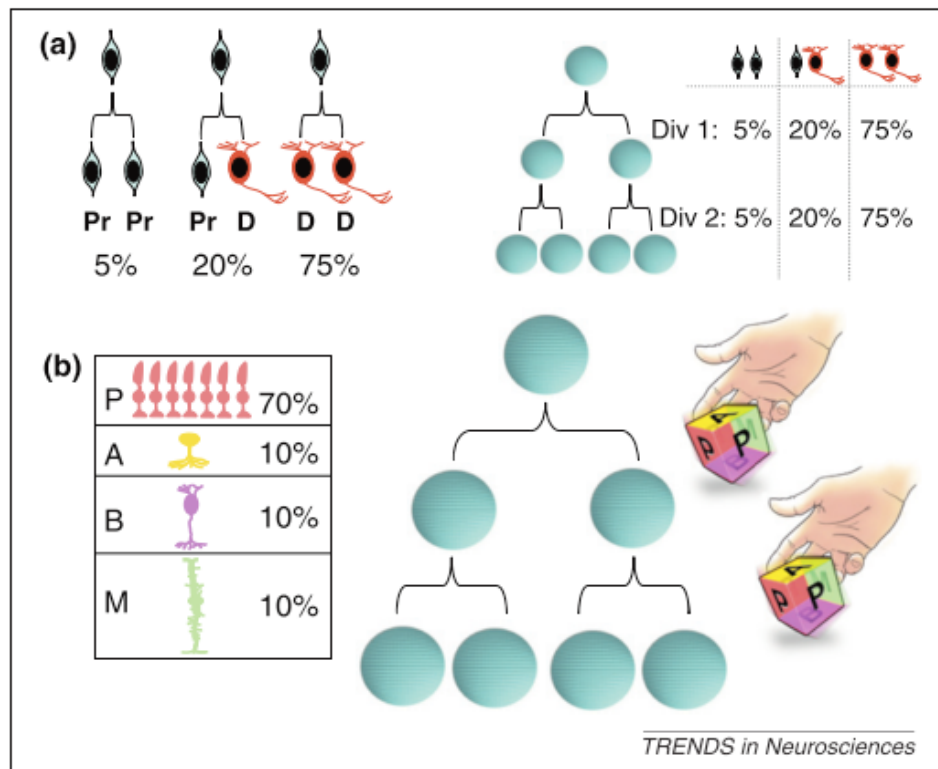


Figure 26 : Reconstruction d'un lignage de progéniteurs rétiniens de rat. (a) Fréquence de division pour laquelle on obtient deux progéniteurs (Pr/Pr), un progéniteur et une cellule différenciée (Pr/D) ou deux cellules différenciées (D/D). Pour chaque division, un arbre sur la droite montre que la fréquence des différents résultats ne change pas. (b) Choix du destin neural en fonction de la position dans le lignage. La probabilité de générer un type en particulier est la même que la fréquence à laquelle un type cellulaire est présent dans la rétine. Pour chaque division à laquelle la cellule fille se différencie, un destin photorécepteur est plus probable que celui d'autres types cellulaires (A, amacrine ; B, bipolaire ; C, Müller) (d'après Bassett and Wallace, 2012).

L'ensemble de ces expériences conduit à une hypothèse alternative aux deux proposées précédemment. En effet, le modèle de rétino-genèse qui prévaut aujourd'hui est qu'il existerait un lignage prédéterminé mais où les décisions stochastiques jouent un rôle majeur.

2.3.8. A quel moment du cycle cellulaire les progéniteurs sont-ils déterminés ?

Les expériences de lignage montrent que des progéniteurs rétiniens peuvent adopter un destin neural très tardivement. Cependant, il n'est aujourd'hui pas clair si les progéniteurs sont déterminés pour un type cellulaire particulier avant ou après la division terminale.

Dans une étude récente, les auteurs ont cherché à savoir quel était le lien entre la durée du cycle cellulaire ainsi que la division terminale et le destin neural et identifier précisément le moment où s'engagent les progéniteurs. Pendant les phases précoces du développement embryonnaires, *Brn3b* et *Isl1*, contrairement à *Ptf1a*, sont co-exprimés avant que les progéniteurs ne sortent du cycle cellulaire, pendant les phases S ou G2. Des analyses de lignage par l'utilisation de rétrovirus révèlent que les progéniteurs co-exprimant *Brn3b* et *Isl1* donnent de multiples clones à deux cellules filles seulement de type ganglionnaire. Ceci suggère que ces progéniteurs sont dans leur division finale et sont déjà engagés vers ce destin neuronal. En revanche, ce n'est pas le cas à des stades embryonnaires plus tardifs où *brn3b* et *Isl1* sont exclusivement exprimés dans les cellules post-mitotiques (Prasov and Glaser, 2012). Ces nouvelles données suggèrent que le choix de la destinée neuronale peut aussi bien avoir lieu avant et après la sortie du cycle cellulaire.

2.3.9. Influence du cycle cellulaire sur le destin neural et *vice versa*

Le moment auquel les progéniteurs sortent du cycle cellulaire semble important pour que les différents types cellulaires de la rétine naissent dans un ordre bien défini. On peut alors se demander si les facteurs de détermination et les composants du cycle cellulaire peuvent eux aussi jouer un rôle dans ce processus.

Les inhibiteurs de Kinases dépendantes des cyclines (CDKi) tels que p27Xic1, p16Xic2 et p17Xic3 (*cyclin-dependent kinase inhibitor xic*) sont connus pour bloquer le cycle cellulaire principalement en phase G1 ou S (Daniels et al., 2004). Des expériences de surexpression de *p27Xic1* chez le xénope, le poisson zèbre ou les mammifères, ont montré qu'il induit la sortie du cycle cellulaire menant à une augmentation du nombre de cellules gliales de Müller (Ohnuma et al., 1999 ; Kay et al., 2001 ; Tarui et al., 2005). Il a de plus été montré qu'une molécule de la même famille chez la souris, p57Kip2 influence la spécification des cellules amacrines (Dyer and Cepko, 2001). Ces données et d'autres suggèrent que des composants du cycle cellulaire jouent un rôle dans le choix temporel du destin cellulaire (revue dans Bilitou and Ohnuma, 2010).

Etant donné l'influence des composants du cycle cellulaire sur le destin neuronal, on peut se demander s'il existe un lien entre les facteurs de détermination et des composants du cycle cellulaire. Les facteurs de détermination sont-ils capables de les réguler ?

Il a été montré qu'*Atoh7* peut influencer les cellules à sortir du cycle au moment approprié au cours de l'histogenèse. En effet, chez des mutants de poisson zèbre et de souris *Atoh7* qui présentent une perte significative des cellules ganglionnaires, les progéniteurs rétiniens ne parviennent pas à sortir du cycle au moment où ce type cellulaire naît normalement et ne produisent que des neurones tardifs (Brown et al., 2001; Kay et al., 2001). Cette étude suggère qu'*Atoh7*, outre de promouvoir la destinée des cellules ganglionnaires, aide aussi les progéniteurs rétiniens à sortir du cycle cellulaire. D'autres études ont mis en évidence que les gènes proneuraux tels que *NeuroD* ou *Neurog1* induisent aussi la sortie du cycle cellulaire (Kanekar et al., 1997 ; Farah et al., 2000 ; Ochocinska and Hitchcock, 2009). Ces données laissent supposer que les facteurs de détermination pourraient jouer sur le cycle cellulaire par l'activation d'inhibiteurs du cycle tels que les CDKi. En effet, il a été démontré que les facteurs de détermination peuvent réguler l'expression des cyclines et des inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (revue dans Bilitou and Ohnuma, 2010). Par exemple, *Atoh7* est capable de réguler positivement p27Xic1 (Le et al., 2006).

D'autre part, des données suggèrent que les composants du cycle cellulaire régulent l'activité des facteurs de détermination. Par exemple, il a été montré que p27Xic1 active la neurogenèse primaire chez le xénope par la stabilisation de facteurs de transcription à domaine bHLH (Carruthers et al., 2003 ; Vernon et al., 2003). De plus, une étude récente démontre que le facteur *Neurog2* est phosphorylé en réponse à une hausse du niveau de kinase dépendante des cyclines (cdk) conduisant à une perte de son activité (Ali et al., 2011).

L'ensemble de ces résultats suggère qu'il existe une étroite collaboration entre les composants du cycle cellulaire et les facteurs de détermination pour le contrôle de la rétino-genèse (**Figure 27**).

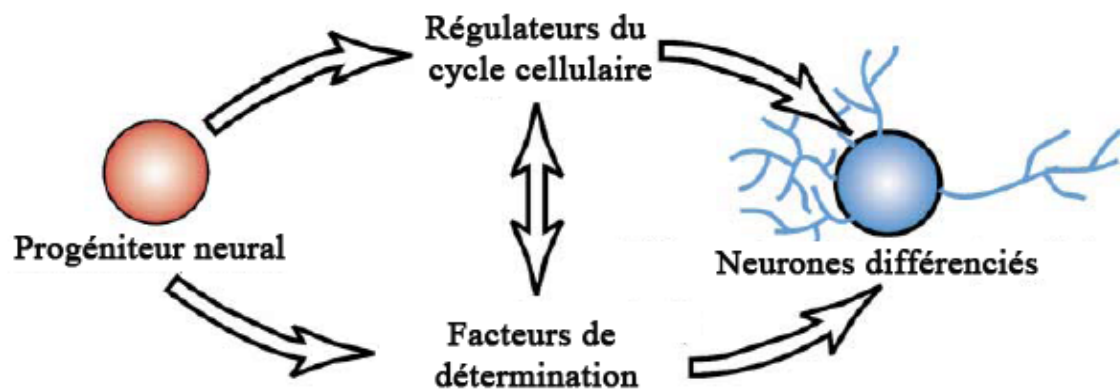


Figure 27 : Interactions entre les régulateurs du cycle cellulaire et les déterminants du destin neural. Les régulateurs du cycle cellulaire affectent la fonction des facteurs de détermination et inversement (d'après Ohnuma and Harris, 2003).

2.3.10. Influence du mode de division symétrique versus asymétrique sur le destin neural

La mise en place du lignage cellulaire dans la rétine implique une série de divisions cellulaires que ce soient prolifératives ou neurogéniques (symétriques et/ou asymétriques) (**Figure 28**). Le choix du mode de division peut-il avoir une influence sur la destinée cellulaire ?

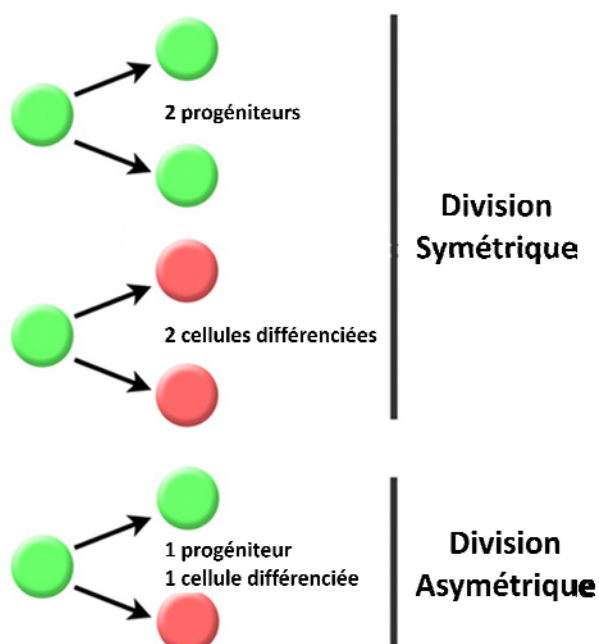


Figure 28 : Schéma représentant une division symétrique et asymétrique (adapté de Lee and Vasioukhin, 2008).

Des études chez le poisson zèbre ont montré que le changement de l'orientation de l'axe de division contribue à la prise de choix vers un destin particulier (Das et al., 2003; Poggi et al., 2005). Dans ces expériences, des progéniteurs exprimant une construction chimérique *Atoh7:GFP* tendent à se diviser de façon circonférentielle et se différencient en une cellule ganglionnaire et un autre type cellulaire. En revanche, lorsque ces progéniteurs adoptent un axe de division central-périphérique, ils conduisent à la genèse de deux cellules ganglionnaires. Ces résultats constituent un des exemples mettant en évidence que le choix de l'axe de division influence le destin neural dans la rétine (revue dans Agathocleous and Harris, 2009).

2.3.11. L'implication des mécanismes épigénétiques au cours de la rétino-genèse

En plus de la multitude de régulations transcriptionnelles que nous avons vu jusqu'à présent, les phénomènes épigénétiques pourraient avoir un impact sur le destin neural dans la rétine. Ces phénomènes sont des modifications transmissibles (par meiose ou mitose) et éventuellement réversibles correspondant à un état d'un gène. Ces modifications se font principalement par méthylation de l'ADN et remodelage de la chromatine. De nombreuses études ont démontré que ces mécanismes sont importants pour la régulation de l'expression des gènes lors de l'embryogenèse ou la gamétogenèse par exemple (revue dans Smallwood and Kelsey, 2012).

Dans une étude récente, il a été mis en évidence qu'un grand nombre de gènes impliqués dans la spécification des photorécepteurs présentent des marques de méthylation (Merbs et al., 2012). La méthylation de l'ADN jouerait donc un rôle dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la spécification des photorécepteurs chez les mammifères. D'autres mécanismes comme la déacétylation des histones conduit à la répression de gènes entraînant des effets sur la différenciation et la prolifération chez le poisson zèbre (Yamaguchi et al., 2005 ; Chen and Cepko, 2007). Il a aussi été mis en évidence que les ARNs non codant (ARNnc) tel que l'ARNnc *Six3OS* est spécifiquement exprimé dans la rétine en développement et est impliqué dans le choix du destin neuronal (Rapicavoli et al., 2011). Ces ARNnc sont connus pour être impliqués dans le recrutement d'un complexe protéique de modification de la chromatine : PRC2 (polycomb repressive complex 2) (Bracken and Helin,

2009 ; Margueron and Reinberg, 2011). L'action du complexe PRC2 conduit à la répression des gènes cibles par méthylation des histones H3 (revue dans Aldiri and Vetter, 2012). L'ensemble de ces données suggère que les phénomènes épigénétiques jouent très certainement un rôle clé dans la régulation des facteurs de détermination mais demandent encore à être étudiés.

2.3.12. Stabilisation du destin cellulaire

Une fois qu'un progéniteur est engagé vers un destin cellulaire particulier, il existe des programmes de répression permettant de stabiliser son choix dont beaucoup agissent à un niveau post-mitotique. Par exemple, *Pou4f2* stabilise les progéniteurs précoces de cellules ganglionnaires en réprimant la formation de cellules ganglionnaires surnuméraires ou d'amacrines et d'horizontales plus tardives (Qiu et al., 2008). *Prdm1/Blimp1* (*PR domain zinc finger protein 1*) réprime quant à lui le destin bipolaire dans des précurseurs de photorécepteurs (Brzezinski et al., 2010).

La maintenance de l'identité des photorécepteurs est assurée par un facteur de transcription à doigt de zinc, Blimp1. *Blimp1* est spécifiquement exprimé au niveau des photorécepteurs de la rétine et est contrôlé par le gène *Otx2* (Katoh et al., 2010). La délétion de ce facteur chez la souris mène les progéniteurs immatures de photorécepteurs *Otx2*⁺ à exprimer des marqueurs de cellules bipolaires. De plus, sa surexpression affecte la genèse des cellules bipolaires. Blimp1 semble donc stabiliser le destin photorécepteur par la répression de facteurs de spécification des cellules bipolaires (Brzezinski et al., 2010 ; Katoh et al., 2010).

2.3.13. Conclusion : une multitude de mécanismes impliquée dans la rétino-genèse

L'ensemble des données présentées dans ce chapitre montre que la rétino-genèse est un processus complexe et finement orchestré. De la régulation temporelle de l'ordre de naissance des types cellulaires au contrôle du nombre exacte de neurones, ce processus fait intervenir une multitude de mécanismes agissant à tous les niveaux. Il est clair que ces mécanismes ne

sont à ce jour pas tous identifiés ou complètement compris. La compréhension de la part jouée par les phénomènes épigénétiques ou des régulations post-transcriptionnelles par exemple, n'en sont qu'à leur commencement.

Pour conclure sur ce chapitre, je terminerais sur un schéma tiré de la revue d'Agathocleous et Harris publié en 2009 qui reflète parfaitement le niveau de complexité mis en jeux pour la formation de la rétine (**Figure 29**).

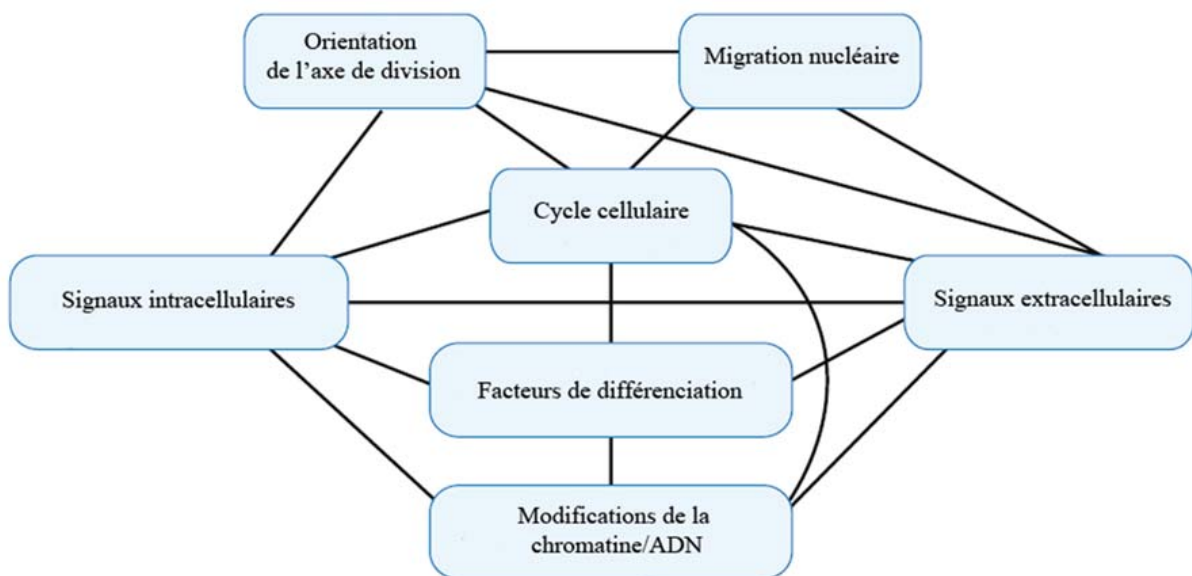


Figure 29 : Des interactions entre différentes fonctions cellulaires impliquées dans la rétinogenèse (adapté d'Agathocleous and Harris, 2009).

3. Les sous-types cellulaires rétiniens et leur détermination

Les nombreuses études que je vous ai présentées précédemment se sont focalisées sur la détermination des six types cellulaires de la rétine. La rétine est souvent considérée et utilisée comme un modèle d'étude pour son apparente simplicité. Cependant, la diversité au sein de la rétine est bien plus importante et bien plus complexe que cette simplification en six types cellulaires ne le laisse entendre. Il existe en effet pour chaque grande classe neurale une multitude de sous-types cellulaires possédant des rôles physiologiques différents. Bien que ces sous-types neuronaux soient connus depuis longtemps et possédant des propriétés indispensables à la vision, très peu d'études se sont portées sur leur mode de détermination au cours du développement. Une grande partie de ma thèse a été consacrée à l'étude de ces sous-types, ce chapitre a donc pour objectif de mieux comprendre cette diversité et d'y associer des acteurs moléculaires clés pour leur spécification.

3.1. Les sous-types neuronaux rétiniens : généralités et classification

La notion de sous-types neuronaux dans la rétine a pour la première fois été décrite par Ramon y Cajal qui montrait qu'il existait différents types de connexion pour un même type cellulaire (Cajal, 1892). La classification des sous-types cellulaires de la rétine est basée sur plusieurs critères tels que le type de neurotransmetteur, la morphologie ou le type de connexions établies.

En termes de neurotransmetteurs, les deux plus abondants de la rétine sont le GABA et le glutamate. Le GABA (acide γ -aminobutyrique) est le principal neurotransmetteur inhibiteur de la rétine. Il joue un rôle majeur en empêchant l'excitation prolongée de certains neurones. Les effets inhibiteurs du GABA servent à contrebalancer les effets excitateurs du glutamate, le deuxième neurotransmetteur majoritaire de la rétine. Les sous-types GABAergiques sont principalement retrouvés au sein des cellules horizontales et amacrines alors que les cellules cônes, bâtonnets, bipolaires et ganglionnaires sont en majorité de sous-types glutamatergiques (**Figure 30**).

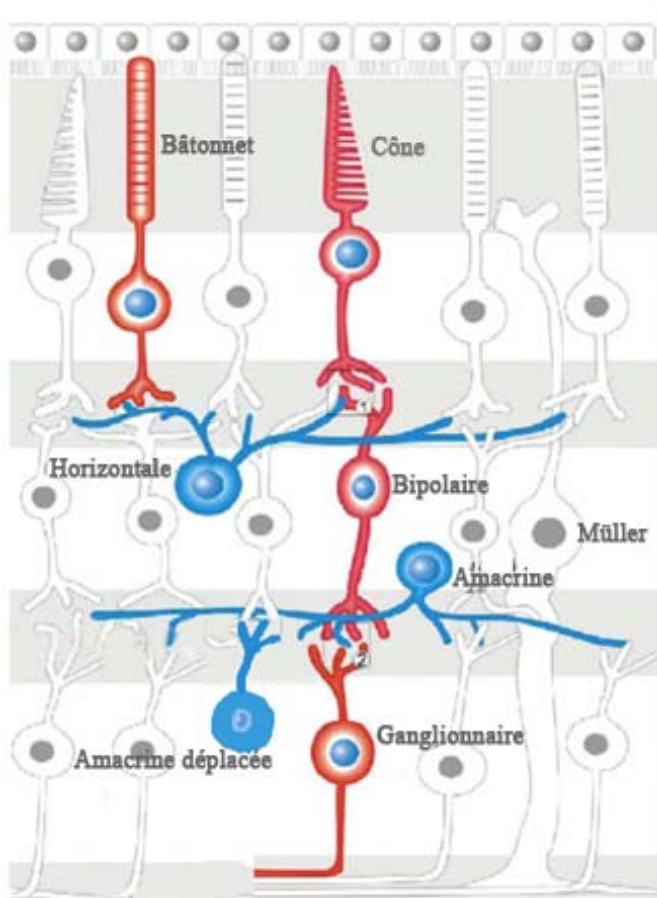


Figure 30 : Les neurotransmetteurs les plus abondants de la rétine : le GABA (en bleu) et le glutamate (en rouge). Le GABA est principalement utilisé par les cellules horizontales, amacrines et amacrines déplacées. Les cellules photoréceptrices, bipolaires et ganglionnaires utilisent en revanche essentiellement le glutamate (adapté de Yang and Wu, 2004).

Cependant une partie des neurones rétiniens utilisent d'autres neurotransmetteurs tels que la sérotonine, la glycine, les catécholamines ou le neuropeptide Y que je préciserai par la suite.

Selon leur morphologie ou le type de connexion qu'ils établissent, plus de 60 sous-types ont été identifiés jusqu'à présent dans la rétine (Masland, 2001 ; Masland, 2011) (**Figure 31**).

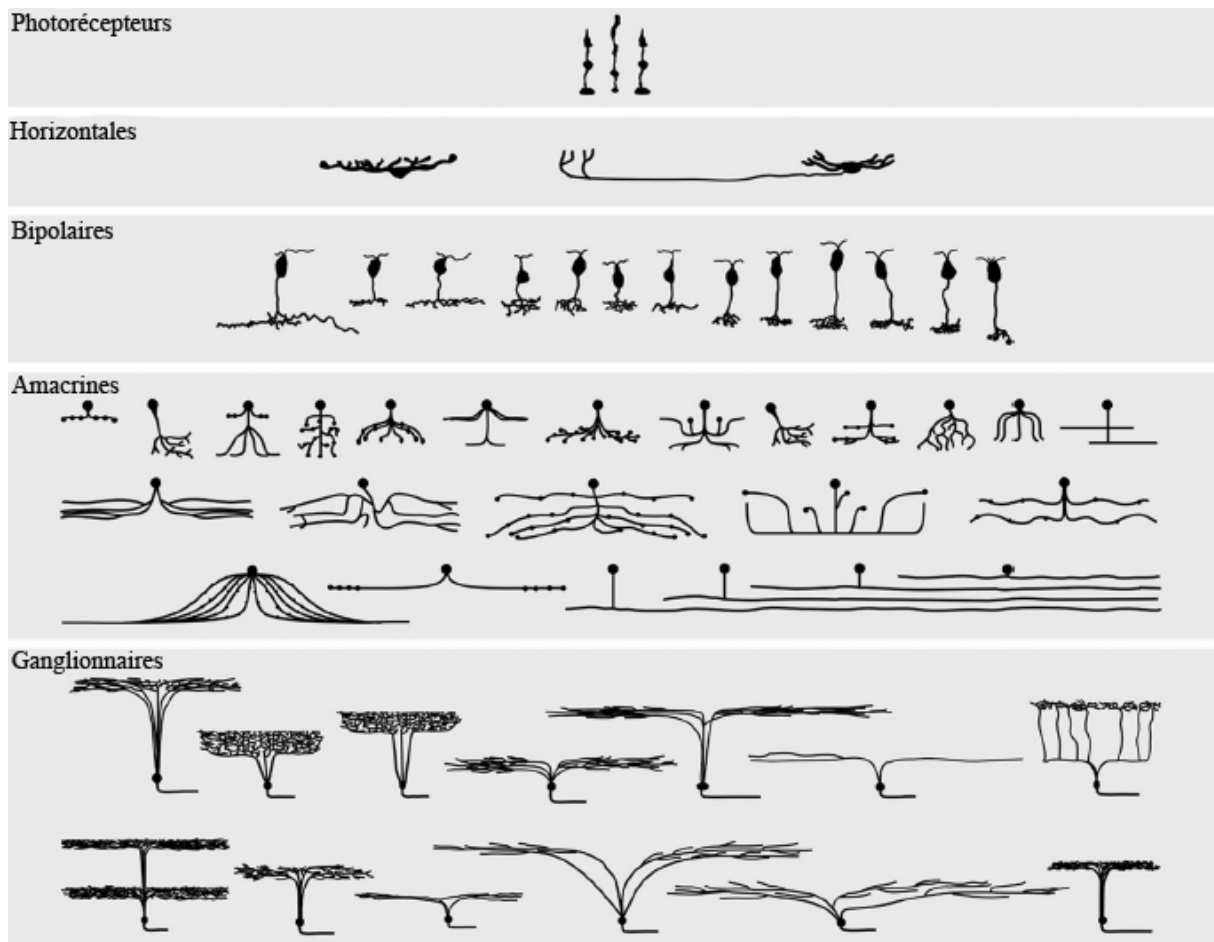


Figure 31 : Les sous-types cellulaires rétiniens. La rétine des mammifères contient plus de 60 sous-types cellulaires de morphologie ou de fonction distincts (Masland, 2001).

Les photorécepteurs sont les neurones les moins diversifiés de la rétine, il existe seulement un type de bâtonnet et deux sous-types différents de cônes connus chez l'homme, classés selon leur sensibilité à la lumière. Le nombre de sous-types de photorécepteurs peut cependant varier selon les espèces (revue dans Kelber et al., 2003). Chez le xénope par exemple, deux sous-types de bâtonnets et trois sous-types de cônes sont présents (Wikovsky, 2000).

Il existe deux sous-types de cellules horizontales au sein de la plupart des rétines de mammifères, H1 et H2. Les cellules H1 établissent des connexions dendritiques avec les cônes mais aussi des connexions axonales avec les bâtonnets. Les cellules H2 établissent des connexions uniquement avec les cônes. Le nombre de sous-types de cellules horizontales peut cependant varier selon les espèces (Tornqvist et al., 1988 ; Ammermuller et al., 1996). Il en existe par exemple trois différents chez le poulet (Genis-Galvez et al., 1981). Ces cellules

modulent le signal nerveux transmis par les photorécepteurs aux cellules bipolaires par la libération de neurotransmetteur inhibiteur comme le GABA (Haverkamp et al., 2000 ; Cueva et al., 2002 ; Jellali et al., 2002).

Les cellules bipolaires renferment quant à elle plus d'une dizaine de sous-types différents et sont spécifiques soit des bâtonnets soit des cônes. A l'inverse des cellules bipolaires à bâtonnets, il existe une dizaine de cellulaires bipolaires spécifiques des cônes dans la rétine des mammifères. Ils peuvent être définis selon le type de connections qu'ils établissent ou leur mode d'activation. Cette classe neurale est donc sous-divisée en cellules bipolaires à bâtonnets, à cônes de type ON et à cônes de type OFF. La transmission du signal diffère en réponse à la lumière, quand les cellules bipolaires à bâtonnet et à cône de type ON se dépolarisent, les cellules bipolaires à cône de type OFF s'hyperpolarisent (Wassle, 2004). Ces cellules utilisent pour une grande partie d'entre elles le glutamate comme neurotransmetteur.

La grande classe des cellules amacrines est la plus diversifiée de la rétine. Il existe un nombre important de sous-types allant d'une trentaine chez les mammifères à plus de 40 chez certaines espèces de poissons (Wagner and Wagner, 1988). Ils varient selon leur taille, leur arborisation dendritique ou leur localisation (**Figure 32**). Ils peuvent être classés selon leurs connexions ou comme nous l'avons vu précédemment sur le type de neurotransmetteurs utilisés tels que l'acétylcholine, la dopamine, la sérotonine, le neuropeptide Y et plus majoritairement le GABA (gamma-aminobutyric acid) et la glycine (Crooks and Kolb, 1992; Kolb et al., 1997; Kolb et al., 2002).

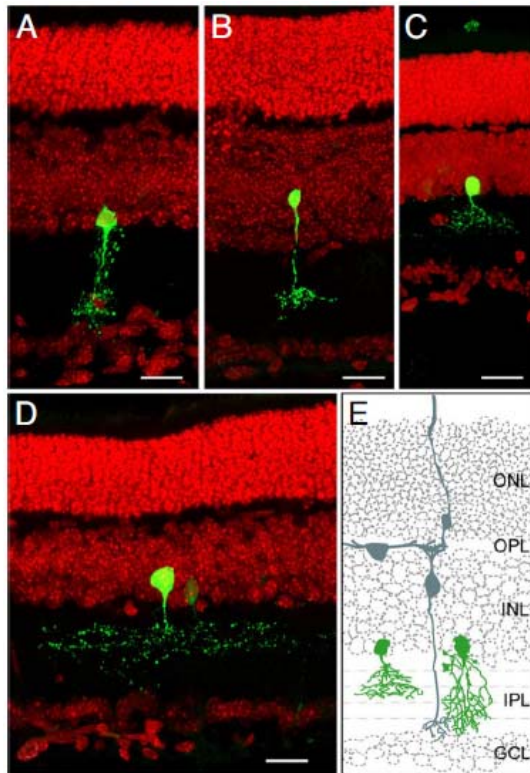


Figure 32 : Exemple de sous-types de cellules amacrines chez la souris. Electroporation d'une construction GFP sous le contrôle d'un promoteur spécifique de toutes les cellules amacrines (vert). (A-D) La position mais surtout les projections axonales de ces cellules différent. (E) Représentation schématique de la morphologie des cellules amacrines observées. Les noyaux des cellules sont marqués au DAPI (rouge) (Cherry et al., 2009).

De nombreux sous-types de cellules ganglionnaires ont été mis en évidence en fonction de différents critères morphologiques ou physiologiques. Il en existe 10 à 15 selon les espèces. Les deux principaux sous-types de cellules ganglionnaires sont de type P (Parvus) et M (Magnus) (Dacey and Lee, 1994; Kaplan et al., 1988). Les majoritaires, les cellules de type P sont de petite taille et semblent responsables de l'information de couleur, de forme et de détail (Kolb and Dekorver, 1991). Les cellules de type M quant à elles sont de plus grande tailles et impliquées dans la détection du mouvement (Watanabe and Rodieck, 1989). En termes de neurotransmetteur, les cellules ganglionnaires utilisent en majorité le glutamate.

3.2. Les facteurs connus dans leur spécification

Nous avons vu que les mécanismes de spécification des grandes classes neurales de la rétine sont multiples et complexes. Cependant, le très grand nombre d'études qui y ont été consacrées permet aujourd'hui d'en comprendre en partie leur fonctionnement. En revanche, les mécanismes moléculaires impliqués dans la spécification des sous-types cellulaires dans la rétine ont été très peu étudiés et sont encore aujourd'hui mal connus.

- La spécification des sous-types de photorécepteurs

Lorsque les progéniteurs sont intrinsèquement biaisés vers un destin cône, d'autres régulateurs entre en jeu pour le choix des sous-types M ou S. En effet, il a été montré que la perte de fonction d'un récepteur nucléaire TR β 2 (*Thyroïde hormone receptor β 2*) provoque une altération spécifique des cellules cônes de type M (Ng et al., 2001 ; Lu et al., 2009). TR β 2 semble donc être un régulateur majeur des cônes M. Il a de plus été mis en évidence que le récepteur nucléaire RXR γ (*nuclear receptor retinoid X receptor- γ*) et les facteurs de transcription COUP-TFs (*COU transcription factors*) interagissent étroitement avec TR β 2 pour réguler la genèse de ces sous-types de cônes (revue dans Swaroop et al., 2010). Des études additionnelles ont montré que l'hormone thyroïdienne triiodothyronine T3 est requise par TR β 2 régulant ainsi son activité au cours du temps (Roberts et al., 2006 ; Pessoa et al., 2008). Il a été décrit que les progéniteurs de cônes se spécifient par défaut en cônes S, les facteurs évoqués précédemment agissent en partie par la répression de ce destin (**Figure 33**). Cependant, l'existence d'une voie par défaut est remise en cause. Il a en effet été montré que la perte de fonction de *Tbx2b* (un facteur de transcription de la famille T-box) provoque un shift des cônes S en bâtonnets (Alvarez-Delfin et al., 2009). Ce facteur favoriserait donc la genèse des sous-types de cônes S par l'inhibition du destin bâtonnets.

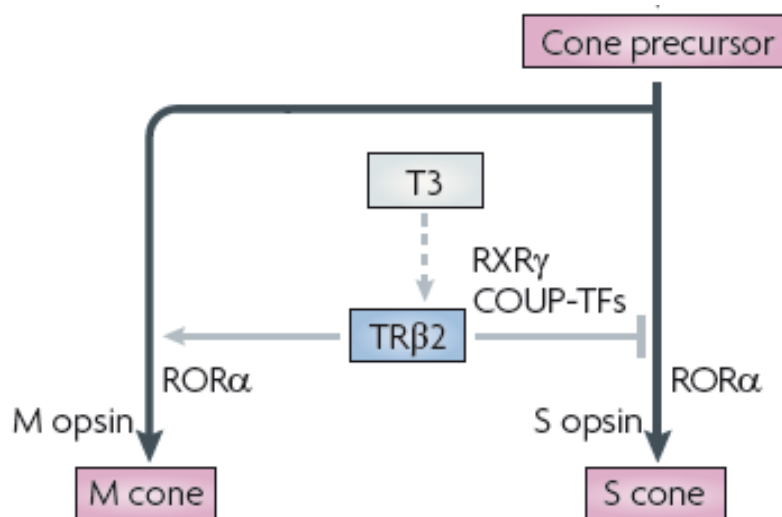


Figure 33 : Spécification des sous-types de cônes M et S. Les gènes TR β 2, RXR γ , COUP-TFs et l'hormone thyroïdienne T3 agissent étroitement pour la spécification des sous-types de cônes M et S (Swaroop et al., 2010).

- La spécification des sous-types bipolaires

Deux facteurs sont connus pour leur rôle dans la détermination des sous-types de cellules bipolaires. *Bhlh4*, un facteur de transcription à domaine bHLH et *Vsx1*, un facteur de transcription à homeodomaine ont en effet été montré comme étant indispensables au développement de sous-types bipolaires à bâtonnet et à cônes, respectivement (Bramblett et al., 2004; Chow et al., 2004).

- La spécification des sous-types d'horizontales et d'amacrines

Deux facteurs de transcription de la famille LIM, Lim1 et Isl1 sont exprimés respectivement dans les sous-type I et II/III des cellules horizontales (Boije et al., 2008 ; Fischer et al., 2007 ; Edqvist and Hallbook, 2004). La surexpression d'Isl1 dans les cellules horizontales en cours de différenciation entraîne une diminution de l'expression de Lim1 et une augmentation du nombre de cellules horizontales de sous-type II. L'inhibition de Lim1 quant à elle perturbe la morphogenèse des cellules de type I. Ces données suggèrent que les facteurs de transcription de la famille LIM sont requis pour la morphogenèse des sous-types de cellules horizontales (**Figure 34**) (Suga et al., 2009). D'après ces résultats, il semble que le choix pour devenir une cellule horizontale de sous-type I ou II se fait tardivement.

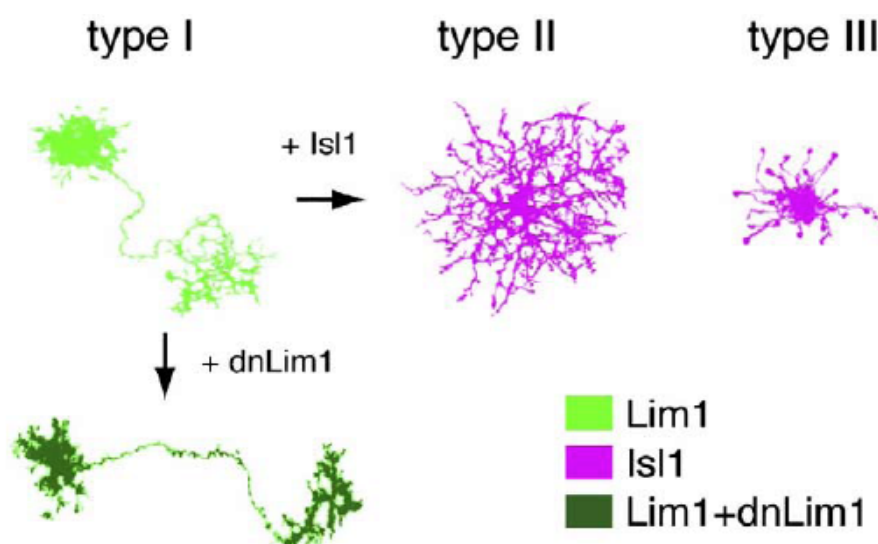


Figure 34 : Les facteurs de la famille LIM impliqués dans la genèse des sous-types de cellules horizontales. La surexpression d'*Isl1* dans les cellules horizontales induit un changement de destinée vers les cellules de sous-types II alors que l'inhibition de *Lim1* par l'utilisation d'un dominant négatif (dnLim1) induit un changement morphologique (Suga et al., 2009).

Chez la souris, le facteur de transcription Barhl2 (*Bar-class homeodomain transcription factor 2*) est exprimé dans les cellules amacrines post-mitotiques. Il a été montré que sa perte de fonction entraîne une diminution de cellules amacrines glycinergiques et GABAergiques et une augmentation des cholinergiques (Ding et al., 2009 ; Mo et al., 2004). De plus la délétion du facteur Bhlhb5 provoque une diminution du nombre de cellules amacrines GABAergiques. Le facteur Isl1 quant à lui conduit les progéniteurs vers une différenciation en cellules amacrines cholinergiques (Feng et al., 2006 ; Elshatory et al., 2007).

L'ensemble de ces données suggère que les facteurs Barhl2, Bhlhb5 et Isl1 sont respectivement requis pour la spécification des cellules amacrines GABAergiques/glycinergiques, GABAergiques et cholinergiques (**Figure 35**).

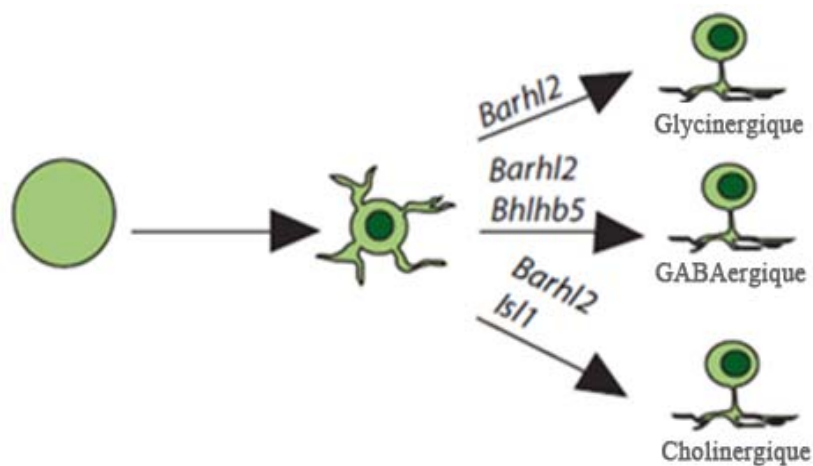


Figure 35 : Contrôle transcriptionnel de la spécification des sous-types de cellules amacrines. Un progéniteur (à gauche) est engagé vers un destin amacrine, les facteurs de transcription Barhl2, Bhlhb5 et Isl1 interviennent pour la spécification d'un ou plusieurs sous-types particuliers (Poche and Reese, 2009).

Les récepteurs nucléaires seraient aussi impliqués dans le processus de spécification de ces sous-types. Le récepteur nucléaire *Nr4a2*, aussi nommé *Nurr1*, est exprimé au cours de la rétino-genèse dans des cellules post-mitotiques GABAergiques. Il a en effet été montré que des rétines de souris mutantes pour ce gène présentent une diminution significative du nombre de cellules amacrines GABAergiques par comparaison à des rétines sauvages. De plus, sa surexpression promeut une destinée GABAergique (Jiang and Xiang, 2009). Ces résultats démontrent que le récepteur nucléaire *Nr4a2* est nécessaire et suffisant pour conférer un

devenir GABAergique aux cellules progénitrices. Une étude a récemment mis en avant le rôle de la signalisation PACAP (*Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*) dans ce processus. Des rétines de rats surexprimant le récepteur de cette voie, *PAC1*, présentent un déficit en cellules amacrines GABAergiques (Lang et al., 2010). Ces données suggèrent que la signalisation PACAP est impliquée dans la genèse de ces cellules.

En 2007, mon laboratoire a mis en évidence que le facteur de transcription *Ptf1a* (*pancreas transcription factor 1a*) qui joue un rôle clé dans le développement du pancréas, favorise une destinée GABAergique au détriment des neurones glutamatergiques dans la rétine. A l'inverse, sa perte de fonction entraîne une augmentation de la production de neurones glutamatergiques au dépend des neurones GABAergiques (Dullin et al., 2007). L'ensemble de ces résultats suggèrent que *Ptf1a* agit dans la rétine comme un facteur GABAergique. Cependant, il a été mis en évidence chez le poisson zèbre que ce facteur est exprimé dans des progéniteurs post-mitotiques qui vont générer tous les sous-types de cellules horizontales et amacrines (Jusuf and Harris, 2009). Des études récentes ont montré que la surexpression de *Ptf1a* promeut la spécification de cellules horizontales et amacrines de sous-type GABAergique mais aussi non-GABAergique (Lelièvre et al., 2011 ; Jusuf et al., 2011). De plus, des expériences de lignages chez le poisson zèbre ont montré que l'origine des différents sous-types de cellules inhibitrices sont générées sous l'influence de *Ptf1a* (Jusuf et al., 2011) (**Figure 36**).

Ptf1a ne jouerait donc pas uniquement dans la spécification des neurones GABAergiques mais apparaît plutôt comme un « commutateur » entre les sous-types inhibiteurs versus excitateurs.

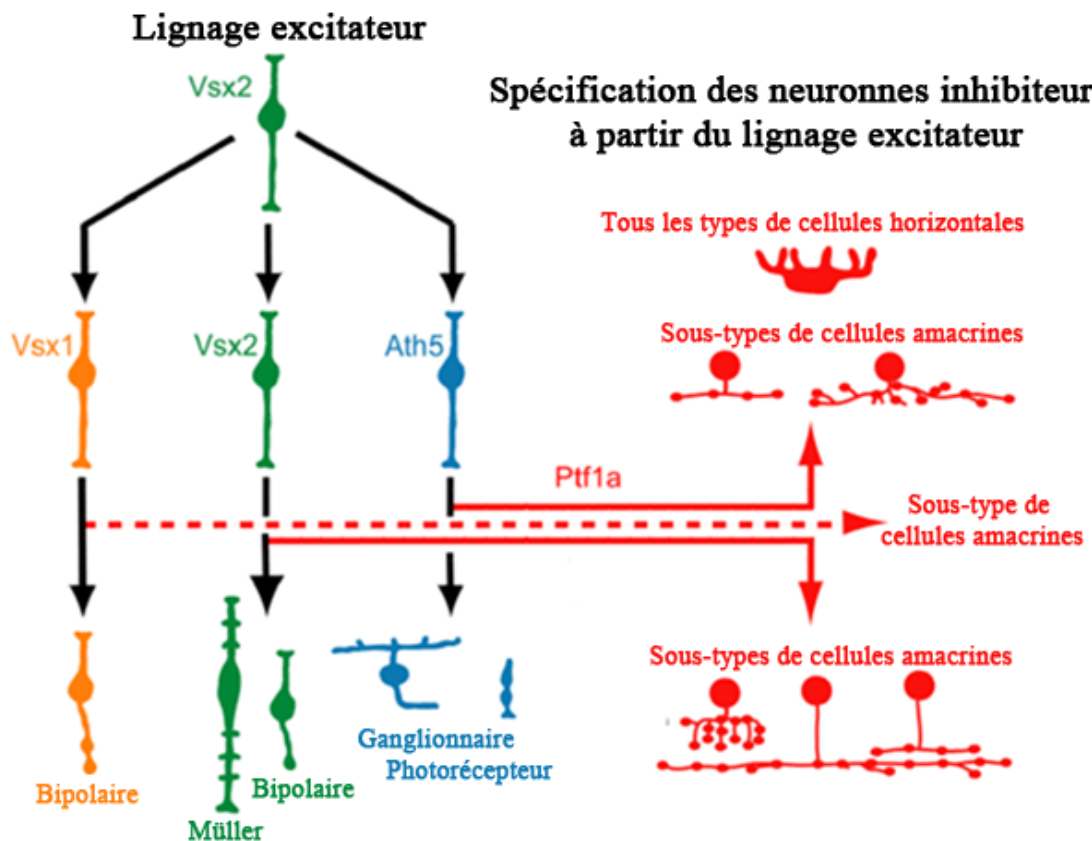


Figure 36 : Proposition d'un modèle de lignages conduisant à la détermination des sous-types neuronaux dans la rétine. Un pool de progéniteurs *Vsx2*⁺ va adopter des destins différents selon l'expression des gènes *Vsx1*, *Vsx2* ou *Atoh7*. Les progéniteurs qui vont maintenir leur niveau d'expression vont adopter un destin excitateur (Bipolaires, Müller, Ganglionnaires et Photorécepteurs). Les neurones inhibiteurs quant à eux, proviennent des progéniteurs *Vsx2*⁺, *Atoh7*⁺ ou hypothétiquement *Vsx1*⁺ (flèches rouges ou flèche rouge en pointillée). Les cellules qui se mettent à exprimer *Ptf1a* n'expriment plus ces facteurs et sont redirigées vers un lignage inhibiteur (adapté de Jusuf et al., 2011).

Enfin, par des expériences de time-laps *in vivo* dans la rétine du poisson zèbre permettant de suivre le programme de spécification des cellules amacrine au sein de progéniteurs *Atoh7*-positif, une étude très récente montre qu'une cellule fille, nièce d'une cellule ganglionnaire issue d'un progéniteur *Atoh7*-positif, est capable de générer des sous-types de cellules amacrine. Ces analyses suggèrent que la genèse de sous-types spécifiques de cellules amacrine peut être contrôlée par un mode de division particulier et une cascade transcriptionnelle impliquant l'expression séquentielle d'*atoh7* suivie de *ptf1a* puis de *Barhl2* (**Figure 37**) (Jusuf et al., 2012).

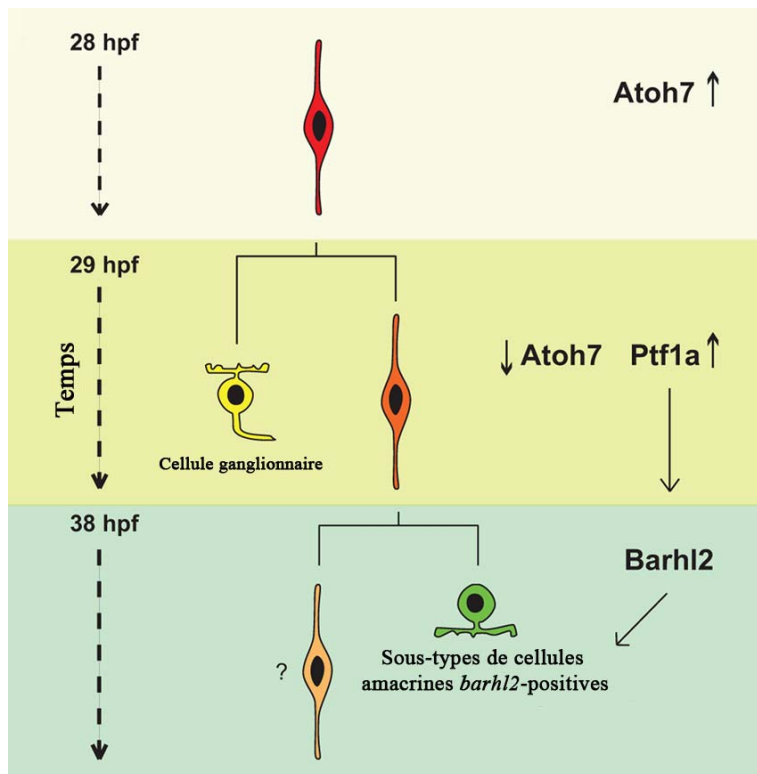


Figure 37 : Les cellules « nièces » de cellules ganglionnaires expriment *Barhl2*.

Expression séquentielle d'*Atoh7*, *Ptf1a* et *Barhl2*. Un progéniteur *Atoh7*-positif (rouge) génère une cellule ganglionnaire (jaune) et un progéniteur exprimant *Ptf1a* (orange). Une des deux cellules nièces de la cellule ganglionnaire (vert) exprime *Barhl2* et générera un sous-type de cellules amacrine (d'après Jusuf et al., 2012).

3.3. Remise en cause du modèle « Stepwise »

Les études précédemment présentées suggèrent que deux étapes d'induction sont nécessaires pour la détermination des photorécepteurs par exemple et de ces sous-types (Harris and Messersmith, 1992). La première induit un état de compétence des progéniteurs pour un photorécepteur générique alors que la seconde les spécifie vers un sous-type particulier. Sur la base de ces observations et d'autres (Bramblett et al., 2004 ; Chow et al., 2004), le modèle fréquemment employé pour expliquer la spécification des sous-types cellulaires rétiens propose que la compétence des progéniteurs est restreinte étape par étape : « Stepwise model ». Dans un premier temps, les progéniteurs sont déterminés vers une classe de neurones puis par la suite, se spécifient pour un sous-type cellulaire particulier (Figure 38).

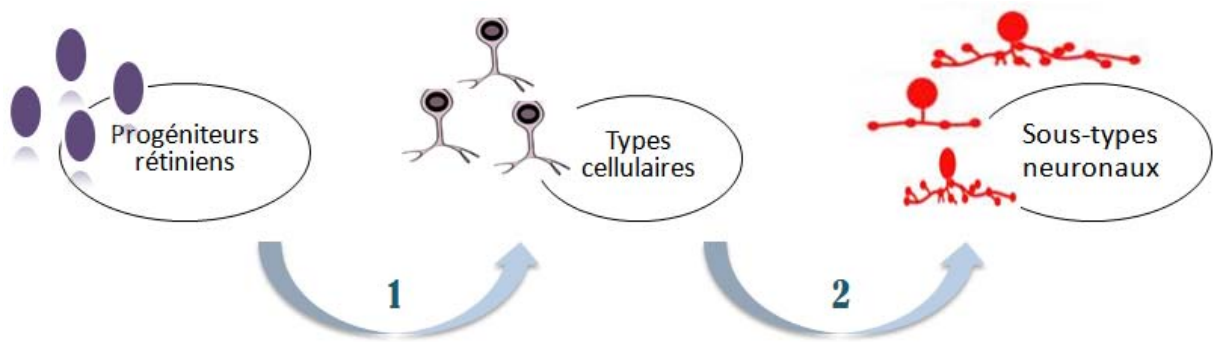


Figure 38 : Le modèle « Stepwise ». (1) Détermination du type cellulaire par une combinaison de facteurs de transcription. (2) Détermination du sous-type cellulaire par une autre combinaison de facteurs.

Cependant, de nouvelles observations suggèrent une alternative à ce modèle. En effet, des expériences de transplantation de blastomères individuels démontrent qu'ils sont intrinsèquement programmés pour produire des sous-types de cellules amacrines dès ce stade (Moody et al., 2000). Par des approches de lignage couplées à des études transcriptomiques, l'équipe de Cepko a pu mettre en évidence que les progéniteurs à l'origine des cellules amacrines présentent des profils d'expression très hétérogènes (Cherry et al., 2009). De plus, des données de lignage *in vivo* montrent que deux cellules filles produites par un progéniteur se différencient en deux sous-types identiques de cellules horizontales (Rompani and Cepko, 2008). Ceci suggère qu'un pool de progéniteur est à l'origine d'un sous-type cellulaire particulier.

L'ensemble de ces résultats n'est donc pas en accord avec le modèle « stepwise » et démontre que les progéniteurs sont très précocement biaisés vers un sous-type cellulaire particulier dans la rétine. La question est maintenant de savoir si l'expression des facteurs de détermination peut définir un lignage restreint aux sous-types rétiniens.

L'objectif est donc d'identifier de nouveaux facteurs de détermination de ces sous-types mais aussi de réévaluer le rôle de facteurs dont les fonctions ont déjà été décrites dans un contexte de spécification des grandes classes neurales. En effet, leur implication éventuelle dans la spécification des sous-types rétiniens n'a souvent pas été recherchée.

3.4. Rôle du gène proneural *Ascl1* dans la spécification des neurones GABAergiques

Ascl1 est depuis longtemps identifié comme facteur proneural, cependant des études plus récentes suggèrent qu'il possède aussi un rôle plus ciblé au cours de la neurogenèse et guiderait plus particulièrement les progéniteurs vers la genèse de certains sous-types cellulaires. Sur la base de ces observations sur lesquelles je reviens dans cette partie, j'ai consacré une grande partie de ma thèse à l'étude du rôle de ce gène candidat dans la spécification des sous-types neuronaux au cours de la rétino-genèse.

Comme il a été mentionné précédemment, le gène *Ascl1* aussi nommé *Mash1* chez la souris ou *Xash1* chez le xénope code pour un facteur de transcription à domaine bHLH. La protéine active la transcription en se liant à l'E-box de site consensus CANNTG. Comme pour l'ensemble de ce type de facteurs, il est capable d'homo ou d'hétérodimérisation.

3.4.1. *Ascl1*, un territoire d'expression complémentaire avec les gènes *Neurogenin*

De nombreuses analyses ont montré que l'expression des gènes *Ascl1* et *Neurogenin* définissent des populations distinctes de progéniteurs au cours du développement du système nerveux (**Figure 39**). Par exemple dans le système nerveux périphérique (Lo et al., 1991 ; Ma et al., 1996 ; Ma et al., 1997 ; Sommer et al., 1996 ; Helms and Johnson, 1998), la moelle épinière (Gowan et al., 2001 ; Lee et al., 1998 ; Guillemot and Joyner, 1993 ; Lo et al., 1991), le cerveau (Guillemot and Joyner, 1993 ; Lo et al., 1991 ; Ma et al., 1997 ; Sommer et al., 1996) ou encore l'épithélium olfactif (Ma et al., 1996).

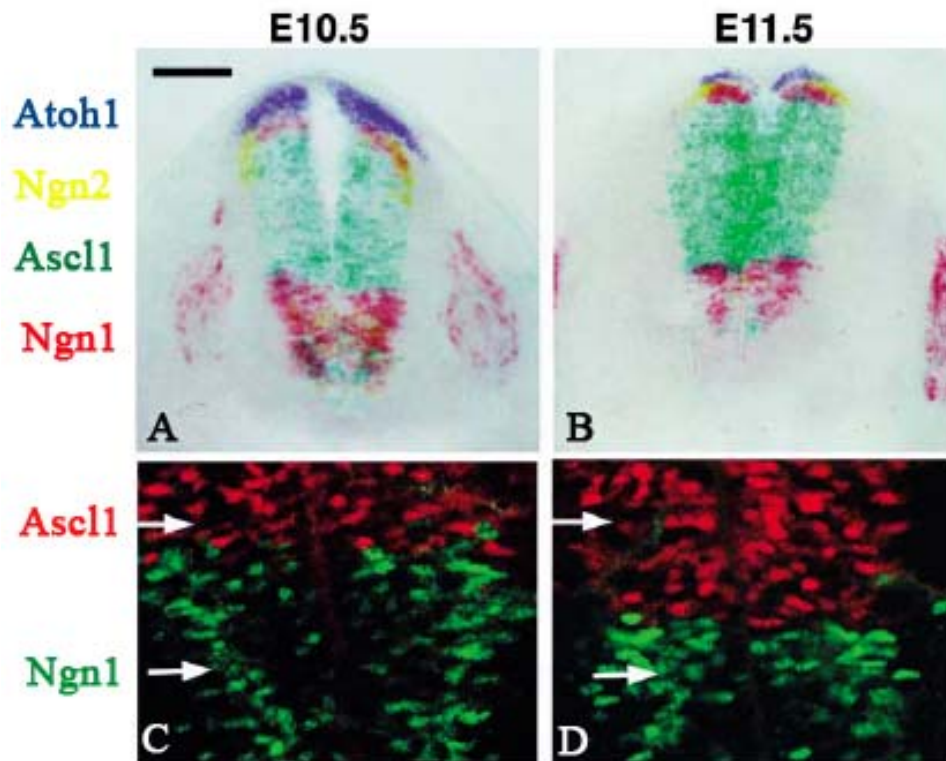


Figure 39 : Des territoires d'expression complémentaires des gènes *Ascl1* et *Neurogenin* dans le tube neural dorsal. Hybridation *in situ* sur une section du tube neural de souris au stade E10.5 (A) et E11.5 (B). (A, B) Les couleurs représentent les territoires d'expression des gènes *Atoh1* (violet), *Ngn1* (rouge), *Ngn2* (jaune) et *Ascl1* (vert). (C, D) Immuno-marquage des protéines *Ascl1* (rouge) et *Ngn1* (vert). L'absence de cellules jaune dans la frontière dorsale du tube neural montre que les progéniteurs expriment seulement un de ces deux gènes. La barre d'échelle en A représente 150µm (Adapté de Gowan et al., 2001).

Des études plus récentes ont cependant mis en évidence qu'il existe des régions dans lesquelles quelques cellules co-expriment les gènes *Ascl1* et *Neurogenin*. Dans le tube neural dorsal par exemple, leurs territoires d'expression sont très proches mais semble exclusifs. Cependant, des analyses plus précises par immuno-marquage ont révélé qu'un petit nombre de cellules de cette zone co-exprime ces deux facteurs (**Figure 40**) (Helms et al., 2005). D'autres régions ont été décrites pour renfermer des cellules co-exprimant *Ascl1* et *Neurogenin* telles que dans l'épithélium olfactif ou le mésencéphale ventrale (Cau et al., 2002 ; Zordan et al., 2008).

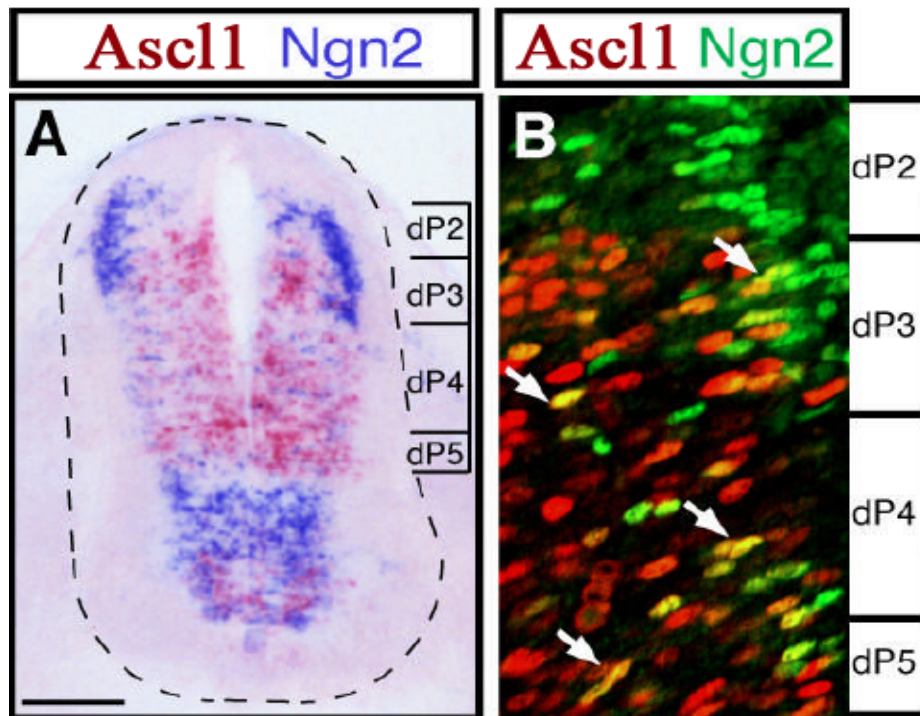


Figure 40 : Co-localisation des gènes *Ascl1* et *Neurog2* dans la zone ventriculaire du tube neural dorsal. Hybridation *in situ* (A) ou immuno-marquage (B) sur des coupes transversales d'embryons de souris au stade E10.5. (A) Expression dorsoventrale d'*Ascl1* (rouge) et *Neurog2* (bleu) et un possible chevauchement. (B) Le double immuno-marquage d'*Ascl1* (rouge) et *Neurog2* (vert) met en évidence une co-localisation dans certaines cellules (jaune, fléchées ; dP2/3/4/5 sont les futurs inter-neurones) (adapté d'Helms et al., 2005).

Concernant la rétine, ces gènes sont tous deux exprimés dans les progéniteurs au cours de la rétinogénèse. Comme dans le tube neural, ils marquent des sous populations distinctes de progéniteurs mais sont aussi co-exprimés dans quelques rares cellules (**Figure 41**) (Jasoni and Reh, 1996 ; Jasoni et al., 1994 ; Marquardt et al., 2001 ; Brezinski et al., 2011).

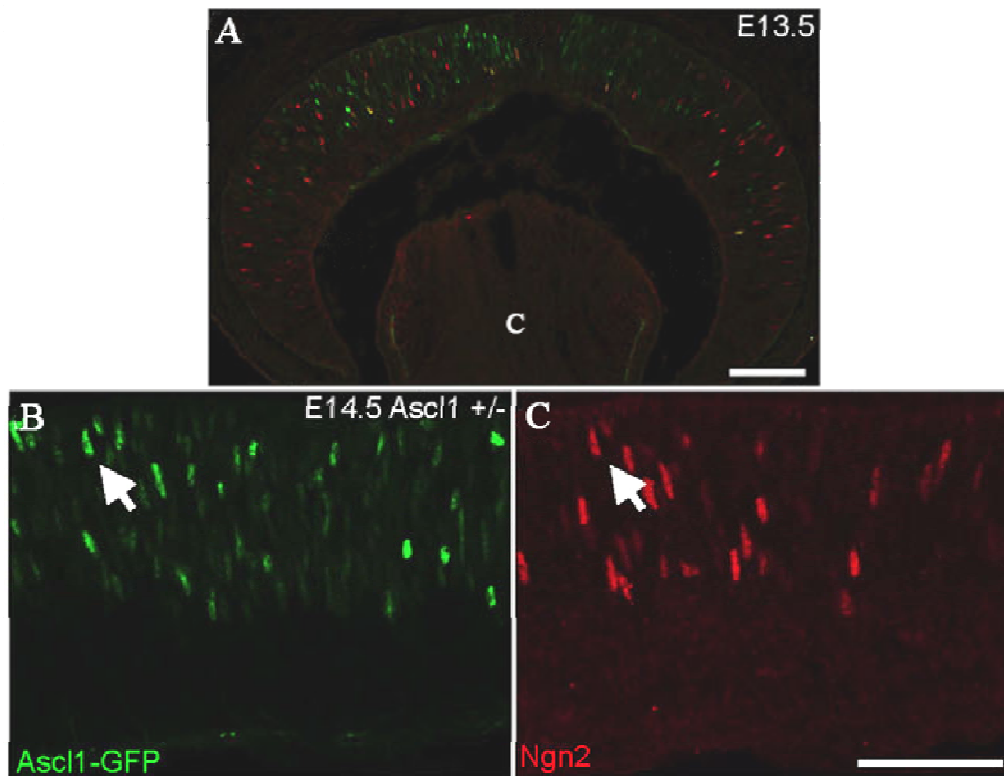


Figure 41 : Expression des gènes *Ascl1* et *Neurog2* dans les progéniteurs rétiniens de souris. Coupes de rétines de souris transgéniques exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur d'*Ascl1* (vert). Immuno-marquage contre la protéine Neurog2 (rouge). (A) La majorité des progéniteurs expriment *Ascl1* ou *Neurog2*. (B-C) Quelques progéniteurs expriment à la fois *Ascl1* et *Neurog2* (flèches). Barre d'échelle 100µm (A), 50µm (B-C) ; L, cristallin (d'après Brzezinski et al., 2011).

Bien qu'ils soient co-exprimés dans de rares cellules, l'ensemble de ces analyses comparatives suggère que les gènes *Ascl1* et *Neurogenin* sont impliqués dans la spécification de types ou sous-types neuraux différents au cours de la neurogenèse.

3.4.2. Rôle d'*Ascl1* et *Neurog2* dans la spécification des sous-types GABAergiques et glutamatergiques

De nombreuses études ont montré qu'*Ascl1* et *Neurog2* sont respectivement des facteurs clés dans la spécification des neurones GABAergiques et glutamatergiques lors du développement corticale (Casarosa et al., 1999 ; Fode et al., 2000 ; Jo et al., 2007 ; Parras et al., 2002 ; Schuurmans et al., 2004 ; Wilson and Rubenstein, 2000). Par exemple, des expériences de gain de fonction ont montré qu'*Ascl1* est capable d'induire l'expression de

marqueurs de neurones GABAergiques dans le cortex cérébral (Fode et al., 2000). Il a de plus été démontré qu'il est suffisant pour la genèse de neurones GABAergiques dans des progéniteurs corticaux (Roybon et al., 2010). Par l'utilisation de souris mutantes, il a été mis en évidence que le facteur *Neurog2* est requis pour la spécification des neurones glutamatergiques et réprime simultanément un destin GABAergique dans le cortex (Schuurmans et al., 2004). L'ensemble de ces données suggère que ces deux facteurs possèdent des fonctions opposées.

3.4.2.1. *Les interactions entre *Ascl1* et *Neurog2**

La répression d'*Ascl1* dans le cortex est requise pour prévenir la formation des neurones GABAergiques. Cette répression a été attribuée au gène *Neurog2*. En effet, lorsque ce dernier est délété, ceci conduit à une dé-répression d'*Ascl1* et à la formation de neurones GABAergiques ectopiques dans le cortex (Fode et al., 2000 ; Helms et al., 2005). Des expériences ont montré que la cascade de transcription initiée par *Neurog2* implique les facteurs *NeuroD1* ou *NeuroD2* et conduit à un phénotype glutamatergique (Englund et al., 2005 ; Hevner et al., 2006). Au contraire, la spécification GABAergique est contrôlée par *Ascl1* et d'autres facteurs à homeodomaine comme *Dlx1* et *Dlx2* (Petryniak et al., 2007 ; Long et al., 2009). Dans une étude récente, les auteurs suggèrent qu'il existe des mécanismes de compensation et de régulation croisée entre ces facteurs. En effet, ils ont pu démontrer que la spécification des neurones GABAergiques est inhibée par les facteurs *Neurog2*, *NeuroD1* et *NeuroD2* (**Figure 42**) (Roybon et al., 2010).

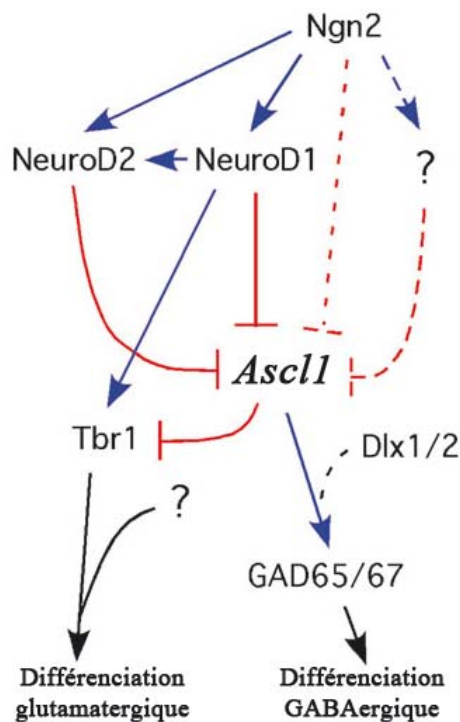


Figure 42 : Cascade de régulation impliquée dans la genèse des neurones GABAergiques et glutamatergiques. Neurog2, NeuroD1 et NeuroD2 inhibent la différenciation GABAergiques par la répression du facteur *Ascl1* (Roybon et al., 2010).

Comme pour la spécification des grandes classes neuronales, il semble que les facteurs de détermination sont capables de multiples interactions et agissent en cascade pour générer l'ensemble des sous-types neuronaux.

3.4.2.2. *L'influence du contexte*

Ces facteurs sont de plus fortement influencés par le contexte (revue dans Bertrand et al., 2002). Leur rôle dans la spécification des sous-types semble en effet dépendant du temps et du tissu. Dans la moelle épinière par exemple, *Ascl1* guide les progéniteurs neuraux tardifs vers un destin GABAergique. En revanche, à des phases plus précoces de la neurogenèse, ils les biaisent préférentiellement vers un destin glutamatergique (Mizuguchi et al., 2006). De plus, des expériences *in vitro* ont montré que la surexpression d'*Ascl1* dans des progéniteurs issus du cerveau antérieur ou de la moelle épinière et du rhombencéphale conduit respectivement à une sur production ou une diminution du nombre de cellules GABAergiques (Jo et al., 2007). Enfin, une étude plus récente montre que pour une même population, certains

progéniteurs requièrent la présence d'*Ascl1* pour leur spécification en neurones GABAergiques alors que d'autres non (Peltopuro et al., 2010).

3.4.3. *Ascl1* est aussi impliqué dans la spécification d'autres sous-types cellulaires

Le rôle d'*Ascl1* dans la spécification des sous-types neuraux n'est pas encore clair. En plus de promouvoir un destin GABAergique, des analyses supplémentaires suggèrent qu'il est impliqué dans la spécification d'autres neurotransmetteurs. Il a en particulier été mis en évidence qu'il est requis pour la genèse des neurones sérotoninergiques dans le cerveau postérieur (Pattyn et al., 2004) mais aussi pour le développement des neurones noradrénergiques (Goridis and Rohrer, 2002 ; Hirsch et al., 1998 ; Howard, 2005). Il a de plus été montré qu'*Ascl1* est à l'origine de la formation d'une population antero-ventrale de neurones noradrénergiques nouvellement identifiée chez le xénope (Parlier et al., 2008). Enfin, une étude a révélé son implication dans la différenciation de neurones dopaminergiques (Park et al., 2006).

Son implication dans la genèse de ces neurotransmetteurs et dans différentes régions du système nerveux confirme que sa fonction est fortement dépendante du contexte. C'est pourquoi, identifier son rôle dans d'autres régions du système nerveux comme dans la rétine pourrait contribuer à une meilleure compréhension des raisons pour lesquelles ils possèdent ces fonctions divergentes.

3.4.4. Rôle dans la rétinogenèse

3.4.4.2. *Rôle dans le choix du destin neuronal*

Nous avons vu qu'*Ascl1* est exprimé dans les progéniteurs rétiniens de nombreux vertébrés (Ferreiro et al., 1993 ; Jasoni and Reh, 1996 ; Jasoni et al., 1994). Les premiers résultats de perte de fonction ont montré qu'il est requis pour la genèse des cellules bipolaires (Perron et al., 1999 ; revue dans Vetter and Brown, 2001) et les approches de gain de fonction ont mis en évidence qu'il induit une augmentation du nombre de photorécepteurs

(Hatakeyama et al., 2001). Cependant, ces expériences de perte et de gain de fonction n'ont pas été réalisées au début de la rétino-genèse mais à des stades où ces types cellulaires naissent normalement. En revanche, lorsque l'expression d'*Ascl1* est perturbée dès les tous premiers stades du développement de la rétine, les résultats suggèrent qu'il régule la production de neurones au détriment des cellules gliales. (Nelson et al., 2009 ; Tomita et al., 2000 ; Tomita et al., 1996). Ces données suggèrent donc qu'*Ascl1* jouerait un rôle proneural au cours de la rétino-genèse. Cependant, étant donné son rôle plus spécifique dans la genèse des sous-types cellulaires dans d'autres régions du système nerveux, il est possible que son rôle dans la rétine ne se limite pas à un effet proneural.

3.4.4.1. *Etudes de lignages*

Des études ont montré qu'*Ascl1* ne s'exprime que dans une sous-population de progéniteurs rétiniens (Jasoni and Reh, 1996 ; Jasoni et al., 1994 ; Marquardt et al., 2001). Afin d'examiner si l'expression d'*Ascl1* pourrait définir un lignage particulier, une équipe a récemment suivi son expression dans des progéniteurs rétiniens et leur descendance. Ces données mettent en évidence que la sous-population de progéniteurs définie par *Ascl1* ne se différencie qu'en certains types cellulaires rétiniens excluant les cellules ganglionnaires (**Figure 43**) (Brzezinski et al., 2011). En plus des données dans le système nerveux central et périphérique, ces résultats suggèrent qu'*Ascl1* pourrait aussi avoir un rôle plus spécialisé qu'un « simple gène proneural » dans la spécification de sous-types rétiniens particuliers.

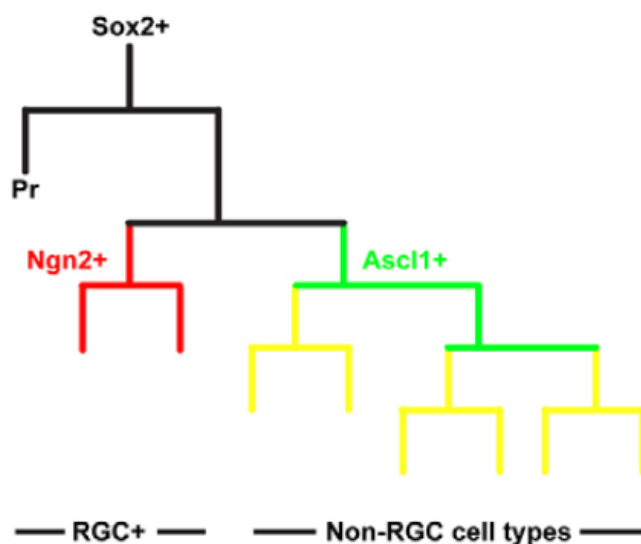


Figure 43 : Un modèle de lignage des progéniteurs Ngn2+ et Ascl1+. Les progéniteurs (Pr) Sox2+ n'expriment ni *Ascl1* ni *Ngn2* peuvent adopter tous les destins cellulaires. En revanche, les progéniteurs Ascl1+ (vert) génèrent une fraction de tous les types cellulaires à l'exception des cellules ganglionnaires définissant donc un lignage à compétence restreinte. Les progéniteurs Ngn2+ (rouge) peuvent adopter tous les destins cellulaires y compris celui des cellules ganglionnaires (Brzezinski et al., 2011).

L'ensemble de ces données montre que le rôle d'Ascl1 au cours du développement de la rétine est loin d'être clair. C'est pourquoi je me suis intéressé pour une grande partie de ma thèse à l'étude de ce facteur de transcription et en particulier à son implication potentielle dans la spécification des sous-types de neurones au cours de la rétino-genèse. Les résultats obtenus à l'issue de cette étude sont décrits dans la partie 1.1 des résultats.

4. La neurogenèse adulte

Au cours de ma thèse, j'ai participé à l'écriture d'une revue publiée dans *Archives of Italian Biology* en 2010 dont la majeure partie des données présentées dans ce chapitre en sont extraites : A decade of mammalian retinal stem cell research : M. Locker, W. El Yakoubi, N. Mazurier, J-P. Dullin, M. Perron (Annexe 1).

4.1. La zone marginale ciliaire des vertébrés

Chez les mammifères, la mise en place des deux composants fonctionnels de la rétine, l'EPR et la rétine neurale, s'achève peu après la période post-natale. Par la suite, aucune nouvelle cellule rétinienne ne sera produite. Sur la base de cette caractéristique et l'absence de réparation tissulaire après lésion, l'œil adulte de mammifère était considéré comme dépourvu de cellules souches rétiniennes (CSR).

Chez les poissons et les amphibiens en revanche, la rétine continue de croître tout au long de la vie de l'animal et est capable de régénération après lésion (Reh and Constantine-Paton, 1983 ; Yoshii et al., 2007). De nouvelles cellules sont en effet produites à partir d'un pool de cellules multipotentes possédant des propriétés d'auto-renouvellement (Centanin et al., 2011). Ces cellules sont localisées dans la région périphérique de la rétine appelée la Zone Marginale Ciliaire (ZMC). La ZMC possède une organisation spatiale reflétant les étapes de la rétinogenèse embryonnaire (Wetts and Fraser, 1988; Wetts et al., 1989; Perron et al., 1998). On retrouve des CSR à l'extrême périphérie, suivies de progéniteurs en prolifération puis de cellules post-mitotiques en cours de différenciation (**Figure 44**).

J'emploierai pour la suite les termes de **cellules souches rétiniennes** en référence à leur potentiel (comme chez l'homme) ou leur capacité d'auto-renouvellement et de multipotence ; de **progéniteurs** qui désignent la descendance plus engagée et enfin de **précurseurs** qui sera utilisé comme terme générique pour désigner à la fois les cellules souches et progénitrices rétiniennes.

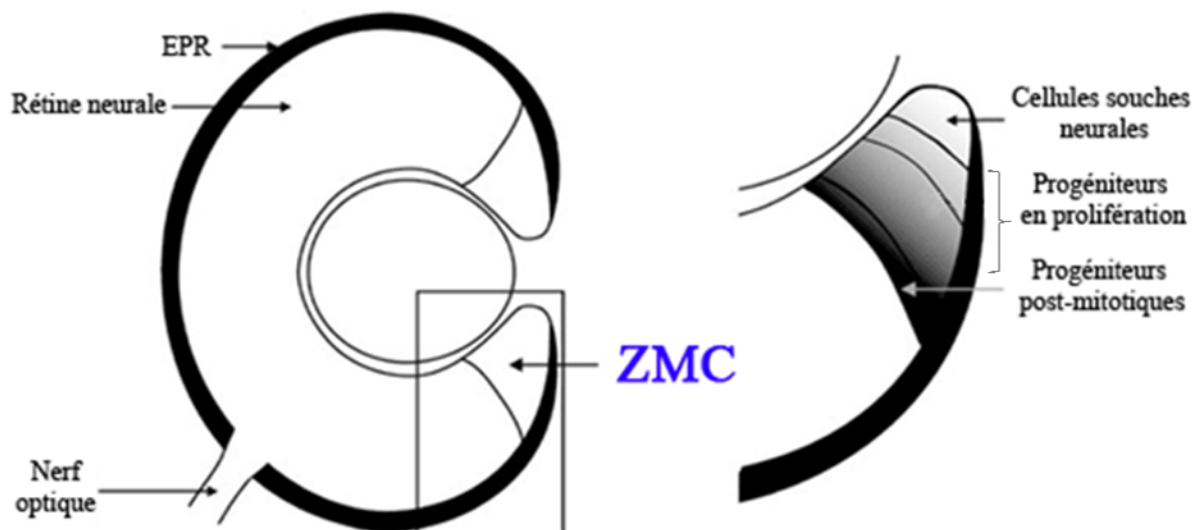


Figure 44 : Structure de la Zone Marginale Ciliaire (ZMC) du xénope. Schéma d'une coupe transversale de rétine de xénope avec un agrandissement de la zone marginale ciliaire (ZMC) où se déroule la neurogenèse post-embryonnaire. L'organisation spatiale de la ZMC récapitule les différentes étapes de la rétino-genèse. Les cellules souches neurales sont localisées dans la région la plus périphérique, les cellules progénitrices en prolifération dans la région médiane et les progéniteurs post-mitotiques dans la région la plus centrale. Cette organisation permet de discriminer spatialement les cellules souches neurales des cellules progénitrices (D'après Perron et al., 1998).

Des études comparatives de la ZMC de différents vertébrés laissent supposer qu'elle serait progressivement réduite au cours de l'évolution (Perron and Harris, 2000; Kubota et al., 2002). Par exemple, la rétine du jeune poulet contient à sa périphérie une zone de prolifération similaire à la ZMC mais l'activité des cellules qu'elle contient n'est que transitoire et le potentiel neurogénique limité contrairement aux cellules de la ZMC des poissons et des amphibiens (Fisher and Reh, 2000). Chez les mammifères, seul le nouveau né du marsupial présente une région rétinienne équivalente à la CMZ possédant quelques cellules en mitose.

4.2. Découverte des cellules souches neurales chez les mammifères

En 2000, l'hypothèse que le corps ciliaire (région située entre la rétine neurale et l'iris) des mammifères pourrait contenir des CSR a été soulevée. Cette structure, localisée entre la rétine neurale et l'iris, est composée de muscles ciliaires et d'un épithélium ciliaire constitué de deux couches : une couche interne non pigmentée et une couche externe pigmentée

(Figure 45). Bien que l'épithélium ciliaire ne contienne aucun neurone, il partage une origine commune avec la vésicule optique. Deux équipes indépendantes ont démontré que des cellules extraites de la partie pigmentée de l'épithélium ciliaire d'une rétine de souris pouvaient proliférer *in vitro* de façon clonale et former des colonies sphériques (Ahmad et al., 2000; Tropepe et al., 2000). Un petit nombre de cellules pigmentées issues de ces cultures primaires génèrent des sphères secondaires indiquant une capacité d'auto-renouvellement. De plus, mises dans des conditions de différenciation, ces cellules expriment des gènes spécifiques des photorécepteurs, de neurones bipolaires ou de cellules de Müller, suggérant leur multi potentialité. L'idée que l'épithélium ciliaire de l'œil adulte de mammifère abrite une population de CSR est donc née. Quelques années plus tard, ce type de cellules a été identifié dans le corps ciliaire d'autres espèces de mammifères, y compris l'homme (Coles et al., 2004; Gu et al., 2007; Mayer et al., 2005; Xu et al., 2007). En revanche, en conditions physiologiques chez les mammifères, les CSR sont quiescentes et n'ont pas d'activité neurogénique *in vivo*.

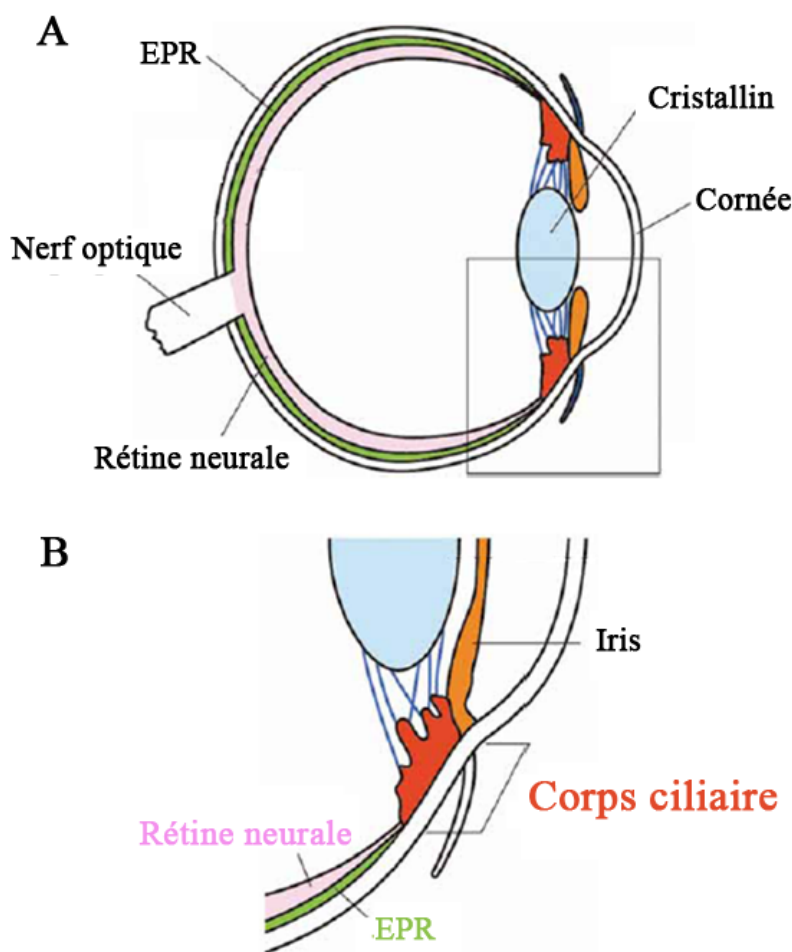


Figure 45 :
Localisation des
cellules souches
neurales dans l'œil
adulte de
mammifère. (A)
 Représentation
 schématique d'une
 section sagittale de
 l'œil adulte. (B)
 Agrandissement de la
 région encadrée en
 (A). Les cellules
 souches/progénitrices
 sont présentes dans
 le corps ciliaire (en
 rouge) (Adapté de
 Osakada et al.,
 2009).

4.3. Remise en question de l'existence des cellules souches neurales de la rétine

Nous venons de voir que les cellules pigmentées de l'épithélium ciliaire peuvent générer des sphères de façon clonale et exprimer des marqueurs de neurones rétiniens. Sur la base de ces propriétés, ces cellules ont été qualifiées de CSR. Cependant, il a récemment été proposé qu'il s'agirait plutôt de cellules pigmentées différenciées (Moe et al., 2009), présentant des caractéristiques de cellules pigmentées classiques et, par ailleurs, une capacité de reprogrammation *in vitro* (Cicero et al., 2009 ; Gualdoni et al., 2011). Ainsi, bien que l'appellation « souche » soit controversée, il reste néanmoins incontestable que ces cellules sont capables d'auto renouvellement, de proliférer et de générer différents types cellulaires *in vitro*. Une étude très récente propose que les CSR de l'épithélium ciliaire sont une source pour la production de photorécepteurs (Clarke et al., 2012).

Le concept du caractère « souche » a donc beaucoup évolué depuis ces dernières années et fait encore débat aujourd'hui (Seaberg and van der Kooy, 2003). Que ces cellules soient qualifiées de « souches » ou non, il est clair qu'elles peuvent constituer une source pour remédier aux dégénérescences rétiniennes.

4.4. D'autres sources potentielles de cellules souches neurales

De potentielles CSR ont été découvertes dans l'iris. Tout comme le corps ciliaire, ce tissu dérivant de la cupule optique ne génère pas de neurones *in vivo*. Cependant, l'équipe d'Haruta en 2001 révèle que les cellules de l'iris sont capables d'exprimer des marqueurs neuronaux *in vitro* démontrant une remarquable plasticité (Haruta et al., 2001). D'autres travaux proposent que ce tissu pourrait renfermer une petite population de cellules dotées de propriétés semblables à celles de cellules souches ou progénitrices, incluant la capacité de se différencier en neurones rétiniens (Akagi et al., 2004 ; Asami et al., 2007; MacNeil et al., 2007).

Les cellules gliales de Müller pourraient aussi représenter une source potentielle de cellules souches de la rétine des mammifères (Karl and Reh, 2010; Lamba et al., 2008; Locker et al., 2009). En effet, il a été mis en évidence par des expériences menées *in vitro* et *in vivo* que ces cellules possèdent des propriétés de multipotence et d'auto-renouvellement (Das et

al., 2006 ; Monnin et al., 2007). De plus, un potentiel régénératif des cellules de Müller a été observé chez le poisson zèbre, le poulet et les rongeurs mais reste limitée puisqu'elles ne sont pas capables de générer tous les types cellulaires (Fausett et al., 2006 ; Ooto et al., 2004 ; Wan et al., 2008). Des études complémentaires *in vitro* ont montré que la surexpression de facteurs intrinsèques ou le traitement par des facteurs solubles des cellules de Müller permet de générer des types cellulaires spécifiques (Osakada et al., 2007 ; Karl., 2007). Ceci suggère que les cellules de Müller pourraient être stimulées *in vivo* pour la production de types cellulaires rétinien.

4.5. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la maintenance et la prolifération des cellules souches rétinien

4.5.1. Les facteurs extrinsèques

4.5.1.1. *Les facteurs de croissance*

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence que les facteurs de croissance sont impliqués dans le contrôle de l'activité des CSR. En effet, il a été montré que la prolifération des CSR de la rétine du poisson rouge adulte ou du jeune poulet augmente en réponse à l'injection intraoculaire de différents facteurs de croissance tels que l'EGF et l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) (Fisher and Reh, 2000 ; Boucher and Hitchcock, 1998; Fischer et al., 2003). D'autre part, dans l'épithélium du corps ciliaire de poulet, l'EGF et le FGF2 stimulent la prolifération mais aussi la neurogenèse (Fischer and Reh, 2003). La réponse à ces deux facteurs de croissance diffère selon les zones du corps ciliaire suggérant une régionalisation de ce tissu (Fischer and Reh, 2003). Cependant, nous ignorons si ceci reflète la présence de différentes populations de CSR.

Chez les mammifères, la signalisation FGF peut induire la prolifération d'une population de cellules quiescentes du corps ciliaire (Abdouh and Bernier, 2006). Bien que ces cellules réactivées possèdent des caractéristiques neuroépithéliales (marquées par l'expression de *Chx10*, *Pax6* et *Nestin*), elles ne peuvent cependant pas générer de neurones. Il a alors été proposé que l'activité de ces cellules serait limitée par des facteurs intrinsèques ou la perte de certains facteurs dans leur microenvironnement. De récentes données obtenues *in vivo*

suggèrent que cet état de quiescence serait dû à une régulation négative de la signalisation EGF. En effet, une diminution significative du nombre de cellules prolifératives a été observée dans la zone périphérique de la rétine de rat déficients pour le récepteur EGF, au stade post-natal (Close et al., 2006). Des facteurs extrinsèques inhibiteurs peuvent aussi être responsables de la suppression de la prolifération et du potentiel neurogénique des CSR adultes *in vivo*. En effet, l'addition de TGF β 1/2 à des explants de rétine de rat inhibe la prolifération dans le corps ciliaire. A l'inverse, l'inhibition de la voie de signalisation TGF β maintient les cellules du corps ciliaire dans un état prolifératif (Close et al., 2005). Ces résultats suggèrent que la signalisation TGF β possède un effet anti-prolifératif.

Nous avons vu que lorsque les cellules du corps ciliaire sont mis en culture *in vitro*, elles sont capables de proliférer et de former des neurosphères (Tropepe et al., 2000). Ceci est probablement rendu possible par l'élimination des facteurs exogènes présents *in vivo*.

D'autres facteurs extrinsèques tels que les ligands des voies de signalisation cellulaire Hedgehog, Wnt et Notch ont été identifiés dans le réseau de signalisation régulant la prolifération des CSN adultes.

4.5.1.2. *La voie Hedgehog*

Outre son importance dans le développement embryonnaire de l'œil, la voie Hedgehog (**Figure 46**) est aussi impliquée dans le contrôle de l'activité des CSR. En effet, chez le jeune poulet et le têtard de xénope, la surexpression de Shh stimule la prolifération des cellules de la ZMC. A l'inverse, l'application de cyclopamine, un antagoniste du récepteur Smoothened, provoque un effet opposé (Locker et al., 2006; Moshiri et al., 2005). Cependant, il a récemment été montré que selon le temps d'inhibition de la voie, des effets opposés sur la prolifération pouvaient avoir lieu (Borday et al., 2012). Ceci est probablement dû aux effets de cette signalisation sur la cinétique du cycle cellulaire mais aussi sur la sortie du cycle des progéniteurs rétinien, occasionnant à la fois une augmentation de la prolifération et de la différenciation (Locker et al., 2006; Agathocleous et al., 2007). Le rôle de la voie de signalisation Hedgehog dans la régulation *in vivo* de la prolifération des cellules souches rétinien adultes a aussi été mis en évidence chez les mammifères. En effet, des souris ne

possédant qu'un seul allèle fonctionnel du récepteur d'Hedgehog, Patched, pour lesquelles la voie est donc constitutivement activée, présentent des cellules progénitrices persistantes dans la région périphérique de leur rétine (Moshiri and Reh, 2004).

Concernant le potentiel « souche » des cellules de Müller, une étude a proposé que cette voie régulerait la prolifération des cellules de Müller et redirigerait les progéniteurs dérivés de ces cellules vers un destin photorécepteurs (Wan et al., 2007).

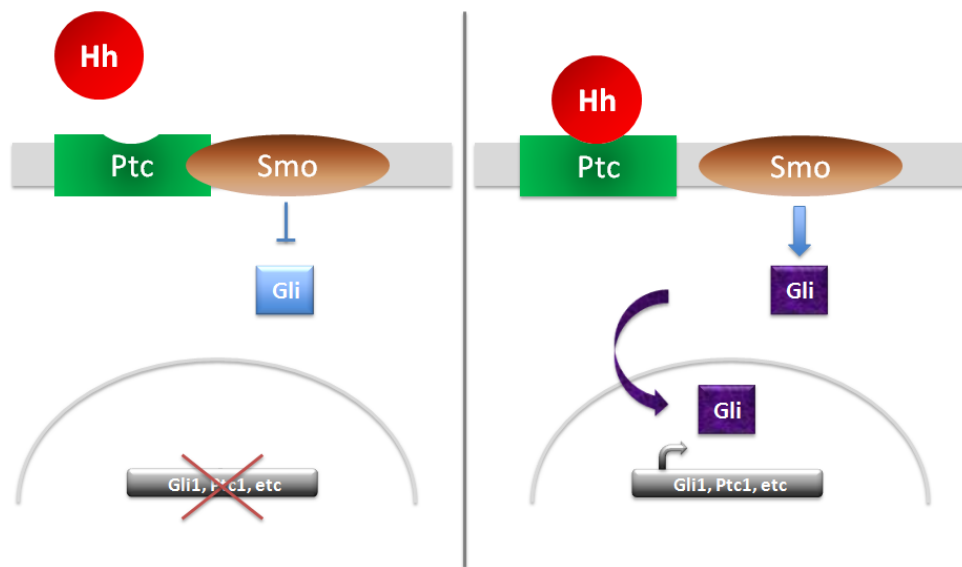


Figure 46 : La voie de signalisation Hedgehog. En l'absence du ligand Shh (Sonic hedgehog), Ptc1 (Patched1) inhibe le co-récepteur Smo (Smoothened) conduisant à l'inhibition de la cascade de transduction. Les protéines Gli sont phosphorylées par PKA (proteine kinase A), menant à un clivage du complexe par le protéasome et la formation de protéines Gli répressives (bleu). Lorsque Shh lie le récepteur Ptc1-Smo, des formes activatrices de Gli sont produites (violet). Ces dernières migrent dans le noyau et activent la transcription de leurs gènes cibles (d'après Palma and Dahmane, 2002).

4.5.1.3. La voie Wnt

La voie Wnt régule beaucoup d'aspects du comportement cellulaire incluant la prolifération (Logan and Nusse, 2004; Amerongen and Nusse, 2009). La voie canonique Wnt (**Figure 47**) est active dans la région périphérique de la rétine embryonnaire et adulte du poisson zèbre, du xénope, du poulet et de la souris (Denayer et al., 2008; Kubo and Nakagawa, 2008). Ceci suggère son implication dans la régulation du comportement des CSR

adultes. En effet, la prolifération des cellules progénitrices de la ZMC du poulet augmente en présence de Wnt2b (Kubo et al., 2003). Wnt3a est aussi capable de promouvoir *in vitro* la prolifération des cellules souches rétinienne de souris. De plus, l'application de Wnt3a à des sphères primaires ne présentent pas seulement une augmentation de taille mais aussi une capacité plus élevée à former des sphères secondaires, indiquant que la signalisation Wnt maintient l'auto-renouvellement des cellules souches rétinienne (Inoue et al., 2006). Des études menées au laboratoire chez le xénope au stade post-embryonnaire ont montré que l'activation de la voie Wnt *in vivo* augmente le nombre de cellules en prolifération dans la ZMC alors que son inhibition conduit à l'effet opposé. Des expériences de « pulse chase » de BrdU suggèrent que ces effets résultent du fait que la voie Wnt maintiendrait les cellules de la ZMC dans un état prolifératif (Denayer et al., 2008).

Il semble que la voie Wnt agit également sur les cellules de Müller. En effet, cette dernière semble impliquée dans les processus de régénération en activant la conversion des cellules de Müller en cellules souches (Locker et al., 2009 ; Del Debbio et al., 2010 ; Ramachandran et al., 2011).

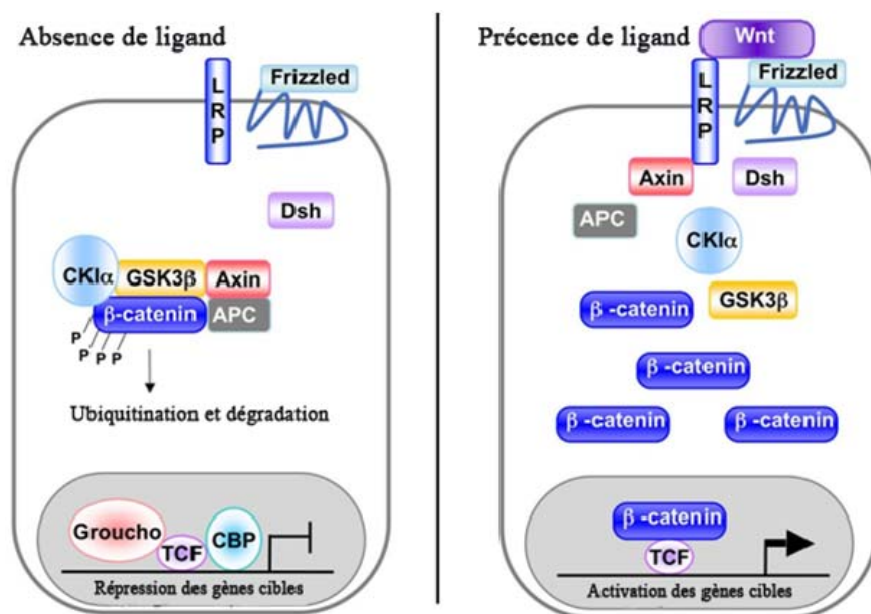


Figure 47 : La voie de signalisation canonique Wnt. En l'absence de ligand, les protéines intracellulaires GSK3 (glycogènesynthase kinase 3 β), Axin et APC (Adenomatous Polyposis Coli) hyperphosphorylent la β -caténine, le complexe que forment ces protéines sera alors dégradé. En présence du ligand Fz (Frizzled), la voie de dégradation du protéasome est inhibée entraînant une accumulation de β -caténine. Les β -caténines transloquent dans le noyau, interagissent avec des facteurs de transcription de la famille LEF-1/TCF et activent l'expression des gènes cibles (Eisenmann, 2005).

Beaucoup d'études se sont focalisées sur le rôle de la voie Notch/Delta lors de la rétino-genèse embryonnaire mais très peu ont cherché à identifier son rôle dans l'activité des cellules souches rétinienne. Dans le cerveau en revanche, beaucoup d'études réalisées ces dernières années suggèrent que cette voie est impliquée dans le contrôle de l'activité des cellules souches neurales. En effet, des composants de la voie Notch sont exprimés dans les principales niches de cellules souches neurales du cerveau des mammifères (Imayoshi et al., 2010). Chez le poisson zèbre, il a été montré que son activation, dans des zones de neurogenèse, maintient un état de quiescence des cellules souches neurales alors que son inhibition conduit à leur différenciation (Chapouton et al., 2010).

Un grand nombre des composants de la voie Notch sont exprimés dans la ZMC du poisson zèbre ou du xénope tels que ses ligands (*delta*) ou ces cibles (*her6*, orthologue de *Hes1*) (Raymond et al., 2006 ; Perron et al., 1998). Ces résultats indiquent que la voie de signalisation Notch est active dans cette zone.

Parmi le peu d'étude sur le rôle de Notch dans les cellules souches de la rétine, une équipe propose que cette voie est requise pour la maintenance des CSR *in vitro*. En effet, des cellules dérivées de l'épithélium ciliaire de souris mutées pour *presisilin-1* (pour lesquelles la signalisation Notch est réduite) génèrent moins de neurosphères que celles dérivant de l'épithélium ciliaire de souris sauvages (Alexson et al., 2006). Ces données indiquent une déplétion du pool de cellules souches du corps ciliaire et suggèrent que la voie Notch est requise pour leur maintenance.

Nous pouvons constater qu'un grand nombre d'études montre l'implication des facteurs extrinsèques, facteurs de croissance et voies de signalisation, dans le contrôle de la maintenance et la prolifération des cellules souches neurales adultes. Un des enjeux majeurs aujourd'hui est donc de comprendre comment ces cellules intègrent ces différents signaux pour adapter leur comportement. Notamment, les diverses voies de signalisation sont-elles capables d'interagir ? J'ai, au cours de ma thèse, participé à un projet visant à répondre à cette question. Il s'agissait d'étudier les interactions potentielles entre les voies de signalisation Wnt

et Hedgehog dans la ZMC du xénope. Je reviendrai sur ce sujet dans la partie 2.1 des résultats.

4.5.2. Les facteurs intrinsèques

Bien que beaucoup de facteurs intrinsèques soient connus pour influencer de manière autonome la prolifération des progéniteurs au cours de la rétino-genèse, très peu d'études ont montré leur rôle à des stades post-embryonnaires. Des études comparatives de transcriptomique entre les cellules « souches » dérivées du corps ciliaire et les progéniteurs rétinien-ns embryonnaires ont cependant dévoilé plus de 80% d'identité (Ahmad et al., 2004; Das et al., 2004). Ainsi, les gènes connus pour être impliqués dans la spécification du territoire oculaire tels que les EFTFs (*Rx*, *Chx10*, *Pax6*, *Six3*, *Six6* et *Lhx2*) sont également exprimés dans l'épithélium ciliaire de rongeur, singe et humain adultes (Das et al., 2005; Lord-Grignon et al., 2006; Martinez-Navarrete et al., 2008; Xu et al., 2007). Parmi eux, *Pax6* semble être requis pour la prolifération et l'expansion des cellules souches rétinien-ns (Xu et al., 2007).

Cependant, tous ces marqueurs ne sont pas spécifiques des CSR mais s'expriment aussi dans les progéniteurs. L'étude de l'activité des cellules souches est donc encore limitée par un réel manque de marqueurs spécifiques permettant leur identification. Du fait de son organisation, la ZMC du xénope est un modèle idéal pour rechercher des marqueurs spécifiques de ces CSR (**Figure 44**). Cependant, au début de ma thèse, seuls des composants de la voie de signalisation Hedgehog, Gli2, Gli3 et Smoothened, et quelques autres facteurs étaient connus pour être exclusivement exprimés dans la région la plus périphérique de la ZMC où résident les CSR (Perron et al., 2003 ; Moshiri et al., 2005 ; Borday et al., 2012). Afin d'identifier de nouveaux marqueurs, un crible à grande échelle par hybridation *in situ* a été réalisé au laboratoire. Cette étude ayant fait l'objet d'une importante partie de ma thèse, je reviendrai en détail sur la procédure et les données obtenues dans la partie 3.1 des résultats.

Objectifs

Au cours de ma thèse, mes projets de recherche ont visé à mieux comprendre les mécanismes moléculaires contrôlant la prolifération et la spécification des progéniteurs dans la rétine du xénope à travers trois projets principaux.

➤ Analyse fonctionnelle du gène *Ascl1* au cours de la rétino-genèse

Comme je l'ai dit dans l'introduction, le réseau de régulation qui contrôle la spécification des cellules progénitrices vers les sous-types neuronaux est à ce jour très peu connu. Lorsque je suis arrivé au laboratoire, l'équipe venait de démontrer l'implication du facteur de transcription *Ptfla* dans la spécification du phénotype GABAergique dans la rétine (Dullin et al., 2007) et souhaitait identifier d'autres composants du réseau transcriptionnel impliquant ce facteur. Il a été montré que l'expression de *Ptfla* est diminuée dans la moelle épinière et dans des rétines déficientes pour *Ascl1* (Mizuguchi et al., 2006 ; Nelson et al., 2009), suggérant qu'*Ascl1* pourrait réguler l'expression de *Ptfla*. Je me suis donc intéressé au rôle du facteur de transcription *Ascl1* dans la spécification des sous-types rétiniens et à son lien potentiel avec *Ptfla*.

Le facteur *Ascl1* est décrit dans la rétine du xénope comme ayant un effet proneural (Wang and Harris, 2005). Cependant, compte tenu de son rôle spécifique dans la genèse de sous-types neuronaux dans le cerveau et le système nerveux périphérique, nous nous sommes demandé si *Ascl1* ne pouvait pas également être impliqué dans la spécification de sous-types cellulaires de la rétine. Nous avons vu dans l'introduction que la fonction de ce facteur est très fortement liée au contexte. En effet, il agit souvent comme facteur GABAergique, mais peut dans certains contextes cellulaires, ou à certains stades de développement, favoriser la destinée glutamatergique, sérotoninergiques, noradrénergiques ou dopaminergiques (Mizuguchi et al., 2006, Jo et al., 2007; Pattyn et al., 2002 ; Hirsch et al., 1998 ; Howard, 2005 ; Park et al., 2006). C'est pourquoi identifier son rôle dans d'autres régions du système nerveux comme la rétine et connaître comment il s'intègre au réseau génétique impliqué dans ces processus de diversification cellulaire permettrait de mieux comprendre ces divergences.

L'ensemble de ce projet devait aboutir à l'élaboration d'un réseau de facteurs de transcription impliquant *Ascl1* et jouant un rôle dans la spécification des sous types rétiniens au cours du développement.

➤ **Etude des voies de signalisation Wnt et Hedgehog dans la balance prolifération/différenciation des cellules progénitrices de la rétine**

La mise en place correcte des types et sous-types cellulaires de la rétine nécessite une coordination avec le moment de sortie du cycle cellulaire des progéniteurs rétiniens. Dans ce contexte, j'ai contribué, en collaboration avec plusieurs membres du laboratoire, à l'avancée d'un projet visant à étudier le réseau de signalisation contrôlant la balance prolifération/différenciation des cellules progénitrices de la rétine. La ZMC du xénope récapitulant la neurogenèse embryonnaire, l'utilisation de ce modèle est un avantage pour observer simultanément les cellules dans différentes phases de développement, des cellules souches aux neuroblastes post-mitotiques en différenciation, en passant par les progéniteurs prolifératifs en cours de détermination.

L'équipe s'était intéressée dans ce contexte au rôle et aux interactions entre les voies Wnt et Hedgehog dans la ZMC. Les données suggéraient que ces voies établissent des gradients opposés au sein de la ZMC et s'antagonisent mutuellement pour réguler l'activité proliférative des cellules souches/progénitrices de la rétine post-embryonnaire.

L'objectif de ma contribution à l'avancée de ce projet visait à mieux comprendre les modalités d'action de ces voies sur le comportement prolifératif des cellules souches/progénitrices de la ZMC. J'ai donc cherché à évaluer et comparer l'impact des voies de signalisation Wnt et Hedgehog sur différents paramètres du cycle cellulaire, tels que la cinétique de division et le moment de sortie du cycle.

L'ensemble de ce projet devait aboutir à l'élaboration d'un modèle d'interaction entre les voies de signalisation Wnt et Hedgehog et de leurs impacts sur le contrôle du cycle cellulaires des cellules souches et progénitrices de la rétine post-embryonnaire.

➤ **Identification de nouveaux régulateurs de la prolifération et de la détermination cellulaire dans la rétine**

Dans le but d'élargir nos connaissances sur les réseaux de signalisation et les réseaux transcriptionnels cités ci-dessus, impliqués dans le contrôle de la prolifération et de la détermination cellulaire dans la rétine, j'ai recherché de nouveaux marqueurs spécifiques des cellules souches et progénitrices de la rétine au travers d'un crible à grande échelle par hybridation *in situ*.

Sachant que très peu de marqueurs spécifiques des cellules souches ont été découverts à ce jour, cette approche avait l'ambition de fournir à la communauté travaillant sur les cellules souches rétinienne des outils précieux pour identifier et discriminer les cellules souches des cellules progénitrices.

En outre, dans la continuité de mes travaux sur la spécification des sous-types rétiens, mon projet visait également à sélectionner les marqueurs spécifiques des cellules progénitrices et de réaliser un crible fonctionnel afin de sélectionner le ou les candidats susceptibles de jouer un rôle dans ce processus.

L'ensemble de ce projet devait aboutir à la découverte de nouveaux marqueurs rétiens, des cellules souches aux cellules différenciées, et à l'identification de nouveaux facteurs impliqués dans la spécification des sous-types rétiens.

II. Résultats

1. Contrôle de la détermination cellulaire : Rôle du facteur de transcription *Ascl1* dans la spécification des neurones GABAergiques de la rétine du xénope

Avant mon arrivé au laboratoire, l'équipe venait de mettre en évidence l'implication du facteur *Ptf1a* dans la genèse des sous-types GABAergiques de la rétine du xénope. Afin d'élargir le réseau de régulation impliqué dans ce processus et basé sur la littérature, l'équipe s'est tourné vers le facteur de transcription *Ascl1*. Ci-dessous suit un résumé de ce travail puis l'article qui en a découlé.

Publication prévue en décembre :

Mazurier N, Parlier D, Parain K, Pretto S, Locker M, Bellefroid E, Perron M (2012) *Ascl1* as a novel player in the *Ptf1a* transcriptional network for GABAergic cell specification in the retina.

De part leur facilité de mise en œuvre, les toutes premières expériences réalisées sur le facteur *Ascl1* ont été d'observer l'effet de sa surexpression dans l'épiderme d'embryons de xénope et de le comparer avec celui de *Ptf1a*. Alors que ce dernier est capable d'induire à la fois des neurones GABAergiques et glutamatergiques dans ces conditions, la surexpression d'*Ascl1* ne conduit qu'à la formation de neurones GABAergiques. Nous pensions alors avoir affaire à un facteur encore plus spécifique que *Ptf1a*. Au vu de ces premiers résultats, l'étape suivante a donc été d'évaluer son rôle dans un premier temps sur la genèse des types cellulaires de la rétine. A la différence de *Ptf1a* qui conduit à une augmentation de tous les types majoritairement de sous-types GABAergiques, *Ascl1* lui semble avoir un effet plutôt proneural au cours de la rétino-genèse, comme il a été décrit dans la littérature, c'est-à-dire, une augmentation des cellules les premières à naître (les cellules ganglionnaires) au détriment des plus tardives (les cellules de Müller et bipolaires). Nous avons néanmoins regardé plus précisément l'effet de son gain de fonction sur les sous-types GABAergiques. C'est alors que nous avons constaté que l'augmentation du nombre de cellules dans la couche des cellules ganglionnaires était due pour une grande partie à une augmentation de neurones

GABAergiques (les amacrine déplacées). En plus de son effet proneural, *Ascl1* semble donc suffisant pour rediriger une sous-population de progéniteurs vers un destin GABAergique. La question suivante était donc de savoir s'il est requis pour la genèse de ce sous-type cellulaire. Les expériences de perte de fonction ont en effet montré qu'*Ascl1* est nécessaire pour la genèse des neurones GABAergiques.

J'ai montré dans l'introduction que les combinaisons et les interactions entre les facteurs de détermination sont importantes pour générer la diversité cellulaire dans la rétine. Nous avons donc également étudié les interactions d'*Ascl1* avec d'autres facteurs bHLH dans des conditions ectopiques d'induction neuronale. Ces expériences montrent que le gène *Ascl1* (i) possède des caractéristiques uniques d'inducteur de neurones GABAergiques, (ii) et de neurones catécholaminergiques et (iii) est épistatique sur des facteurs glutamatergiques tels que *Neurog2*, *NeuroD1* ou *Atoh7*. Durant ces expériences, il a été observé à notre grande surprise que la capacité que possède *Ascl1* à induire des neurones GABAergiques est plus forte lorsqu'il est co-surexprimé avec *Neurog2*, qui est pourtant un inducteur spécifique de neurones glutamatergiques. Les protéines bHLH étant capables d'hétérodimérisation, cet effet synergique inattendu suggère que ces deux facteurs pourraient interagir physiquement. Après les nombreuses expériences de co-immunoprécipitation que j'ai réalisé, aucune interaction n'a pu être mise en évidence. Bien que cet effet synergique ne soit pas toujours significatif dans mes expériences de lipofection au cours de la rétino-genèse, j'ai pu toutefois observer une telle tendance, suggérant qu'*Ascl1* et *Neurog2* pourraient agir dans le même réseau de régulation transcriptionnelle pour spécifier les neurones GABAergiques rétinien (Figure 48).

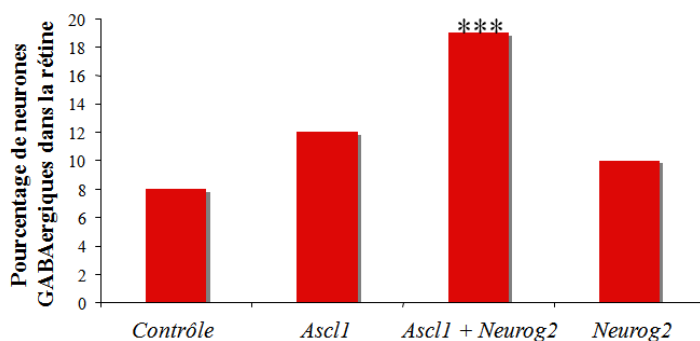


Figure 48 : Effet synergique de la combinaison *Ascl1/Neurog2*.

Exemple d'une expérience où l'effet synergique était significatif. Graphique représentant la proportion de cellules GABAergiques dans la rétine. La co-lipofection *Ascl1/Neurog2* conduit à une augmentation significative du nombre de neurones GABAergiques mais surtout plus

importante que lorsqu'*Ascl1* est surexprimé seul. $P < 0,001$ (***) ; test du Chi2.

Nous avons aussi voulu identifier les domaines responsables de l'activité respective des facteurs *Ascl1* et *Neurog2*. Ces travaux en collaboration avec Damien Parlier (laboratoire d'E. Bellefroid, Belgique) suggèrent que la capacité d'induction de neurones GABAergiques d'*Ascl1* est conférée par son domaine basique de liaison à l'ADN. En revanche pour la protéine *Neurog2*, c'est le domaine HLH qui est responsable de son potentiel d'induction de neurones glutamatergiques.

Enfin, nous avons cherché à caractériser les cibles transcriptionnelles d'*Ascl1*. Les données obtenues indiquent que sa capacité d'induction de neurones GABAergiques implique un réseau transcriptionnel distinct de celui lui permettant d'induire des neurones catécholaminergiques et requiert la régulation transcriptionnelle directe de *Ptf1a*.

Article N°1

*Ascl1 as a novel player in the Ptf1a
transcriptional network for GABAergic cell
specification in the retina*

***Ascl1* as a novel player in the *Ptf1a* transcriptional network for GABAergic cell specification in the retina**

Nicolas Mazurier¹, Damien Parlier², Karine Parain¹, Silvia Pretto¹, Philippe Vernier³, Morgane Locker¹, Eric Bellefroid² and Muriel Perron^{1§}

Address: ¹ UPR CNRS 3294 Neurobiology and Development, Université Paris Sud XI, Orsay, FRANCE; ² ULB-IBMM, Laboratoire d'Embryologie Moléculaire, Gosselies, Belgium; ³ UPR CNRS 3294 Neurobiology and Development, Institut A. Fessard, Gif-Sur-Yvette, FRANCE

[§] Corresponding author

Key words: *Ascl1*; Retina; GABAergic neurons; cell fate determination; *Ptf1a*; *Neurog2*

Short title: *Ascl1* and retinal cell fate

ABSTRACT

In contrast with the wealth of data involving bHLH and homeodomain transcription factors in retinal cell type determination, the molecular bases underlying neurotransmitter subtype specification is far less understood. Using both gain and loss of function analyses, we investigated the putative implication of the bHLH factor *Ascl1* in this process. We found that in addition to its previously characterized proneural function, *Ascl1* also contributes to the specification of the GABAergic phenotype. We showed that it is necessary for retinal GABAergic cell genesis and sufficient in overexpression experiments to bias a subset of retinal precursor cells towards a GABAergic fate. We also analysed the relationships between *Ascl1* and a set of other bHLH factors using an in vivo ectopic neurogenic assay. We demonstrated that *Ascl1* has unique features as a GABAergic inducer and is epistatic over factors endowed with glutamatergic potentialities such as *Neurog2*, *NeuroD1* or *Atoh7*. This functional specificity is conferred by the basic DNA binding domain of *Ascl1* and involves a specific genetic network, distinct from that underlying its previously demonstrated effects on catecholaminergic differentiation. Our data show that GABAergic inducing activity of *Ascl1* requires the direct transcriptional regulation of *Ptf1a*, providing therefore a new piece of the network governing neurotransmitter subtype specification during retinogenesis.

INTRODUCTION

During development, neural specification leads to the emergence of a large diversity of neuronal subtypes that will serve distinct functions in the adult nervous system. A key issue concerns the nature and action of the molecular cues underlying the acquisition of both generic and specific characteristics of neurons. A small number of basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors are necessary and sufficient for progenitor cell commitment towards a neuronal lineage at the expense of a glial fate and have consequently been qualified as “proneural genes” (Bertrand et al., 2002). Beside their generic function, several studies have shown that proneural genes also display context-dependent effects contributing to the differentiation of particular neuronal subtypes (Bertrand et al., 2002; Powell and Jarman, 2008). This is the case for the *atonal-related neurogenin* genes (*Neurog1* and *Neurog2*) and the *achaete scute* gene *Ascl1* (*achaete-scute complex homolog 1*; also called *Mash1* in mouse or *Xash1* in Xenopus). These genes are mostly expressed in complementary patterns in the murine central and peripheral nervous system where they drive the production of distinct neuronal populations (Brzezinski et al., 2011; Fode et al., 2000; Osorio et al., 2010; Parras et al., 2002; reviewed in Bertrand et al., 2002; Schuurmans and Guillemot, 2002). In particular, *Neurog2* and *Ascl1* appear respectively as key regulators of glutamatergic (excitatory) versus GABAergic (inhibitory) neuronal fates during telencephalic development (Casarosa et al., 1999; Fode et al., 2000; Jo et al., 2007; Parras et al., 2002; Schuurmans et al., 2004; Wilson and Rubenstein, 2000). The implication and requirement of *Ascl1* in GABAergic cell specification has however proved to be highly time and space dependent (Mizuguchi et al., 2006; Jo et al., 2007; Peltopuro et al., 2010). In addition, *Ascl1* is also involved in the development of other neuronal subtypes such as hindbrain serotonergic neurons (Pattyn et al., 2004), central and peripheral noradrenergic neurons (Goridis and Rohrer, 2002; Hirsch et al., 1998; Howard, 2005) or mesencephalic dopaminergic neurons (Park et al., 2006). It has in

particular been shown to be required for the development of hindbrain serotonergic neurons (Pattyn et al., 2004) as well as central and peripheral noradrenergic neurons (Goridis and Rohrer, 2002; Hirsch et al., 1998; Howard, 2005). A study conducted in the murine mesencephalon also revealed its contribution to dopaminergic differentiation (Park et al., 2006). Exploring its involvement in other nervous system regions, such as the retina, and unravelling how it integrates within distinct genetic networks are now required to better understand its divergent properties.

In the retina, beside its proneural function (Nelson et al., 2009; Tomita et al., 2000; Tomita et al., 1996), *Ascl1* may also have a more specialized role in the commitment of particular cell subtypes since its expression is restricted to subsets of neuronal progenitors, mostly distinct here again from the *Neurog2*-expressing ones (Brzezinski et al., 2011; Jasoni and Reh, 1996; Jasoni et al., 1994; Marquardt et al., 2001). If numerous studies have addressed the intrinsic mechanisms responsible for the generation of the diverse classes of retinal neurons such as photoreceptor or ganglion cells (Agathocleous and Harris, 2009; Hatakeyama and Kageyama, 2004; Ohsawa and Kageyama, 2008), studies reporting on the molecular cues governing the specification of retinal subtypes with a specific neurotransmitter phenotype remain sparse (Adler and Raymond, 2008; Feng et al., 2010; Mo et al., 2004; Ohsawa and Kageyama, 2008; Suga et al., 2009; Zaghloul and Moody, 2007). As in the brain, GABAergic and glutamatergic neurons represent the most abundant inhibitory and excitatory neurons of the retina, respectively. They are distributed among the 6 major classes of retinal neurons: photoreceptor, bipolar and ganglion cells are mainly glutamatergic, whereas most GABAergic retinal neurons are found within amacrine and horizontal cells. Only a few factors, such as the bHLH transcription factor BHLHB5 (Feng et al., 2006), the cofactor LMO4 (Duquette et al., 2010), the orphan nuclear receptor Nr4a2 (Jiang and Xiang, 2009) or

the PACAP receptor PAC1 (Lang et al., 2010) have so far been involved in GABAergic amacrine cell production in the retina.

Previous studies by us and others highlighted that the bHLH gene *Ptf1a* (*pancreas transcription factor 1a*), drives inhibitory neuron commitment in the retina, at the expense of a glutamatergic destiny (Dullin et al., 2007; Fujitani et al., 2006; Jusuf et al., 2011; Lelievre et al., 2011; Nakhai et al., 2007). However, upstream regulators, partners and targets of *Ptf1a* within the retina remain to be investigated. Considering the GABAergic instructive function of *Ascl1* in various regions of the brain, and the fact that *Ptf1a* expression is decreased in the dorsal spinal cord and retina of *Ascl1*^{-/-} mice (Mizuguchi et al., 2006; Nelson et al., 2009), we asked whether it could be required for retinal GABAergic cell specification and whether it could take part to the *Ptf1a* transcriptional network.

To address these issues, we first analysed *Ascl1* function during *Xenopus* retinogenesis. We found that *Ascl1* is required for GABAergic retinal neuron genesis and sufficient to bias a subset of retinal progenitors towards a GABAergic destiny. Then, we took advantage of the *Xenopus* ectopic neurogenesis induction paradigm to investigate which genetic interactions contribute to *Ascl1* activity as an inducer of neurotransmitter phenotypes. We showed that distinct *Ascl1*-dependent transcriptional networks sustain the production of GABAergic and catecholaminergic neurons, respectively. Together, our data suggest that the GABAergic activity of *Ascl1* requires *Ptf1a*, this latter being a direct transcriptional target of *Ascl1*.

MATERIAL AND METHODS

Constructs

pCS2-Ascl1 (also called *Xash1*, Ferreira et al., 1993), *pCS2-Ptfla* and *pCS2-Ptfla-GR* (Afelik et al., 2006), *pCS2-XNeurog2* (also called *XNgnr-1*) and *pCS2-Neurog2-GR* (Perron et al., 1999), *pCS2-Atoh7* (also called *Xath5*, Kanekar et al., 1997), *pCS2-NeuroD1* (also called *NeuroD*, Chitnis and Kintner, 1996), *pCS2-GFP* (Chalfie et al., 1994) and all glucocorticoid-inducible chimeric *Ascl1:Neurog2* constructs (Talikka et al., 2002) have previously been described. *pCS2-flag-Ascl1-GR* was generated by subcloning the ORF of *Ascl1* from *pCS2-NLSMT* plasmid into *EcoRI* and *XhoI* sites of *pCS2-flag-GR* (Gammill and Sive, 1997). Protein activity of GR constructs was induced by addition of 4µg/ml dexamethasone (dex, Sigma).

Embryos, in vitro RNA synthesis and microinjection

Xenopus laevis embryos were obtained by conventional procedures of in vitro fertilization and staged according to Nieuwkoop and Faber (Nieuwkoop, 1967). Capped sense mRNAs were prepared from CS2 plasmids after Not1 digestion and transcribed using the mMessage mMachine SP6 kit (Ambion). mRNAs were then purified with Sephadex Column (Roche). 500 pg of mRNAs were injected into one or two blastomeres at the two- or four-cell stage. *GFP* mRNA was co-injected as a tracer. Loss of function experiments were performed using already described and validated antisense oligonucleotides morpholinos against *Ptfla* (*Ptfla-Mo*; Dullin et al., 2007), *Ascl1*, *Phox2a* and *Hand2* (*Ascl1-Mo1*, *Ascl1-Mo2*, *Phox2a-Mo* and *Hand2-Mo*; Parlier et al., 2008). As a control, standard morpholinos purchased from GeneTools (LLC) were used. 8 ng of morpholinos were injected into one blastomere at the

two-cell stage. All injection experiments were performed at least in triplicates. Shown in figures are results from one representative experiment.

In vivo lipofection

pCS2-Ascl1, *pCS2-Neurog2*, *pCS2-Atoh7*, *pCS2-NeuroD1* were transfected in stage 18 neurula into the presumptive region of the retina as previously described (Holt et al., 1990; Ohnuma et al., 2002). *pCS2-GFP* was co-lipofected and used as a tracer to follow transfected cells. Embryos were fixed at stage 41 in 4% paraformaldehyde plus 0,3% glutaraldehyde and cryostat sectioned (12 µm). Transfected cells were counted and cell types were identified based upon their laminar position and morphology.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed using rabbit polyclonal anti-GABA (1/1000; ImmunoStar), mouse monoclonal anti-GFP (1/200; Molecular Probes) and anti-mouse or anti-rabbit fluorescent secondary antibodies (1/1000; Alexa, Molecular Probes). Cell nuclei were counterstained with Hoechst (Sigma). Fluorescent staining was visualized with a M2 Zeiss microscope. Images were captured with a digital camera AxioCam MRc and AxioVision Rel 7.8 software.

In situ hybridization

Digoxigenin-labeled antisens RNA probes for *gad1*, *VGlut1* (Li et al., 2006), *TH* (Parlier et al., 2008), *tubb2b* (previously called *N-tubulin*, Chitnis and Kintner, 1996), *Bru* (Amato et al., 2005), *dpysl3* (previously called CRMP4, Souopgui et al., 2007), *Ptf1a* (Afelik et al., 2006) and *Ascl1* (Talikka et al., 2002) were generated according to the manufacturer's instruction (Roche). Whole mount in situ hybridization was carried out as previously described (Parain et al., 2011). Embryos were then vibratome sectioned (50 µm).

RT-qPCR

Stage 19 embryos were treated with cycloheximide (CHX, 10 µg/ml) during 2.5 hours. Total RNA from 8 embryos was then isolated using the Nucleospin RNA XS kit (Macherey Nagel). Reverse transcription was performed using Iscript[™]cDNA Synthesis Kit (Biorad). RNA quality was evaluated using Experion[™] (BioRad). qPCR reactions were performed in triplicate using SsoFast[™] Eva green[®] Supermix (Biorad) on a C1000[™] Thermal Cycler (CFX96[™] Real-Time System, Biorad). All values were normalized to the level of the reference gene *ornithine decarboxylase (ODC)* using Biorad CFX Manager Software. Primers sequences are: *tubb2b* forward 5'CCCGTGCCATCCTTGTGGATTT3', *tubb2b* reverse 5'GCCCAGTTATTGCCAGCACCACTT3', *Ptfla* forward 5'GCCGCTCAGGAACCCCAACA3', *Ptfla* reverse 5'GGCAGCCCGTAGTCTGGGTCA3', *ODC* forward 5'CATGGCATTCTCCCTGAAGTACAAGAA3' and *ODC* reverse 5'GGACAGTGGTAGGGGCAAGCTCA3'.

Western-blot analyses

Total protein lysates were prepared from stage 14 embryos and submitted to western blot analysis using an anti-Myc antibody (Sigma) as previously described (Taelman et al., 2004).

RESULTS

Ascl1 knockdown impairs retinal GABAergic neuron genesis

To address the potential requirement of *Ascl1* in GABAergic and glutamatergic phenotype acquisition, we performed morpholino (Mo) injections in two cell stage embryos. We examined the effect of *Ascl1* loss-of-function by analysing the expression of *gad1* (*glutamic acid decarboxylase*) and *VGlut1* (*vesicular glutamate transporter 1*) which respectively encode the rate-limiting enzyme for GABA biosynthesis and a glutamate transporter expressed in neurons. The expression of a retinal pan-neuronal marker *Bru* (Amato et al., 2005) remained largely unaffected in *Ascl1*-Mo injected retinas compared to control ones (Fig. 1A,B), suggesting that *Ascl1* knockdown does not significantly impair neuronal commitment within the retina, as shown in the mouse (Tomita et al., 1996). *Ascl1* inhibition however caused a marked reduction of *gad1* retinal expression (Fig. 1C,D), evocative of an impaired production of GABAergic neurons. Importantly, this was accompanied by a significant decrease in the expression of *Ptfla* (Fig. 1E,F), a crucial determining factor of GABAergic fate in the retina (Dullin et al., 2007; Fujitani et al., 2006; Nakhai et al., 2007). Then, we observed in *Ascl1*-Mo injected retinas that the different glutamatergic neuronal populations were unevenly affected, with *VGlut1* expression being largely unchanged in ganglion cells, reduced in the photoreceptor layer, while appearing expanded in the inner nuclear layer (INL) (Fig. 1G,H). Thus, in contrast to the *Ptfla* knockdown phenotype (Dullin et al., 2007), *Ascl1* morphant retinas do not exhibit an overall increase of *VGlut1* staining. As a whole, blocking *Ascl1* mainly precludes commitment of precursor cells towards a GABAergic fate. However, the overall observed defects, in particular the loss of some glutamatergic cells in the outer nuclear layer, cannot be simply explained by a switch from GABAergic to glutamatergic cell types. A plausible explanation would be that part of the *Ascl1* knockdown phenotype primarily results from a loss of its proneural activity.

***Ascl1* overexpression in the retina biases a subset of precursor cells towards a GABAergic destiny**

To investigate in more details *Ascl1* involvement in the specification of neurotransmitter phenotypes, we turned to a gain of function strategy using a glucocorticoid-inducible *Ascl1* construct (*Ascl1-GR*). We found that stage 26 *Ascl1-GR* injected embryos exhibited increased *Ptf1a* retinal labelling (Fig. 2A,B), suggesting that *Ascl1* controls *Ptf1a* expression, in agreement with the aforementioned knock-down experiments. We next analysed the fate of *Ascl1*-overexpressing cells at stage 38. Contrasting with the *Ptf1a* gain of function, which results in a dramatic overproduction of amacrine and horizontal cells (Dullin et al., 2007), *Ascl1* overexpression led to a typical neurogenic phenotype, with early born neurons being increased (ganglion cells, Fig. 2C) at the expense of late born cells (bipolar and Müller glial cells, data not shown). However, similarly to the *Ptf1a* phenotype, quantification of GABA-positive neurons among *Ascl1*-overexpressing cells revealed an enhanced GABAergic neuronal yield compared to the control situation (Fig. 2D). These supernumerary inhibitory neurons were found within the ganglion cell layer and thus probably correspond to displaced amacrine cells (Farah, 2006). Importantly, similar results were obtained in a clonal analysis after *in vivo* lipofection (Fig. 2E-G). This rules out the possibility that the *Ascl1* phenotype observed in mRNA injection experiments may be secondary to early morphogenetic defects of the retina and confirms that *Ascl1* exerts a cell-autonomous function in GABAergic cell type determination.

In order to figure out whether this GABAergic inducing activity is specific to *Ascl1* compared to other bHLH proteins endowed as well with neurogenic properties, we performed similar *in vivo* lipofection experiments with the *atonal*-related genes *Neurog2* and *Atoh7*. As expected from previous studies (Kanekar et al., 1997; Perron et al., 1999; Wang and Harris, 2005), overexpression of these genes, as for *Ascl1*, resulted in an imbalanced production of

early- versus late-born cell types (Fig. 2E and data not shown). However, in contrast to the *Ascl1* gain of function phenotype, the ratio of GABAergic neurons among *Neurog2* or *Atoh7* transfected cells in the ganglion cell layer did not differ from the control situation (Fig. 2F).

Altogether, our data highlight that, although *Ascl1* shares with *Neurog2* or *Atoh7* a neurogenic activity impacting on retinal cell type distribution, it has the specific ability to bias a subset of progenitors towards a GABAergic fate.

***Ascl1* has a specific GABAergic inducing activity and is epistatic to glutamatergic factors**

It has previously been shown that *Ascl1*, *Neurog2*, *NeuroD1*, *Atoh7* and *Ptfla* are all sufficient to induce ectopic neurogenesis when overexpressed in the epidermis of *Xenopus* embryos (Kanekar et al., 1997; Lee et al., 1995; Ma et al., 1996; Rupp et al., 1994; Talikka et al., 2002; Turner and Weintraub, 1994; Dullin et al., 2007). To further assess the functional specificity of *Ascl1* as a GABAergic inducing factor, we injected the corresponding mRNA as well as those encoding the aforementioned bHLH factors and compared the neurotransmitter phenotypes they induced. As expected, each of them induced ectopic *tubb2b* (previously called *N-tubulin*) expression in stage 24 embryos (Fig. 3A). Except for *Ascl1*, this was associated with a robust *VGlut1* staining (Fig. 3A,B). Only *Ptfla* and *Ascl1* were able to promote ectopic *gad1* expression (Fig. 3A,C). We therefore conclude that *Ascl1* has the unique property among these factors, to convert presumptive epidermal cells into GABAergic neurons without simultaneously inducing glutamatergic ones.

We next wondered whether *Ascl1* might act as an inhibitor of glutamatergic neuron genesis and thus investigated the genetic relationships between *Ascl1* and the other bHLH genes, in co-injection experiments. The glutamatergic inducing activities of *Neurog2*, *NeuroD1*, *Atoh7* and *Ptfla* were all dramatically reduced upon *Ascl1* misexpression (Fig.

3A,B), indicating that *Ascl1* indeed actively represses the glutamatergic fate of ectopically produced neurons. In contrast, neither *Neurog2*, *NeuroD1* or *Atoh7* were able to interfere with the *Ascl1*-dependent induction of GABAergic neurons (Fig. 3A,C). Surprisingly, we found that embryos overexpressing both *Ascl1* and *Neurog2* displayed more ectopic *gad1*-positive cells compared to embryos injected with *Ascl1* alone (Fig. 3D), suggesting an unexpected synergistic effect. Altogether, these data demonstrate that, in this ectopic context, *Ascl1* is epistatic to these various bHLH genes. Importantly, this also held true in the retina, where overexpression of *Ascl1* together with *Neurog2* still resulted in an increased production of GABAergic cells within the ganglion cell layer (Fig. 3E).

***Ascl1* catecholaminergic inducing activity is impaired by glutamatergic factors**

As recently shown, *Ascl1* misexpression in the epidermis also leads to the ectopic generation of noradrenergic neurons (Parlier et al., 2008), authenticated by the expression of *tyrosine hydroxylase* (*TH*). We thus decided to pursue our comparative study by monitoring *TH* labelling after *Ascl1*, *Neurog2*, *NeuroD1*, *Atoh7* or *Ptf1a* mRNA injection. In contrast to *Ascl1*, none of these genes were able to promote the production of *TH*-positive neurons, emphasizing again the specific role of *Ascl1* in neuronal subtype determination (Fig. 4A). Epistatic analyses revealed that the proportion of embryos displaying ectopic *TH* expression was slightly decreased upon co-injection of *Ascl1* with either *Atoh7* or *NeuroD1*, although this was not statistically significant. It was however significantly reduced when *Ascl1* was misexpressed together with *Neurog2* or *Ptf1a*, suggesting that these two genes could interfere with the *Ascl1* catecholaminergic inducing activity (Fig. 4A,B). Such a result contrasts with the interaction previously demonstrated for the induction of GABAergic neurons and reflects that the same set of transcription factors establishes variable genetic interactions within distinct differentiation pathways.

The GABAergic and catecholaminergic inducing activities of Ascl1 are conferred by its basic domain

We next examined which Ascl1 domains account for the protein activity in neuronal subtype specification. We used a series of chimeric *Ascl1:Neurog2* constructs (Fig. 5A; Talikka et al., 2002) with interchanged basic and/or HLH domains (DNA binding and dimerization domain, respectively) and tested their ability to induce *TH*, *gad1* and *VGlut1* ectopic expression. Importantly, the chimeric proteins were properly expressed following mRNA injection (Fig. 5B) and all but one (A_HN) retained a neurogenic activity, as inferred by their ability to promote the expression of the pan-neuronal marker *dpysl3* (previously called *CRMP4*; Fig. 5A,C). Noticeably, swapping the entire bHLH domains of Ascl1 and Neurog2 was sufficient to invert their respective properties in neurotransmitter phenotype induction. The Neurog2 protein containing the Ascl1 bHLH indeed converted into a GABAergic and catecholaminergic neuron inducer, while the Ascl1 protein with the Neurog2 bHLH turned into a glutamatergic one (Fig. 5A,C; compare A_{bHLH}N to Ascl1 and N_{bHLH}A to Neurog2). This demonstrates that the functional specificity of these two proteins resides in their respective bHLH domains. In addition, we found that the presence of the Ascl1 basic domain in chimeric constructs was necessary and sufficient to trigger *TH* and *gad1* ectopic expression (Fig. 5A,C; compare A_bN and N_HA to N_bA for *gad1* and *TH* staining). Conversely, only the chimeric proteins containing the Neurog2 HLH domain had the ability to induce glutamatergic neurons (Fig. 5A,C; see *VGlut1* labelling for A_bN and N_HA versus N_bA). In line with this observation, the two chimeric proteins containing both the basic domain of Ascl1 and the HLH of Neurog2 (A_bN and N_HA proteins) were able to simultaneously promote *gad1*, *TH* and *VGlut1* expression. Altogether, these results suggest that the functional specificities of Ascl1 and Neurog2 in neurotransmitter subtype specification do not reside in the same protein domain.

GABAergic and catecholaminergic inducing activity of *Ascl1* primarily relies on its basic domain while glutamatergic inducing activity of *Neurog2* is imparted by its HLH domain.

To assess whether this also holds true within the retina, we overexpressed the chimeric construct *A_bN* by in vivo lipofection (Fig. 5D,E). Similarly to wild-type *Ascl1*, *A_bN* transfection increased the proportion of cells within the ganglion cell layer (Fig. 5D) and biased these additional neurons towards a GABAergic destiny (Fig. 5E). This indicates that *Ascl1* basic domain is sufficient to drive a subset of retinal progenitor cells towards a GABAergic fate.

***Phox2a* and *Hand2* are essential downstream components of *Ascl1* catecholaminergic pathway but are dispensable for its GABAergic inducing activity**

The DNA binding basic domain of *Ascl1* being central to its activity, we next sought to identify potential transcriptional targets involved in its GABAergic versus catecholaminergic inducing activity. The homeodomain *Phox2a* and bHLH *Hand2* proteins act downstream *Ascl1* for the determination and differentiation of noradrenergic neurons (Goridis and Rohrer, 2002; Howard, 2005; Lo et al., 1998; Morikawa et al., 2007; Parlier et al., 2008). To examine whether these genes may also be involved in *Ascl1* GABAergic inducing activity, we simultaneously misexpressed *Ascl1* while knocking down both *Phox2a* and *Hand2* using specific morpholinos. As previously described, this resulted in a significantly decreased proportion of embryos exhibiting ectopic *TH* staining. In contrast, the ability of *Ascl1* to induce *gad1*-positive neurons appeared largely unaffected (Fig. 6A,B). This demonstrates that *Phox2a* and *Hand2*, although required for *Ascl1*-dependent production of catecholaminergic neurons, are dispensable for its GABAergic inducing activity.

***Ptfla* is required for *Ascl1* GABAergic inducing activity as a direct transcriptional target**

Since both *Ascl1* and *Ptfla*, share the ability to induce ectopic GABAergic neurons, in contrast to the other tested bHLH genes (Fig. 3), we next investigated whether they could act in the same transcriptional network. We first examined *Ptfla* requirement for *Ascl1* GABAergic and catecholaminergic inducing activities by simultaneously overexpressing *Ascl1* and knocking down *Ptfla* (Fig. 6C,D). The *Ascl1*-dependent ectopic *TH* expression was unaffected by *Ptfla* inhibition, showing that this gene is dispensable for *Ascl1* catecholaminergic inducing activity. In contrast, the percentage of embryos displaying ectopic *gad1* staining was significantly decreased by the concomitant blockade of *Ptfla*. These results indicate that *Ptfla* acts downstream *Ascl1* for the generation of ectopic GABAergic neurons.

We then tested whether this *Ptfla* dependency might rely on a transcriptional interaction. In line with the above results in the retina (Fig. 2B), we found that *Ascl1* mRNA injection promoted *Ptfla* ectopic expression in the epidermis (Fig. 7A,B). In contrast, *Neurog2* misexpression was unable to do so. Together, these data suggest the existence of a positive transcriptional regulation exerted by *Ascl1* on *Ptfla*. We thus investigated whether *Ptfla* could constitute a direct target of *Ascl1*. In this purpose, we performed gene induction assays on *Ascl1-GR* injected embryos in the absence of protein synthesis, using the translation-blocking drug cycloheximide (CHX). In the absence of CHX, *Ascl1* overexpression lead to a strong increase of both *tubb2b* and *Ptfla* expression level, as assayed by RT-qPCR analysis (Fig. 7C). Only *Ptfla* up-regulation persisted upon CHX treatment, consistent with *Ptfla* being a direct *Ascl1* target gene (Fig. 7D).

DISCUSSION

The molecular bases underlying neurotransmitter subtype determination in the retina remain largely unexplored. As previously shown in the brain and peripheral nervous system (Hirsch et al., 1998; Lo et al., 1998; Parras et al., 2002; Pattyn et al., 2004), our data suggest that during retinogenesis, *Ascl1* does not simply act as a proneural factor committing progenitor cells to a generic neuronal fate, but also contributes to the specification of their neurotransmitter identity. We showed indeed that *Ascl1* is required for retinal GABAergic cell type genesis and sufficient to redirect a subpopulation of progenitors towards this inhibitory neuronal destiny. Besides, taking advantage of an *in vivo* neurogenic assay in the *Xenopus* epidermis, we found that *Ascl1* GABAergic determining activity is instructive, as inferred by its ability to counteract glutamatergic differentiation programs. Finally, we gained insights into downstream genetic networks underlying *Ascl1* functions in neurotransmitter subtype specification by showing that its GABAergic activity involves the direct transcriptional regulation of *Ptfla*.

***Ascl1* GABAergic determining activity in the retina**

Most *Ascl1* gain and loss of function analyses in the retina have so far uncovered phenotypes predominantly related to its proneural activity. *Ascl1* has indeed been shown to be required for neuronal versus glial fate decisions during late neurogenesis (Hatakeyama et al., 2001; Nelson et al., 2009; Tomita et al., 2000; Tomita et al., 1996) and to participate, with other proneural genes, to the spatiotemporal progression of the neurogenic wave in the retina (Hufnagel et al., 2010). In line with this, recent lineage experiments in mouse revealed that *Ascl1*-expressing progenitors contribute to all major cell types of the retina with the exception of ganglion cells (Brzezinski et al., 2011). Such a primary function in determining a generic

neuronal program has thus hindered the identification of its potential specific activity in retinal cell subtype specification. In line with this, overexpression of *Ascl1* or other bHLH genes such as *Neurog2* or *Atoh7* results in apparently similar cell type distribution defects within the *Xenopus* retina (Kanekar et al., 1997; Ohnuma et al., 2002; Perron et al., 1999; Wang and Harris, 2005). In the present manuscript, we revealed that *Ascl1* is actually endowed with a GABAergic determining function that superimposes to its proneural activity. Of note, neither *Neurog2* nor *Atoh7* exhibit this property. Importantly, our results are consistent with a previous study in chick reporting that, unlike *Neurog2*, *NeuroD1* or *Atoh7*, *Ascl1* misexpression promotes an overproduction of amacrine cells, the major retinal GABAergic cell type (Mao et al., 2009). Therefore, we propose that *Ascl1* not only promotes neurogenesis but also biases, in combination with other bHLH factors (see below), a subset of precursor cells towards particular neurotransmitter subtypes, thereby contributing to neuronal diversity during retinogenesis.

Epistatic relationships of bHLH genes in neuronal subtype specification

The strong context-dependency of *Ascl1* function in neurotransmitter subtype specification relies on the presence of other regionally expressed transcription factors including bHLH ones (Powell and Jarman, 2008). In line with this, our data show that *Ascl1* ability to induce ectopic catecholaminergic neurons is impaired in the presence of *Neurog2*, *NeuroD1* or *Atoh7*. In contrast, its GABAergic inducing activity is not counteracted by these factors, both ectopically and in retinal progenitors. Thus *Ascl1* likely exerts an instructive role in promoting GABAergic cell fate as previously proposed in the ventral telencephalon (Fode et al., 2000; Parras et al., 2002).

Unexpectedly, *Ascl1*-dependent ectopic GABAergic neuron production turned to be enhanced by *Neurog2* co-expression. This suggests that, in the few locations where both

factors are co-expressed in the same cells (Brzezinski et al., 2011; Kele et al., 2006; Mizuguchi et al., 2001; Roybon et al., 2009), they might act synergistically or at least cooperate within neuronal subtype specification programs. This could be the case in the retina where, although the *Ascl1* and *Neurog2* lineages are largely distinct, such progenitors expressing both genes have recently been described (Brzezinski et al., 2011). Interestingly, *Neurog2* was identified as a direct transcriptional target of *Ptf1a* in the chick dorsal spinal cord and cerebellum (Henke et al., 2009b), two regions where *Ptf1a*, *Ascl1* and *Neurog2* expressions partially overlap (Zordan et al., 2008). *Neurog2* might thus participate within these domains in the *Ascl1*/*Ptf1a*-dependent GABAergic program. Additionally, *Ascl1* and *Neurog2* were shown to heterodimerize and function in common transcriptional complexes (Gradwohl et al., 1996; Henke et al., 2009a; Henke et al., 2009b). Investigating *Ascl1* interactions with other expressed bHLH genes in the retina will surely help understand the combinatorial codes governing neurotransmitter subtype determination.

Functional domain and transcriptional network of *Ascl1* involved in GABAergic cell determination

Previous reports proposed that the HLH domain of murine *Ascl1* contains the information underlying its specific activity in neuronal subtype specification (Nakada et al., 2004; Park et al., 2006). In particular, a study using chimeric and mutated constructs concluded that *Ascl1*-mediated acquisition of GABAergic identity in forebrain precursor cultures does not occur through DNA binding, but rather through HLH domain protein-protein interactions (Jo et al., 2007). The authors however raised the possibility that, in their assays, alterations of endogenous *Ascl1* expression may have interfered with proper GABAergic differentiation. Our domain swapping experiments led to an opposite conclusion, highlighting the essential role of *Ascl1* basic domain in both its catecholaminergic and

GABAergic inducing activities. Interestingly, the same was not true for Neurog2, whose ability to induce glutamatergic neurons was found to be imparted by its HLH domain. Although we cannot exclude that Ascl1 or Neurog2 might act through different molecular mechanisms depending on the cellular context, our data suggest that distinct domains within these bHLH factors mediate their functional specificities in neurotransmitter phenotype specification.

Besides, we showed that Ascl1 exerts its GABAergic and catecholaminergic determining activities by controlling distinct genetic cascades involving *Ptf1a* and *Phox2a/Hand2*, respectively. We found in particular that Ascl1 ability to promote *gad1*-positive neurons requires *Ptf1a*. Additionally, Ascl1 was able to activate *Ptf1a* transcription and to be necessary for its retinal expression. In line with such a positive transcriptional regulation, previous data showed that *Ascl1* is required for the induction and/or maintenance of *Ptf1a* during the late phase of dorsal sensory interneuron development (Meredith et al., 2009; Mizuguchi et al., 2006). Moreover, we provide some evidences that *Ptf1a* might constitute a direct transcriptional target of Ascl1. Consensus binding sites for Ascl1 have previously been described in two conserved *Ptf1a* enhancer regions but have not proved to be functional (Meredith et al., 2009). Additional Ascl1 binding sites may however lie in other *Ptf1a* regulatory regions.

Altogether, our work demonstrated for the first time a role for Ascl1 in the generation of GABAergic interneurons in the retina and gained insights into the regulatory circuits responsible for its activity in neurotransmitter subtype specification.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank M. Saha, K. Zimmerman and J.E. Lee for sending plasmids. We are grateful to J. Hamdache for technical assistance and C. de Meideros for animal care. N.M. is a NeRF (Neuropôle de Recherche Francilien) fellow; D.P. is a FRIA

(Belgian Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture) fellow.

This research was supported by grants to M.P. from the ANR, CNRS, University Paris-Sud, Retina France, ARC, IFR144 and to E.B. from the Belgian Fonds de la Recherche Scientifique (FRFC 3.4635.06), the Belgian Queen Elisabeth Medical Foundation, the Fédération Wallonie-Bruxelles (Action de Recherche Concertée) and the Walloon Region Excellence Programme (“CIBLES”).

REFERENCES

- Adler, R. and Raymond, P. A.** (2008). Have we achieved a unified model of photoreceptor cell fate specification in vertebrates? *Brain Res* **1192**, 134-50.
- Afelik, S., Chen, Y. and Pieler, T.** (2006). Combined ectopic expression of Pdx1 and Ptf1a/p48 results in the stable conversion of posterior endoderm into endocrine and exocrine pancreatic tissue. *Genes Dev* **20**, 1441-6.
- Agathocleous, M. and Harris, W. A.** (2009). From progenitors to differentiated cells in the vertebrate retina. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**, 45-69.
- Amato, M. A., Boy, S., Arnault, E., Girard, M., Della Puppa, A., Sharif, A. and Perron, M.** (2005). Comparison of the expression patterns of five neural RNA binding proteins in the *Xenopus* retina. *J Comp Neurol* **481**, 331-9.
- Bertrand, N., Castro, D. S. and Guillemot, F.** (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* **3**, 517-30.
- Brzezinski, J. A. t., Kim, E. J., Johnson, J. E. and Reh, T. A.** (2011). Ascl1 expression defines a subpopulation of lineage-restricted progenitors in the mammalian retina. *Development* **138**, 3519-31.
- Casarosa, S., Fode, C. and Guillemot, F.** (1999). Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* **126**, 525-34.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. and Prasher, D. C.** (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-5.
- Chitnis, A. and Kintner, C.** (1996). Sensitivity of proneural genes to lateral inhibition affects the pattern of primary neurons in *Xenopus* embryos. *Development* **122**, 2295-301.
- Dullin, J. P., Locker, M., Robach, M., Henningfeld, K. A., Parain, K., Afelik, S., Pieler, T. and Perron, M.** (2007). Ptf1a triggers GABAergic neuronal cell fates in the retina. *BMC Dev Biol* **7**, 110.
- Duquette, P. M., Zhou, X., Yap, N. L., MacLaren, E. J., Lu, J. J., Wallace, V. A. and Chen, H. H.** (2010). Loss of LMO4 in the retina leads to reduction of GABAergic amacrine cells and functional deficits. *PLoS One* **5**, e13232.
- Farah, M. H.** (2006). Neurogenesis and cell death in the ganglion cell layer of vertebrate retina. *Brain Res Rev* **52**, 264-74.
- Feng, L., Xie, X., Joshi, P. S., Yang, Z., Shibasaki, K., Chow, R. L. and Gan, L.** (2006). Requirement for Bhlhb5 in the specification of amacrine and cone bipolar subtypes in mouse retina. *Development* **133**, 4815-25.
- Feng, L., Xie, Z. H., Ding, Q., Xie, X., Libby, R. T. and Gan, L.** (2010). MATH5 controls the acquisition of multiple retinal cell fates. *Mol Brain* **3**, 36.
- Ferreiro, B., Skoglund, P., Bailey, A., Dorsky, R. and Harris, W. A.** (1993). XASH1, a *Xenopus* homolog of achaete-scute: a proneural gene in anterior regions of the vertebrate CNS. *Mech Dev* **40**, 25-36.
- Fode, C., Ma, Q., Casarosa, S., Ang, S. L., Anderson, D. J. and Guillemot, F.** (2000). A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev* **14**, 67-80.
- Fujitani, Y., Fujitani, S., Luo, H., Qiu, F., Burlison, J., Long, Q., Kawaguchi, Y., Edlund, H., MacDonald, R. J., Furukawa, T. et al.** (2006). Ptf1a determines horizontal and amacrine cell fates during mouse retinal development. *Development* **133**, 4439-50.
- Gammill, L. S. and Sive, H.** (1997). Identification of otx2 target genes and restrictions in ectodermal competence during *Xenopus* cement gland formation. *Development* **124**, 471-81.
- Goridis, C. and Rohrer, H.** (2002). Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nat Rev Neurosci* **3**, 531-41.

- Gradwohl, G., Fode, C. and Guillemot, F.** (1996). Restricted expression of a novel murine atonal-related bHLH protein in undifferentiated neural precursors. *Dev Biol* **180**, 227-41.
- Hatakeyama, J. and Kageyama, R.** (2004). Retinal cell fate determination and bHLH factors. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 83-9.
- Hatakeyama, J., Tomita, K., Inoue, T. and Kageyama, R.** (2001). Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type. *Development* **128**, 1313-22.
- Henke, R. M., Meredith, D. M., Borromeo, M. D., Savage, T. K. and Johnson, J. E.** (2009a). Ascl1 and Neurog2 form novel complexes and regulate Delta-like3 (Dll3) expression in the neural tube. *Dev Biol* **328**, 529-40.
- Henke, R. M., Savage, T. K., Meredith, D. M., Glasgow, S. M., Hori, K., Dumas, J., MacDonald, R. J. and Johnson, J. E.** (2009b). Neurog2 is a direct downstream target of the Ptf1a-Rbpj transcription complex in dorsal spinal cord. *Development* **136**, 2945-54.
- Hirsch, M. R., Tiveron, M. C., Guillemot, F., Brunet, J. F. and Goriadis, C.** (1998). Control of noradrenergic differentiation and Phox2a expression by MASH1 in the central and peripheral nervous system. *Development* **125**, 599-608.
- Holt, C. E., Garlick, N. and Cornel, E.** (1990). Lipofection of cDNAs in the embryonic vertebrate central nervous system. *Neuron* **4**, 203-14.
- Howard, M. J.** (2005). Mechanisms and perspectives on differentiation of autonomic neurons. *Dev Biol* **277**, 271-86.
- Hufnagel, R. B., Le, T. T., Riesenberger, A. L. and Brown, N. L.** (2010). Neurog2 controls the leading edge of neurogenesis in the mammalian retina. *Dev Biol* **340**, 490-503.
- Jasoni, C. L. and Reh, T. A.** (1996). Temporal and spatial pattern of MASH-1 expression in the developing rat retina demonstrates progenitor cell heterogeneity. *J Comp Neurol* **369**, 319-27.
- Jasoni, C. L., Walker, M. B., Morris, M. D. and Reh, T. A.** (1994). A chicken achaete-scute homolog (CASH-1) is expressed in a temporally and spatially discrete manner in the developing nervous system. *Development* **120**, 769-83.
- Jiang, H. and Xiang, M.** (2009). Subtype specification of GABAergic amacrine cells by the orphan nuclear receptor Nr4a2/Nurr1. *J Neurosci* **29**, 10449-59.
- Jo, A. Y., Park, C. H., Aizawa, S. and Lee, S. H.** (2007). Contrasting and brain region-specific roles of neurogenin2 and mash1 in GABAergic neuron differentiation in vitro. *Exp Cell Res* **313**, 4066-81.
- Jusuf, P. R., Almeida, A. D., Randlett, O., Joubin, K., Poggi, L. and Harris, W. A.** (2011). Origin and determination of inhibitory cell lineages in the vertebrate retina. *J Neurosci* **31**, 2549-62.
- Kanekar, S., Perron, M., Dorsky, R., Harris, W. A., Jan, L. Y., Jan, Y. N. and Vetter, M. L.** (1997). Xath5 participates in a network of bHLH genes in the developing Xenopus retina. *Neuron* **19**, 981-94.
- Kele, J., Simplicio, N., Ferri, A. L., Mira, H., Guillemot, F., Arenas, E. and Ang, S. L.** (2006). Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Development* **133**, 495-505.
- Lang, B., Zhao, L., Cai, L., McKie, L., Forrester, J. V., McCaig, C. D., Jackson, I. J. and Shen, S.** (2010). GABAergic amacrine cells and visual function are reduced in PAC1 transgenic mice. *Neuropharmacology* **58**, 215-25.
- Lee, J. E., Hollenberg, S. M., Snider, L., Turner, D. L., Lipnick, N. and Weintraub, H.** (1995). Conversion of Xenopus ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* **268**, 836-44.
- Lelievre, E. C., Lek, M., Boije, H., Houille-Vernes, L., Brajeul, V., Slembrouck, A., Roger, J. E., Sahel, J. A., Matter, J. M., Sennlaub, F. et al.** (2011). Ptf1a/Rbpj complex

inhibits ganglion cell fate and drives the specification of all horizontal cell subtypes in the chick retina. *Dev Biol* **358**, 296-308.

Li, M., Sipe, C. W., Hoke, K., August, L. L., Wright, M. A. and Saha, M. S. (2006). The role of early lineage in GABAergic and glutamatergic cell fate determination in *Xenopus laevis*. *J Comp Neurol* **495**, 645-57.

Lo, L., Tiveron, M. C. and Anderson, D. J. (1998). MASH1 activates expression of the paired homeodomain transcription factor Phox2a, and couples pan-neuronal and subtype-specific components of autonomic neuronal identity. *Development* **125**, 609-20.

Ma, Q., Kintner, C. and Anderson, D. J. (1996). Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* **87**, 43-52.

Mao, W., Yan, R. T. and Wang, S. Z. (2009). Proneural gene *ash1* promotes amacrine cell production in the chick retina. *Dev Neurobiol* **69**, 88-104.

Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F. and Gruss, P. (2001). Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* **105**, 43-55.

Meredith, D. M., Masui, T., Swift, G. H., MacDonald, R. J. and Johnson, J. E. (2009). Multiple transcriptional mechanisms control Ptf1a levels during neural development including autoregulation by the PTF1-J complex. *J Neurosci* **29**, 11139-48.

Mizuguchi, R., Kriks, S., Cordes, R., Gossler, A., Ma, Q. and Goulding, M. (2006). *Ascl1* and *Gsh1/2* control inhibitory and excitatory cell fate in spinal sensory interneurons. *Nat Neurosci* **9**, 770-8.

Mizuguchi, R., Sugimori, M., Takebayashi, H., Kosako, H., Nagao, M., Yoshida, S., Nabeshima, Y., Shimamura, K. and Nakafuku, M. (2001). Combinatorial roles of *olig2* and *neurogenin2* in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. *Neuron* **31**, 757-71.

Mo, Z., Li, S., Yang, X. and Xiang, M. (2004). Role of the *Barhl2* homeobox gene in the specification of glycinergic amacrine cells. *Development* **131**, 1607-18.

Morikawa, Y., D'Autreaux, F., Gershon, M. D. and Cserjesi, P. (2007). *Hand2* determines the noradrenergic phenotype in the mouse sympathetic nervous system. *Dev Biol* **307**, 114-26.

Nakada, Y., Hunsaker, T. L., Henke, R. M. and Johnson, J. E. (2004). Distinct domains within *Mash1* and *Math1* are required for function in neuronal differentiation versus neuronal cell-type specification. *Development* **131**, 1319-30.

Nakhai, H., Sel, S., Favor, J., Mendoza-Torres, L., Paulsen, F., Duncker, G. I. and Schmid, R. M. (2007). Ptf1a is essential for the differentiation of GABAergic and glycinergic amacrine cells and horizontal cells in the mouse retina. *Development* **134**, 1151-60.

Nelson, B. R., Hartman, B. H., Ray, C. A., Hayashi, T., Bermingham-McDonogh, O. and Reh, T. A. (2009). Acheate-scute like 1 (*Ascl1*) is required for normal delta-like (*Dll*) gene expression and notch signaling during retinal development. *Dev Dyn* **238**, 2163-78.

Nieuwkoop, P. D. (1967). The "organization centre". 3. Segregation and pattern formation in morphogenetic fields. *Acta Biotheor* **17**, 178-94.

Ohnuma, S., Mann, F., Boy, S., Perron, M. and Harris, W. A. (2002). Lipofection strategy for the study of *Xenopus* retinal development. *Methods* **28**, 411-9.

Ohsawa, R. and Kageyama, R. (2008). Regulation of retinal cell fate specification by multiple transcription factors. *Brain Res* **1192**, 90-8.

Osorio, J., Mueller, T., Retaux, S., Vernier, P. and Wullimann, M. F. (2010). Phylotypic expression of the bHLH genes *Neurogenin2*, *Neurod*, and *Mash1* in the mouse embryonic forebrain. *J Comp Neurol* **518**, 851-71.

Parain, K., Mazurier, N., Bronchain, O., Borday, C., Cabochette, P., Chesneau, A., Colozza, G., El Yakoubi, W., Hamdache, J., Locker, M. et al. (2011). A large scale screen for neural stem cell markers in *Xenopus* retina. *Dev Neurobiol*.

Park, C. H., Kang, J. S., Kim, J. S., Chung, S., Koh, J. Y., Yoon, E. H., Jo, A. Y., Chang, M. Y., Koh, H. C., Hwang, S. et al. (2006). Differential actions of the proneural genes encoding Mash1 and neurogenins in Nurr1-induced dopamine neuron differentiation. *J Cell Sci* **119**, 2310-20.

Parlier, D., Ariza, A., Christulia, F., Genco, F., Vanhomwegen, J., Kricha, S., Souopgui, J. and Bellefroid, E. J. (2008). *Xenopus* zinc finger transcription factor IA1 (Insm1) expression marks anteroventral noradrenergic neuron progenitors in *Xenopus* embryos. *Dev Dyn* **237**, 2147-57.

Parras, C. M., Schuurmans, C., Scardigli, R., Kim, J., Anderson, D. J. and Guillemot, F. (2002). Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Dev* **16**, 324-38.

Pattyn, A., Simplicio, N., van Doorninck, J. H., Goridis, C., Guillemot, F. and Brunet, J. F. (2004). Ascl1/Mash1 is required for the development of central serotonergic neurons. *Nat Neurosci* **7**, 589-95.

Peltopuro, P., Kala, K. and Partanen, J. (2010). Distinct requirements for Ascl1 in subpopulations of midbrain GABAergic neurons. *Dev Biol* **343**, 63-70.

Perron, M., Opdecamp, K., Butler, K., Harris, W. A. and Bellefroid, E. J. (1999). X-ngnr-1 and Xath3 promote ectopic expression of sensory neuron markers in the neurula ectoderm and have distinct inducing properties in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14996-5001.

Powell, L. M. and Jarman, A. P. (2008). Context dependence of proneural bHLH proteins. *Curr Opin Genet Dev* **18**, 411-7.

Roybon, L., Deierborg, T., Brundin, P. and Li, J. Y. (2009). Involvement of Ngn2, Tbr and NeuroD proteins during postnatal olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci* **29**, 232-43.

Rupp, R. A., Snider, L. and Weintraub, H. (1994). *Xenopus* embryos regulate the nuclear localization of XMyoD. *Genes Dev* **8**, 1311-23.

Schuurmans, C., Armant, O., Nieto, M., Stenman, J. M., Britz, O., Klenin, N., Brown, C., Langevin, L. M., Seibt, J., Tang, H. et al. (2004). Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways. *EMBO J* **23**, 2892-902.

Schuurmans, C. and Guillemot, F. (2002). Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Curr Opin Neurobiol* **12**, 26-34.

Souopgui, J., Klisch, T. J., Pieler, T. and Henningfeld, K. A. (2007). Expression and regulation of *Xenopus* CRMP-4 in the developing nervous system. *Int J Dev Biol* **51**, 339-43.

Suga, A., Taira, M. and Nakagawa, S. (2009). LIM family transcription factors regulate the subtype-specific morphogenesis of retinal horizontal cells at post-migratory stages. *Dev Biol* **330**, 318-28.

Taelman, V., Van Wayenbergh, R., Solter, M., Pichon, B., Pieler, T., Christophe, D. and Bellefroid, E. J. (2004). Sequences downstream of the bHLH domain of the *Xenopus* hairy-related transcription factor-1 act as an extended dimerization domain that contributes to the selection of the partners. *Dev Biol* **276**, 47-63.

Talikka, M., Perez, S. E. and Zimmerman, K. (2002). Distinct patterns of downstream target activation are specified by the helix-loop-helix domain of proneural basic helix-loop-helix transcription factors. *Dev Biol* **247**, 137-48.

Tomita, K., Moriyoshi, K., Nakanishi, S., Guillemot, F. and Kageyama, R. (2000). Mammalian achaete-scute and atonal homologs regulate neuronal versus glial fate determination in the central nervous system. *EMBO J* **19**, 5460-72.

Tomita, K., Nakanishi, S., Guillemot, F. and Kageyama, R. (1996). Mash1 promotes neuronal differentiation in the retina. *Genes Cells* **1**, 765-74.

Turner, D. L. and Weintraub, H. (1994). Expression of achaete-scute homolog 3 in *Xenopus* embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev* **8**, 1434-47.

Wang, J. C. and Harris, W. A. (2005). The role of combinational coding by homeodomain and bHLH transcription factors in retinal cell fate specification. *Dev Biol* **285**, 101-15.

Wilson, S. W. and Rubenstein, J. L. (2000). Induction and dorsoventral patterning of the telencephalon. *Neuron* **28**, 641-51.

Zaghloul, N. A. and Moody, S. A. (2007). Changes in Rx1 and Pax6 activity at eye field stages differentially alter the production of amacrine neurotransmitter subtypes in *Xenopus*. *Mol Vis* **13**, 86-95.

Zordan, P., Croci, L., Hawkes, R. and Consalez, G. G. (2008). Comparative analysis of proneural gene expression in the embryonic cerebellum. *Dev Dyn* **237**, 1726-35.

LEGENDS

Figure 1: *Ascl1* is required for retinal GABAergic cell genesis.

Whole mount in situ hybridization on stage 35 embryos following *Ascl1* or control morpholino (Mo) injection in one blastomere at the two-cell stage. Shown for each indicated probe are representative pictures of the observed labelling in the head region (lateral views, anterior on the left) and on retinal cross sections (dorsal side up). The expression of the pan-neuronal marker *Bru* (A,B) is not affected by *Ascl1* knockdown while *gad1* and *Ptf1a* staining is severely reduced (C-F). *VGlut1* expression (G,H) is unequally affected in the different cell layers: decreased in the photoreceptor layer (white arrow), and extended in the inner nuclear layer (white arrowhead). L: Lens. Scale bar represents 300µm (heads) or 50µm (sections).

Figure 2: *Ascl1* overexpression in the retina promotes *Ptf1a* expression and favours GABAergic cell genesis.

(A,B) Whole mount *Ptf1a* in situ hybridization on stage 26 embryos following *Ascl1*-GR mRNA injection in one blastomere at the four-cell stage and dex treatment at stage 20. Shown are representative pictures of the observed labelling in the head region (lateral views, anterior on the left) and on retinal cross sections (dorsal side up). *Ascl1* overexpression leads to a significant increase of *Ptf1a* staining. (C-F) Cell fate analysis following overexpression of the indicated construct by either mRNA injection in one blastomere at the four-cell stage and dex treatment at stage 16 (C,D; analysis at stage 38) or in vivo lipofection at the neurula stage (E,F; analysis at stage 41). In both cases, GFP was used as a tracer to visualize injected/transfected cells. Note that *Ascl1*, *Neurog2* and *Atoh7* lipofections all result in an increased percentage of cells in the ganglion cell layer but only *Ascl1*-overexpressing cells are biased towards a GABAergic destiny. (G) Typical sections of stage 41 retinas lipofected with

GFP plus *Ascl1*, immunostained with anti-GABA (red) and anti-GFP (green) antibodies. Panels on the right are higher magnifications of the dotted square delineated region. The dotted line indicates the inner plexiform layer, with the ganglion cell layer on the left and the inner nuclear layer on the right. White arrow points to a transfected GABA-positive cell within the ganglion cell layer. Total number of analyzed retinas and counted cells per condition is indicated in each bar. Values are given as mean $\pm$ s.e.m. $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**), $p < 0,05$ (*) (Student's t-test). Scale bar represents 300 μ m (heads) or 50 μ m (sections).

Figure 3: Comparison of GABAergic and glutamatergic inducing activities of five different bHLH factors.

(A-D) Whole mount in situ hybridization analyses of *tubb2b*, *VGlut1* or *gad1* expression on stage 24 embryos injected with the indicated mRNAs in one blastomere at the two-cell stage. (A) Arrows indicate ectopic expression in the epidermis (anterior on the left, dorsal side up). All the tested bHLH factors exhibit neurogenic activity, as inferred from *tubb2b* ectopic expression. However, only *Ascl1* specifically induces *gad1*⁺ neurons without inducing *VGlut1*⁺ ones. (B,C) Quantification of embryos displaying *VGlut1* (B) or *gad1* (C) ectopic expression. *Ascl1* interferes with *Ptfla*-, *Neurog2*-, *NeuroD1*- and *Atoh7*-dependent production of *VGlut1*⁺ neurons, while none of these factors affect *Ascl1* GABAergic inducing activity. (D) Quantification of embryos with weak or strong ectopic *gad1* staining following mRNA injection of *Ascl1* alone or together with *Neurog2*. Note that *Neurog2* enhances *Ascl1* GABAergic inducing activity. (E) Quantification of GABAergic cell proportion among transfected cells in the ganglion cell layer following injection of the indicated mRNAs in one blastomere of four-cell stage embryos and dex treatment at stage 16. Total number of analyzed embryos (B-D) or analyzed retinas and counted cells (E) per condition is indicated in each bar. $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**), $p < 0,05$ (*) (B-D: binomial test, error bars represent

95% confidence intervals; E: Student's t-test; values are given +/- s.e.m). Scale bar represents 500µm.

Figure 4: Comparison of the catecholaminergic inducing activities of five different bHLH factors.

(A) Whole mount in situ hybridization analysis of *TH* expression on stage 24 embryos injected with the indicated mRNAs in one blastomere at the two-cell stage. Arrowheads indicate the position of previously described *TH*-positive antero-ventral neurons (Parlier et al., 2008), while arrows point to ectopic *TH* staining (anterior on the left, dorsal side up). Note that, among all tested bHLH factors, only *Ascl1* induces ectopic *TH* expression. Sibling embryos were also hybridized with the *tubb2b* probe as a positive control (see Figure 3A). (B) Quantification of embryos displaying ectopic *TH*⁺ neurons, showing that *Neurog2* and *Ptfla* significantly reduce the catecholaminergic inducing activity of *Ascl1*. Total number of analyzed embryos per condition is indicated in each bar. Error bars represent 95% confidence intervals. p<0,05 (*) (binomial test). Scale bar represents 500µm.

Figure 5: Mapping of *Ascl1* and *Neurog2* domains accounting for their functional specificity in neuronal subtype specification.

(A) bHLH protein sequences of the Myc-tagged inducible *Ascl1*:*Neurog2* chimeric constructs used in B and C. *Ascl1* and *Neurog2* sequences are depicted in red and black, respectively. (B,C) Embryos were injected in one blastomere at the four-cell stage with the indicated wild-type or chimeric mRNA and dex was added at stage 13. (B) Western-blot using an anti-Myc antibody showing that each chimeric protein has been produced. Detection of GAPDH serves as a loading control. (C) Whole mount in situ hybridization analyses of *dpysl3*, *VGlut1*, *gad1* or *TH* expression on stage 22 or 28 injected embryos (anterior on the right, dorsal side up).

The activity of each construct was scored and is summarized in A. Altogether, these domain-swapping experiments show that the GABAergic inducing activity of *Ascl1* resides in its basic domain, while the glutamatergic inducing activity of *Neurog2* is imparted by its HLH domain. In each panel the number of analysed embryos is indicated. (D,E) Retinal cell fate analysis at stage 41 following *Ascl1* or *A_BN* chimeric construct in vivo lipofection. Similar to *Ascl1*, *A_BN* transfection results in an increased percentage of GABAergic cells in the ganglion cell layer. Total number of analyzed retinas and counted cells per condition is indicated in each bar. Values are given as mean $\pm$ s.e.m. $p < 0,01$ (**), $p < 0,05$ (*) (Student's t-test). Scale bar represents 500 μ m.

Figure 6: Distinct transcriptional networks sustain *Ascl1* GABAergic and catecholaminergic inducing activities.

Whole mount in situ hybridization analyses of *TH* or *gad1* expression on stage 24 embryos following injection of mRNA and/or morpholinos (Mo), as indicated, in one blastomere at the two-cell stage. (A,C) Arrows point to ectopic *TH* or *gad1* expression (anterior on the left, dorsal side up). Sibling embryos were also hybridized with the *tubb2b* probe as a positive control (data not shown). (B,D) Quantification of embryos displaying ectopic *TH* or *gad1* expression. Note that *Phox2a* and *Hand2* knockdown significantly reduces *Ascl1* ability to induce *TH* expression but does not impair its GABAergic inducing activity (B), which specifically depends on *Ptfla* (D). Total number of analyzed embryos per condition is indicated in each bar. Error bars represent 95% confidence intervals. $P < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**) (binomial test). Scale bar represents 500 μ m.

Figure 7: *Ptfla* is a direct transcriptional target of *Ascl1*.

(A) Whole mount in situ hybridization analyses of *Ptfla* expression on stage 22 embryos injected with *Ascl1* or *Neurog2 mRNA* in one blastomere at the two-cell stage. Note that *Ascl1* is able to activate *Ptfla* expression in the epidermis (arrow). Sibling embryos were also hybridized with the *tubb2b* probe as a positive control (data not shown). Scale bar represents 500µm. (B) Quantification of embryos displaying *Ptfla* ectopic expression. Total number of analysed embryos per condition is indicated in each bar. Error bars represent 95% confidence intervals. $P < 0,001$ (***) (binomial test). (C,D) RT-qPCR analyses of *tubb2b* and *Ptfla* expression on embryos injected with *Ascl1-GR* at the two-cell stage and treated with dexamethasone (dex) and/or cycloheximide (CHX) from stage 19 to stage 21. Note that *Ptfla* up-regulation upon dex treatment is maintained in the presence of CHX.

Figure 1 Mazurier *et al.*

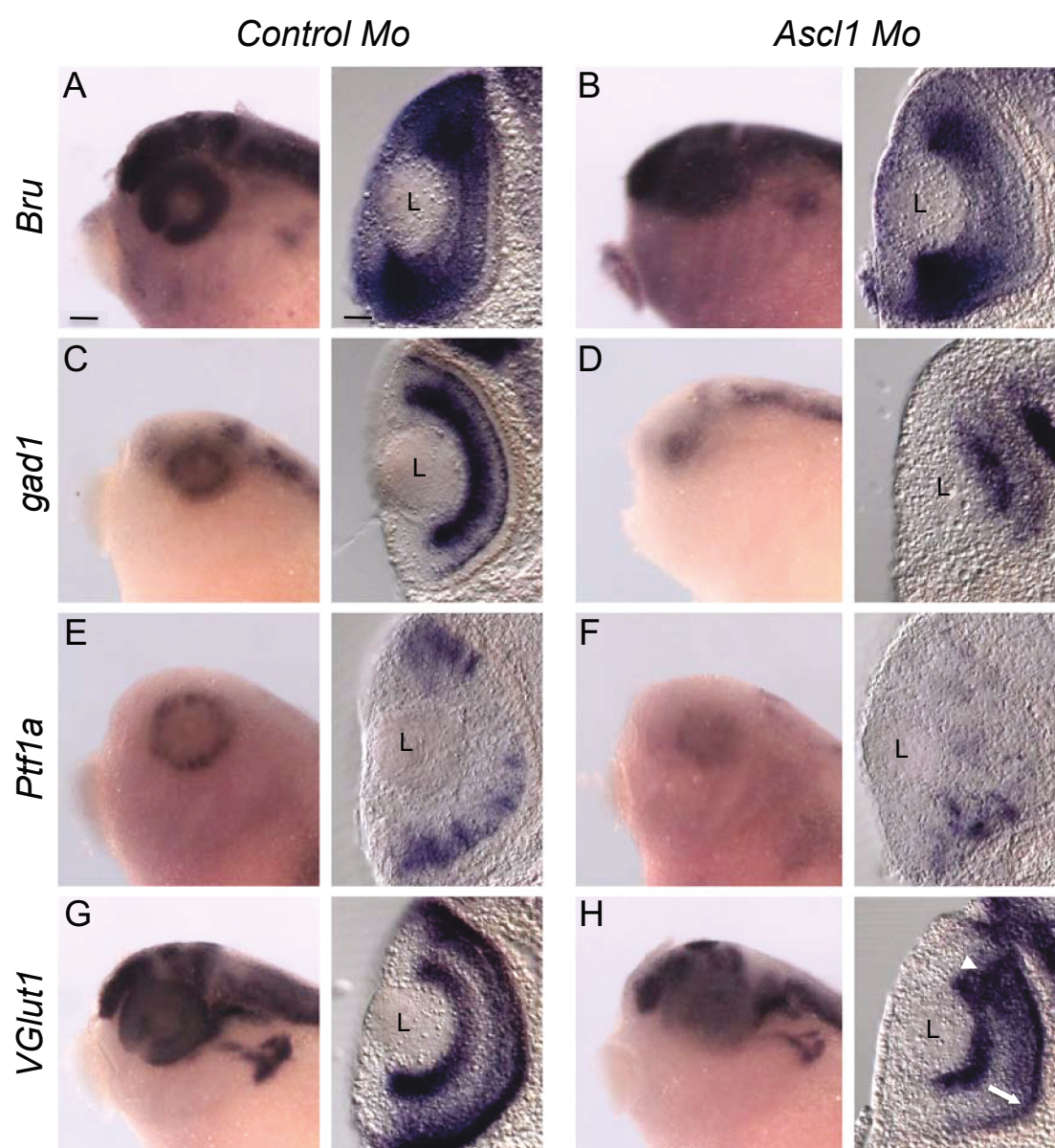


Figure 2 Mazurier *et al.*

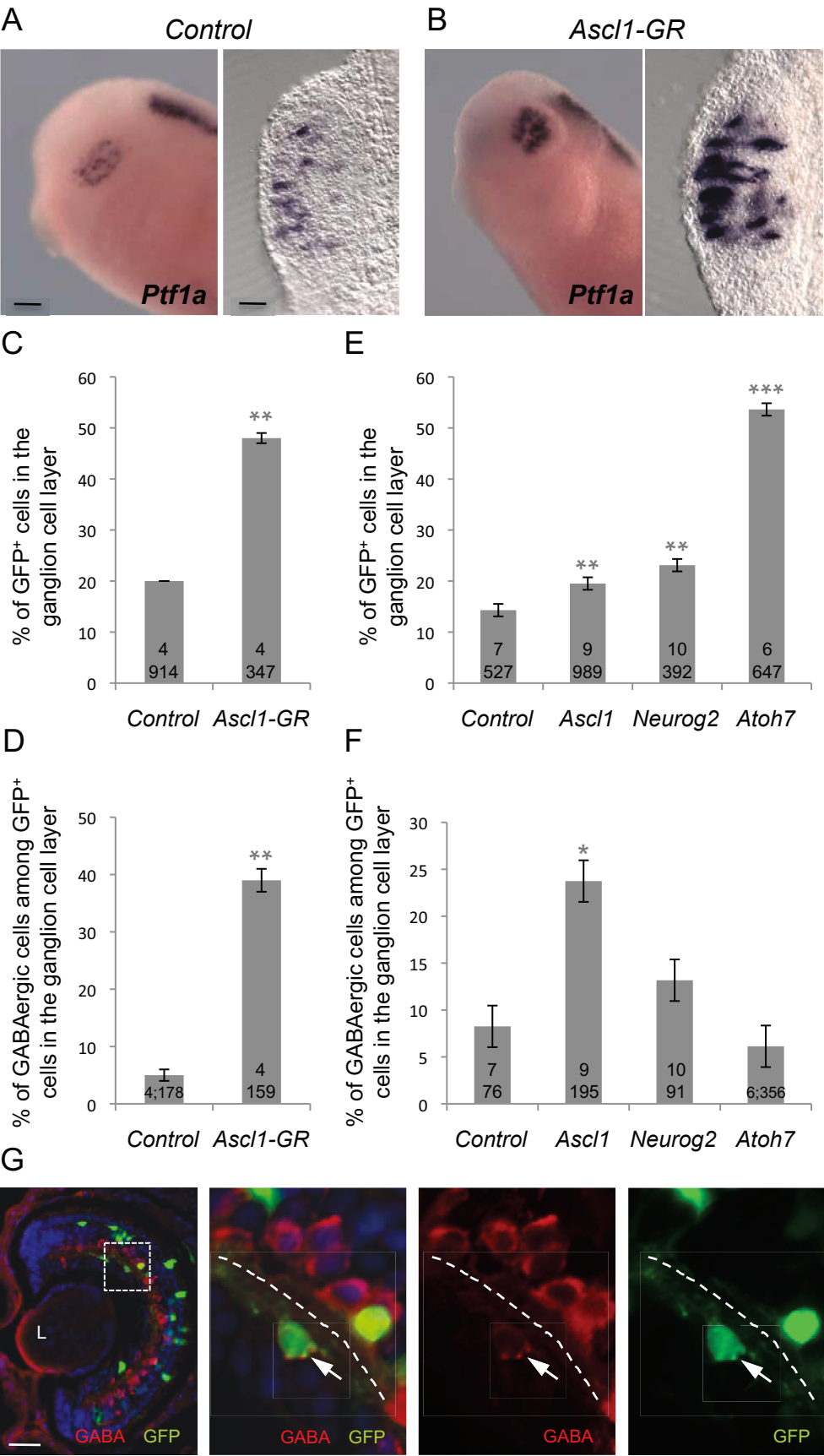
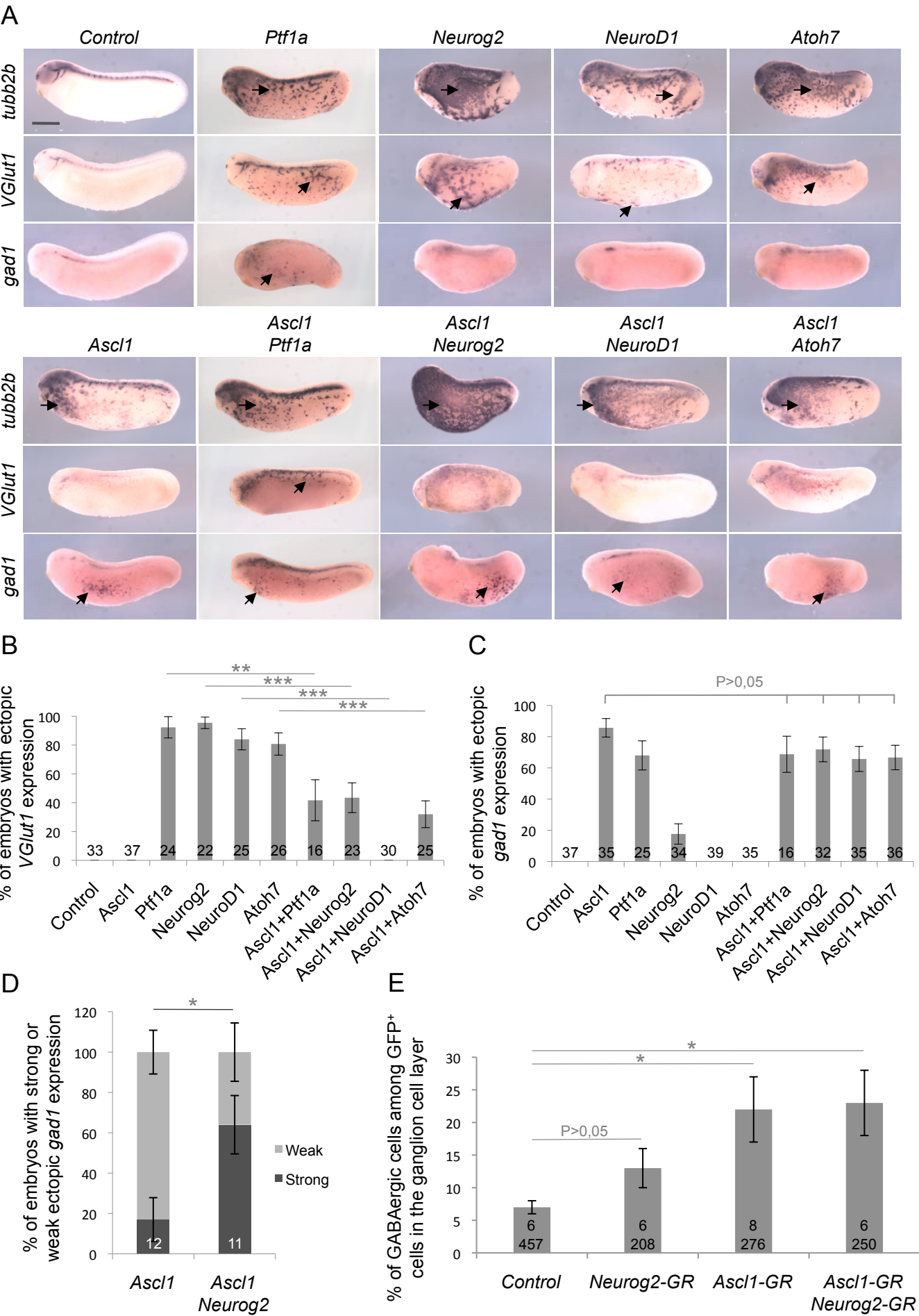


Figure 3 Mazurier *et al.*



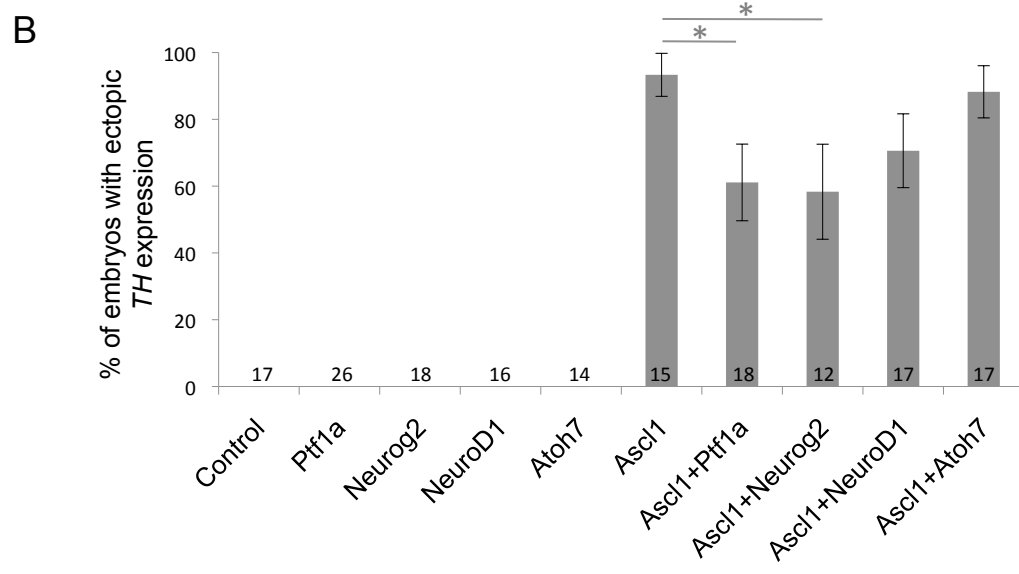
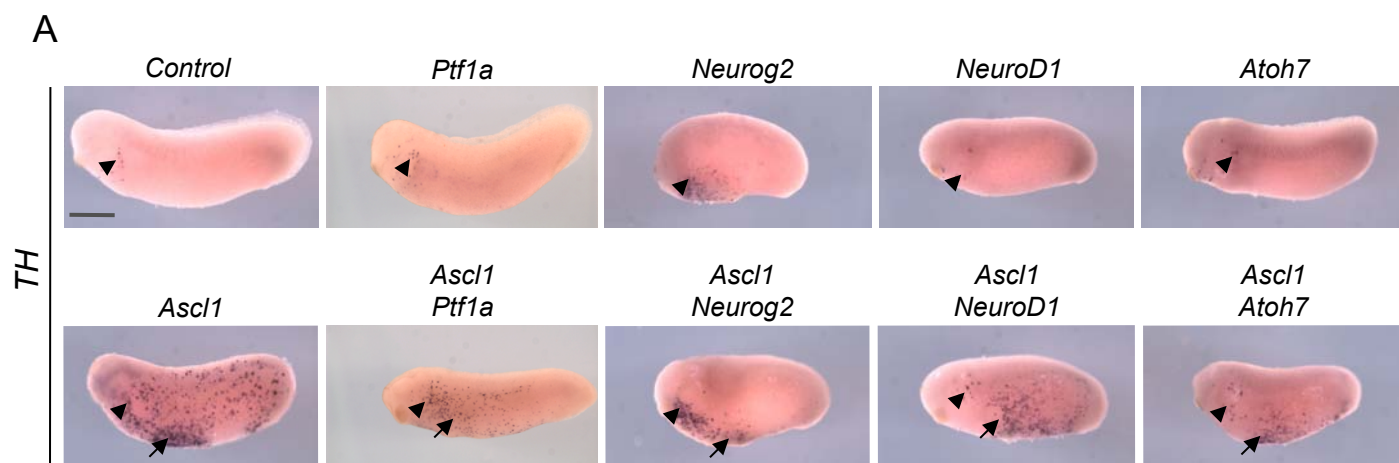


Figure 5 Mazurier *et al.*

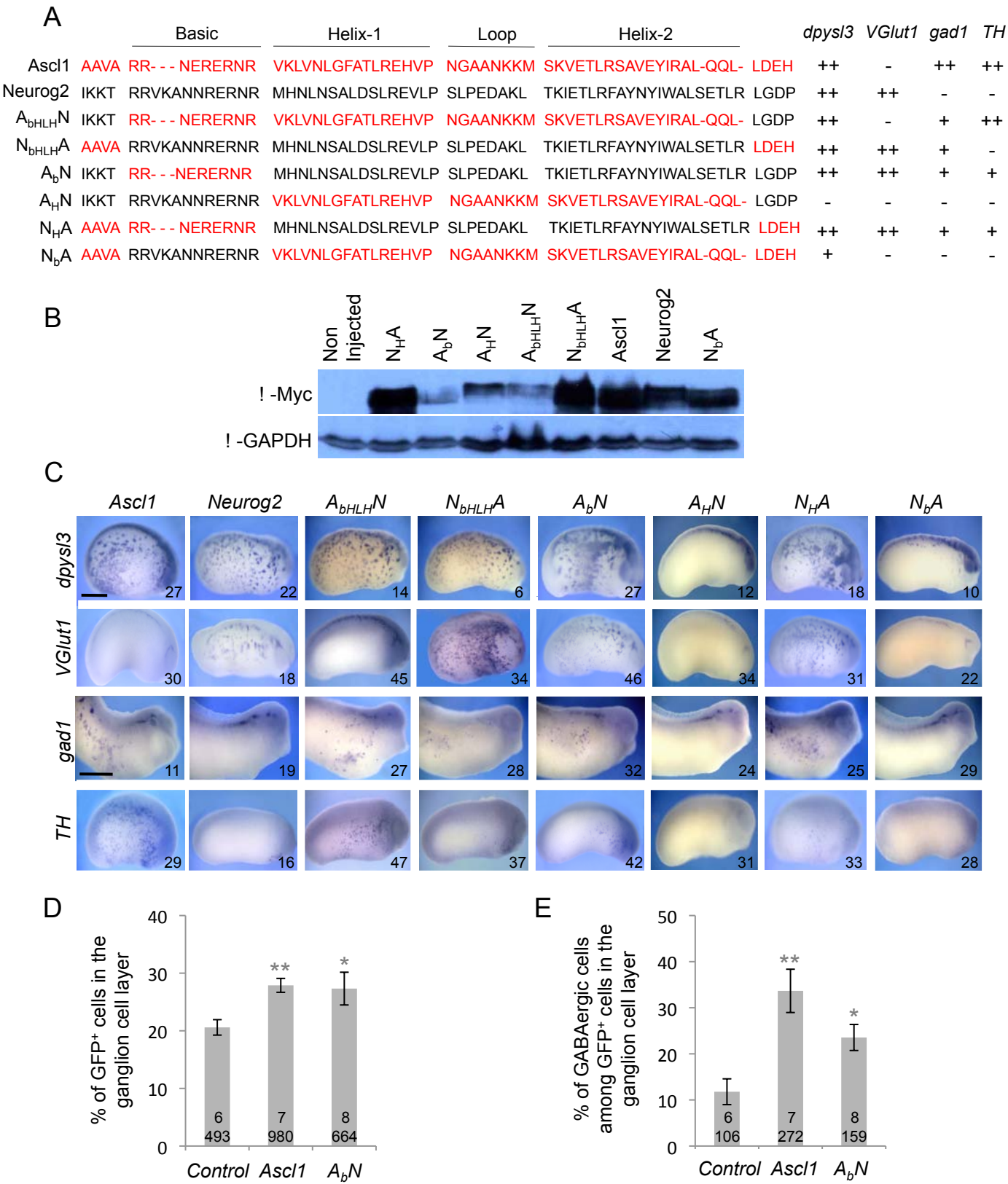


Figure 6 Mazurier *et al.*

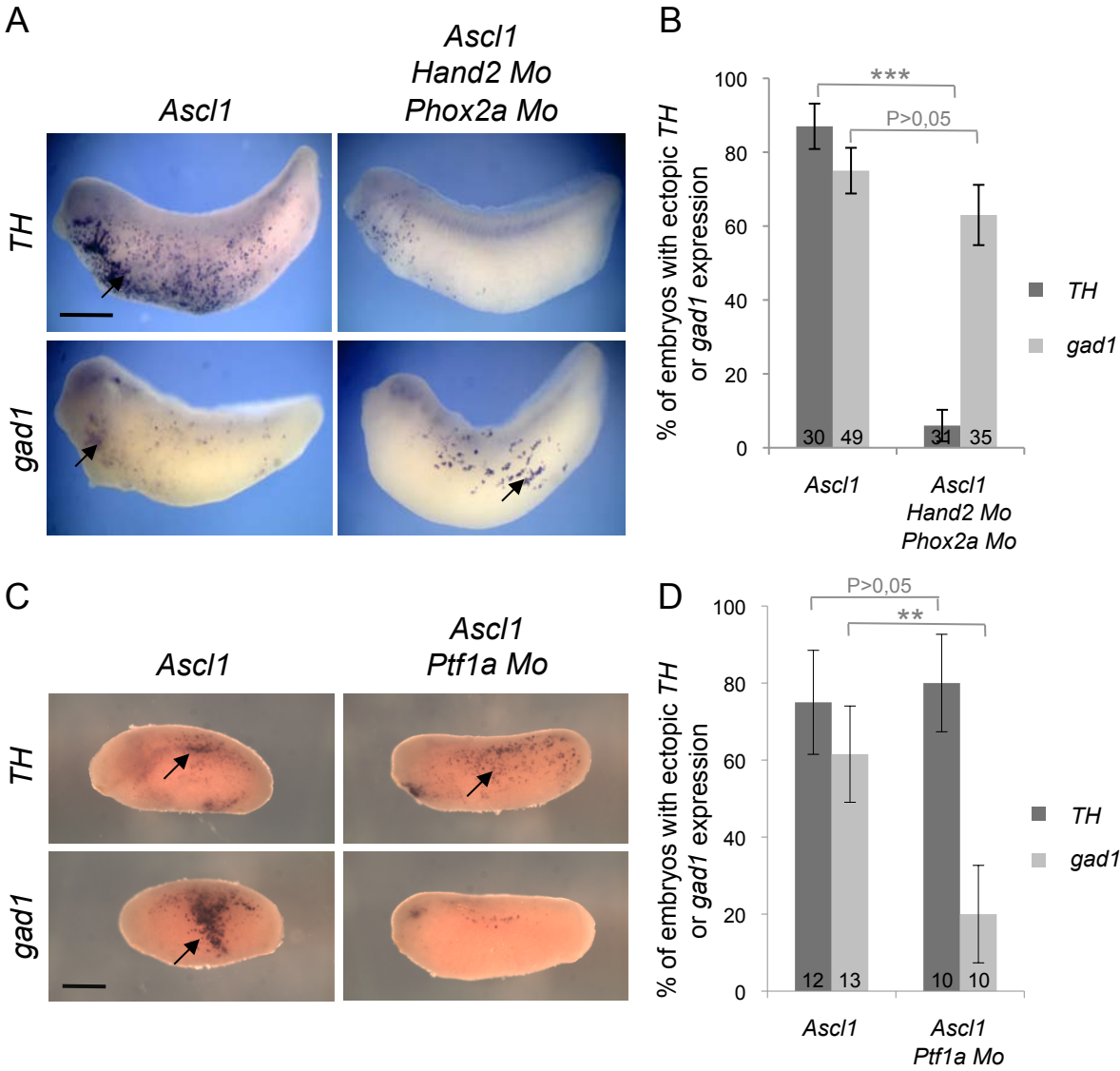
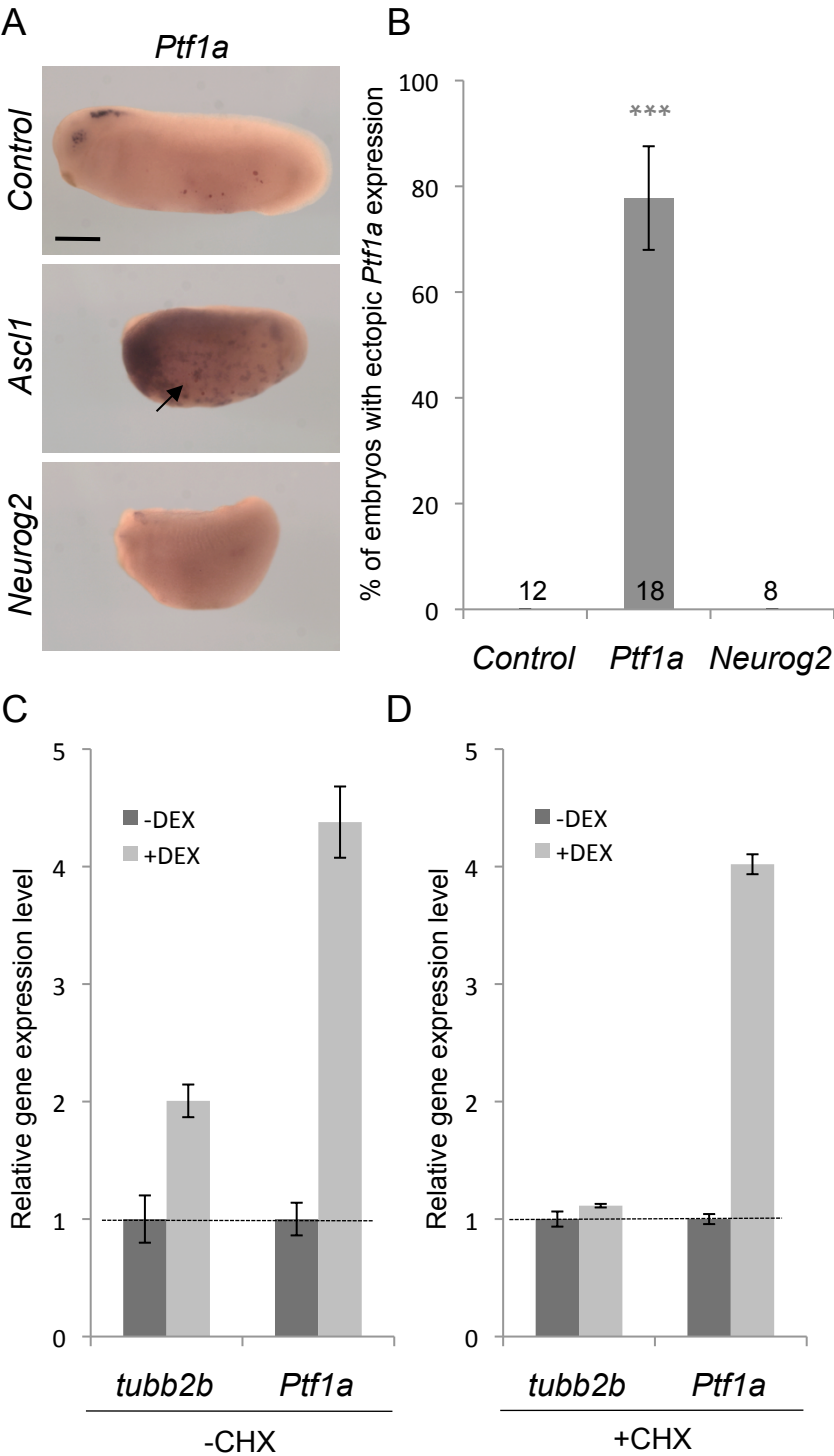


Figure 7 Mazurier *et al.*



2. Contrôle de la balance prolifération/différenciation cellulaire : Rôle des voies de signalisation Wnt et Hedgehog dans les précurseurs rétiniens

En parallèle à mes travaux visant à identifier des facteurs de détermination des neurones de la rétine, j'ai voulu m'intéresser au contrôle de la prolifération des progéniteurs rétiniens. En effet, nous avons vu dans l'Introduction à quel point les mécanismes de contrôle du cycle et de la détermination cellulaire sont couplés. Il me paraissait donc intéressant d'explorer ces deux axes de recherches simultanément.

Je me suis donc impliqué dans un projet en cours au laboratoire sur le rôle des voies de signalisation Wnt et Hedgehog dans le contrôle de la balance prolifération/différenciation des cellules progénitrices rétiniennes de la ZMC. Les résultats sont résumés ci-dessous et présentés dans l'article N°2.

Publication :

Borday C, Cabochette P, Parain K, **Mazurier N**, Janssens S, Tran HT, Sekkali B, Bronchain O, Vleminckx K, Locker M and Perron M (2012) Antagonist cross-regulation between Wnt and Hedgehog signaling pathways controls post-embryonic retinal proliferation. *Development*, 139(19):3499-509.

Pour situer le contexte de ce projet de recherche, je voudrais rappeler brièvement quelques données de la littérature. Tout d'abord, le laboratoire avait ces dernières années montré l'importance des voies Wnt et Hedgehog dans le contrôle de la prolifération des progéniteurs rétiniens (Locker et al., 2006 ; Agathocleous et al., 2007; Dennayer et al., 2008). Il était cependant difficile de prédire comment ces deux voies interagiraient dans ce processus. Les relations entre Wnt et Hedgehog sont en effet complexes et diffèrent considérablement d'un contexte cellulaire à l'autre, empêchant l'établissement d'un schéma archétypique. Par exemple, un antagonisme fonctionnel a été décrit dans de nombreux processus développementaux, notamment dans les contextes de « patterning » et de détermination

cellulaire (Ahn et al., 2010; Danesin et al., 2009; Glise et al., 2002; Tang et al., 2010; Ulloa and Marti, 2010). Par contre, en ce qui concerne la progression du cycle cellulaire, certains travaux suggèrent que les voies agissent de façon synergiques sur les progéniteurs neuronaux au cours du développement (Alvarez-Medina et al., 2009) quand d'autres au contraire montrent des effets antagonistes (Joksimovic et al., 2009). En revanche, dans un contexte de neurogenèse adulte, toutes les données proposent que ces voies ont une influence mitogène sur les précurseurs (Mu et al., 2010), suggérant un mode d'action coopératif. Cependant, ces résultats s'appuient sur des travaux n'examinant qu'une voie à la fois ; aucune étude n'ayant examiné leurs interactions dans ce contexte de neurogenèse. Il paraissait donc tout à fait pertinent d'exploiter notre modèle de neurogenèse rétinienne au sein de la ZMC pour examiner les interactions entre les voies Wnt et Hedgehog et leur impact sur le comportement prolifératif des précurseurs rétiniens.

L'équipe, et en particulier Caroline Borday et Pauline Cabochette, ont donc mis au point l'utilisation d'agents pharmacologiques pour moduler *in vivo* les voies de signalisation Wnt et Hedgehog. Ces approches pharmacologiques, combinées à des approches génétiques ont permis de mettre en évidence que :

- (i) Les ligands Wnt et Hedgehog sont exprimés dans des territoires mutuellement exclusifs dans la rétine post-embryonnaire suggérant des gradients d'activité opposés de ces deux voies de signalisation au sein de la ZMC.
- (ii) Les voies Wnt et Hedgehog ont des impacts opposés sur la prolifération dans la ZMC
- (iii) Les voies de signalisation Wnt et Hedgehog régulent négativement leurs activités respectives, *via* la régulation transcriptionnelle de *Sfrp1* (inhibiteur de la voie Wnt) par la voie Hedgehog et de *Gli3* (répresseur de la voie Hedgehog) par la voie Wnt.

A ce stade de l'étude, les interactions entre les voies Wnt et Hedgehog étaient claires mais l'impact de ces voies sur le comportement prolifératif des précurseurs rétiniens posait plusieurs questions. L'équipe avait montré il y a quelques années que des changements du nombre de cellules BrdU positives pouvaient refléter soit des modifications de la cinétique du cycle, soit des effets au niveau du moment de la sortie du cycle cellulaire (Locker et al., 2006). Il nous a donc paru important de mieux évaluer l'incidence des modifications des voies

Wnt et Hedgehog sur ces paramètres du cycle. C'est à cette étape du projet que j'ai commencé à collaborer avec les membres du laboratoire sur ce thème.

Afin de savoir si les voies de signalisation Wnt et Hedgehog pouvaient avoir un impact sur la sortie du cycle cellulaire, nous avons réalisé des expériences de « birthdating ». Les résultats obtenus suggèrent que la voie Hedgehog pousse les cellules vers la sortie du cycle cellulaire tandis que la voie Wnt maintient les cellules dans le cycle plus longtemps que dans une situation contrôle.

En ce qui concerne l'influence des voies sur sa cinétique du cycle, nous avons réalisé différentes techniques. Comme ces approches expérimentales ne sont pas présentées dans l'article N°2, je les ai détaillées dans l'Annexe N°2. De même, comme les résultats de ces expériences n'ont pas tous été inclus dans l'article, je les présente en détail ci-dessous.

▪ **Calcul de d'indice mitotique**

Dans un premier temps, nous avons cherché à estimer l'indice mitotique, pourcentage de cellules en mitose, au sein de la ZMC, après perturbations des voies signalisation Wnt et Hedgehog afin de savoir si ces voies pouvaient affecter la cinétique du cycle cellulaire des précurseurs rétinien. L'approche choisie consistait à combiner un marquage des cellules en phase M (à l'aide d'anticorps anti-phospho HistoneH3, P-H3) et un marquage de l'ensemble des cellules cyclantes (à l'aide d'anticorps anti-PCNA, proliferating cell nuclear antigen). Le nombre de cellules en phase M par rapport au nombre total de cellule cyclantes est proportionnelle à la durée de la phase M par rapport à la durée totale du cycle (Nowakowski et al., 1989). Si l'on considère que la durée de la phase M comme constante, une variation du rapport P-H3/PCNA (indice mitotique) reflète alors une variation de la durée du cycle cellulaire.

Suite à 24 heures de traitements pharmacologiques, sur des têtards au stade 39, réalisés pour perturber les voies Wnt et Hedgehog, nous avons comparé les proportions de cellules P-H3+ parmi les cellules PCNA+ dans la ZMC. Nous avons observé une diminution significative de l'indice mitotique suite à l'activation de la voie Wnt, suggérant une

augmentation de la durée du cycle total. Aucun effet significatif n'a été mis en évidence dans le cas des autres traitements pharmacologiques (**Figure 49**).

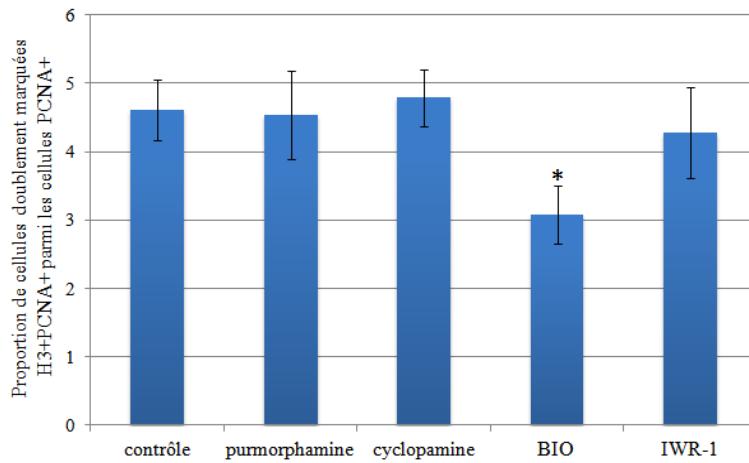


Figure 49 : Indices mitotiques après perturbations des voies Wnt et Hedgehog dans la ZMC. Le graphique représente la proportion de cellules doublement marquées p-H3+/PCNA+ parmi les cellules simplement marquées PCNA+. La purmorphamine et la cycloamine sont respectivement un agoniste et un antagoniste de la voie Hedgehog. BIO et IWR-1 sont

respectivement un agoniste et un antagoniste de la voie Wnt. Valeurs moyennées $\pm$ s.e.m ; $P < 0,05$ (*) ; t-test. N=6 rétines pour chaque condition.

▪ Calcul de la durée du cycle cellulaire par la technique de double marquage IddU/CldU

Afin de quantifier plus précisément l'impact des voies de signalisation Wnt et Hedgehog sur la durée du cycle cellulaire, nous avons réalisé des doubles marquages d'analogues de la thymidine, IddU/CldU (iododéoxyuridine/chlorodéoxyuridine), sur des têtards traités comme précédemment avec les agents pharmacologiques pour perturber les voies Wnt et Hedgehog. Comme décrit en Annexe N°2, cette technique consiste à réaliser des pulses successifs de deux analogues de la thymidine et de discriminer les populations cellulaires simplement ou doublement marquées, ce qui permet de calculer la durée du cycle cellulaire total (Tc) et la durée de la phase S (Ts).

Les premiers essais réalisés montrent que la durée du cycle cellulaire est plus lente que la voie Wnt soit activée (BIO) ou inhibée (IWR-1). L'effet de la perturbation de la voie Hedgehog par la purmorphamine (activateur) ou la cycloamine (inhibiteur) entraîne très peu d'effet sur la Tc (**Figure 50**). Cependant, lors des comptages des cellules marquées dans la ZMC, nous avons remarqué des différences d'intensité de marquages des cellules CldU+ et

des cellules IddU⁺. Ces observations nous ont conduit à émettre l'hypothèse que des cellules faiblement CldU pouvaient ne pas être détectables et donc biaiser nos analyses.

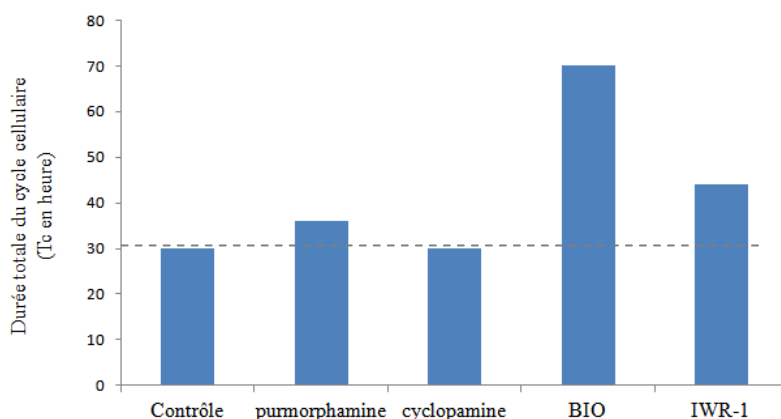


Figure 50 : L'activation de la voie Wnt augmente la durée du cycle cellulaire dans la ZMC. La purmorphamine et la cyclopamine sont respectivement un agoniste et un antagoniste de la voie Hedgehog. BIO et IWR-1 sont respectivement un agoniste et un antagoniste de la voie Wnt. Le graphique représente la

durée totale du cycle cellulaire (Tc) en heure en fonction des traitements. La ligne en pointillée permet de comparer la durée Tc des embryons traités avec les contrôles.

▪ Calcul de la durée du cycle cellulaire par la technique de double marquage EdU/IddU

Nous avons donc utilisé un autre analogue de la thymidine, l'EdU pour réaliser des doubles marquages EdU/IddU. Les résultats de cette expérience sont présentés dans la **Figure 51**.

Les données montrent que l'activation et l'inhibition de la voie Hedgehog mènent respectivement à une accélération et un ralentissement de la vitesse du cycle cellulaire. Des résultats inverses sont observés lorsque la voie Wnt est perturbée, suggérant que ces deux voies ont des effets opposés sur la cinétique du cycle cellulaire. Ces résultats tout à fait intéressants demandent cependant à être reproduits sur des échantillons plus importants car seul l'effet fort de BIO était significatif dans cette expérience.

D'autre part, comme précédemment, j'ai pu observer des biais expérimentaux pouvant influencer les résultats obtenus, les intensités de marquages de l'EdU et de l'IddU n'étant pas identiques. Nous avons donc voulu, plutôt que de recommencer cette expérience, comparer

ces résultats avec ceux obtenus par une autre technique pour estimer la cinétique du cycle cellulaire, le marquage cumulatif.

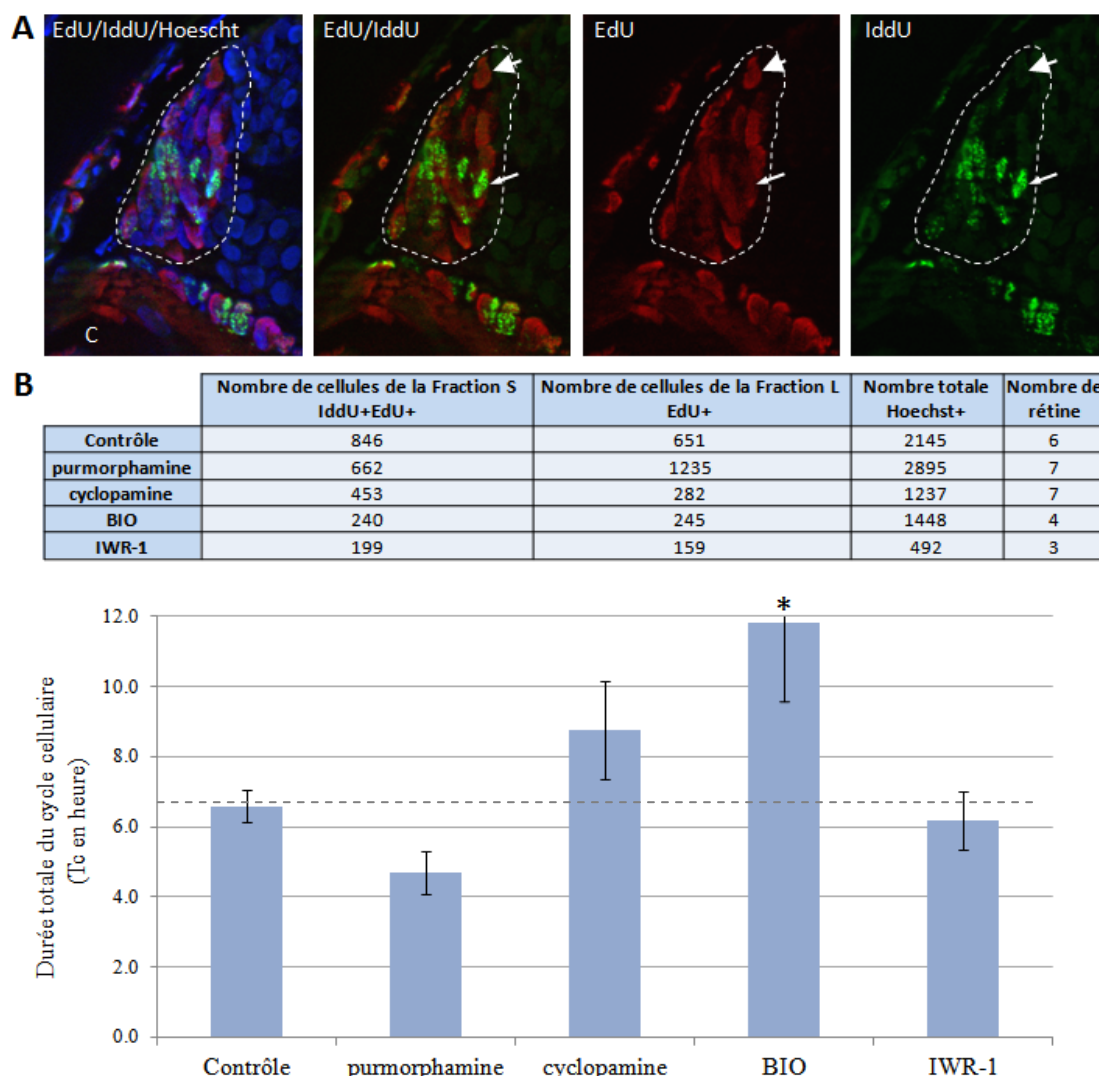


Figure 51 : Les voies de signalisation Hedgehog et Wnt agissent de façon opposée sur la durée du cycle cellulaire dans la ZMC. (A) Double immuno-marquage de l'EdU (rouge) et de l'IddU (vert) sur des sections de rétines au stade 42. Les noyaux sont marqués par une coloration au Hoechst (bleu). Les flèches pointent des cellules doublement marquées EdU+/IddU+ (petite flèche) ou simplement marquées EdU+ (grande flèche) (B) Tableau de dénombrement des fractions S, L et du nombre total de cellules en cas d'activation ou d'inhibition des voies de signalisation Hedgehog et Wnt (voir annexe N°2). La purmorphamine et la cyclopamine sont respectivement un agoniste et un antagoniste de la voie Hedgehog. BIO et IWR-1 sont respectivement un agoniste et un antagoniste de la voie Wnt. Le nombre de rétines est indiqué pour chaque condition expérimentale. Le graphique représente la durée totale du cycle cellulaire (Tc) en heure en fonction des traitements. La ligne en pointillée permet de comparer la durée Tc des embryons traités avec les contrôles. Valeurs moyennées $\pm$ s.e.m ; $P < 0,05$ (*) ; t-test.

- **Calcul de la durée du cycle cellulaire par la technique de marquage cumulatif à l'EdU**

Le marquage cumulatif à l'EdU vise à suivre le nombre de progéniteurs rétiniens ayant incorporé l'analogue de la thymidine, l'EdU, suite à différents temps d'exposition à celui-ci. Comme précédemment, cette technique permet d'évaluer la durée du cycle total et celle de la phase S (voir Annexe 2). Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 52**.

Les données obtenues par cette technique ne sont pas en accord avec celles de la méthode de double marquage. D'une part, la durée du cycle cellulaire en condition contrôle est évaluée ici à environ 15h *versus* 7h dans l'expérience précédente. Il est difficile d'évaluer la fiabilité de ces techniques étant donné que nous avons rencontré des problèmes expérimentaux pour chacune d'elle. Dans le cas de l'EdU cumulatif, certains comptages cellulaires paraissent surprenants. Par exemple, en situation contrôle, nous avons une proportion de cellules EdU+ après 4h d'incorporation de l'EdU inférieure à celle obtenue après 3h. Même situation dans la condition BIO, où nous avons une proportion de cellules EdU+ plus faible après 6h d'incorporation qu'après 4h (**Figure 52A**). Il est toutefois intéressant de noter que la durée du cycle cellulaire est modifiée suite à la perturbation de la voie Wnt avec une augmentation suite au traitement BIO et une diminution suite à l'IWR-1. Ceci confirme nos données précédentes et suggère que la voie Wnt module négativement la durée du cycle cellulaire.

Pour conclure, les effets opposés des voies Wnt et Hedgehog sur le moment de sortie du cycle cellulaire permettent d'expliquer les effets opposés observés sur la prolifération dans la ZMC. Dans l'ensemble, ces travaux ont donc permis de révéler un antagonisme inattendu entre les signaux Wnt et Hedgehog qui permettrait de réguler finement le niveau de prolifération des cellules souches et progénitrices de la rétine. Ce travail contribue donc à l'avancée de nos connaissances sur le réseau de signalisation impliqué dans la balance entre prolifération et différenciation.

Nos résultats préliminaires suggèrent que les voies Wnt et Hedgehog pourraient également jouer sur la vitesse de division cellulaire des cellules de la ZMC. Cependant, bien que les résultats obtenus en perturbant la voie Wnt montrent toujours les mêmes tendances, ce n'est pas le cas pour la voie Hedgehog, où les résultats diffèrent selon la technique utilisée.

Par conséquent, il est nécessaire de poursuivre ces travaux pour pouvoir comparer les effets sur la cinétique du cycle cellulaire de la voie de signalisation Hedgehog à ceux de la voie Wnt et ainsi mieux comprendre leur rôle dans le contrôle de la prolifération des précurseurs rétiniens.

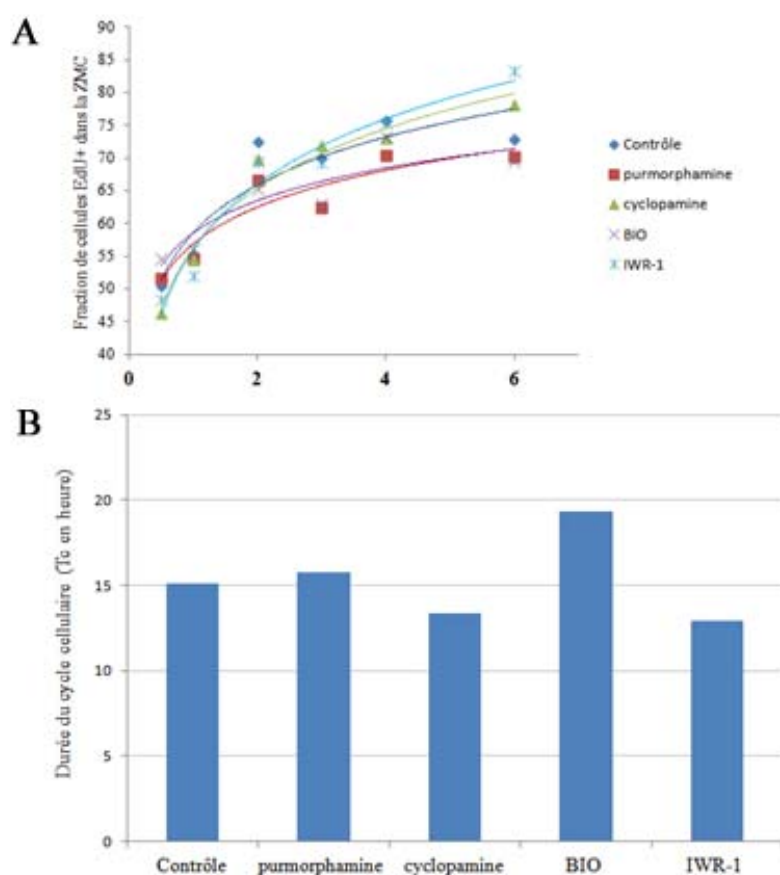


Figure 52 : Durées du cycle cellulaire des précurseurs de la ZMC après perturbations des voies Wnt et Hedgehog. (A) Représentation graphique de la fraction de cellules EdU+ en fonction du temps d'incorporation d'EdU en cas d'activation ou d'inhibition des voies de signalisation Hedgehog et Wnt. Le calcul de la durée du cycle cellulaire en condition contrôle est présenté en Annexe 2. (B) Le graphique représente la durée totale du cycle cellulaire (Tc) en heure en fonction des traitements.

Article N°2

*Antagonistic cross-regulation between Wnt
and Hedgehog signaling pathways controls
post-embryonic retinal proliferation*

Development 139, 3499–3509 (2012) doi:10.1242/dev.079582
 © 2012. Published by The Company of Biologists Ltd

Antagonistic cross-regulation between Wnt and Hedgehog signalling pathways controls post-embryonic retinal proliferation

Caroline Borday^{1,*}, Pauline Cabochette^{1,*}, Karine Parain¹, Nicolas Mazurier¹, Sylvie Janssens², Hong Thi Tran², Belaïd Sekkali², Odile Bronchain¹, Kris Vleminckx², Morgane Locker¹ and Muriel Perron^{1,‡}

SUMMARY

Continuous neurogenesis in the adult nervous system requires a delicate balance between proliferation and differentiation. Although Wnt/ β -catenin and Hedgehog signalling pathways are thought to share a mitogenic function in adult neural stem/progenitor cells, it remains unclear how they interact in this process. Adult amphibians produce retinal neurons from a pool of neural stem cells localised in the ciliary marginal zone (CMZ). Surprisingly, we found that perturbations of the Wnt and Hedgehog pathways result in opposite proliferative outcomes of neural stem/progenitor cells in the CMZ. Additionally, our study revealed that Wnt and Hedgehog morphogens are produced in mutually exclusive territories of the post-embryonic retina. Using genetic and pharmacological tools, we found that the Wnt and Hedgehog pathways exhibit reciprocal inhibition. Our data suggest that *Sfrp-1* and *Gli3* contribute to this negative cross-regulation. Altogether, our results reveal an unexpected antagonistic interplay of Wnt and Hedgehog signals that may tightly regulate the extent of neural stem/progenitor cell proliferation in the *Xenopus* retina.

KEY WORDS: Neural stem cells, Retina, Wnt and Hedgehog signalling

INTRODUCTION

Neural stem cells (NSCs) proliferate and generate new neurons throughout the lifetime in neurogenic areas of the adult brain. Identifying microenvironmental cues that tightly control their self-renewal, proliferation and lineage decisions is crucial for the development of novel therapies in regenerative medicine. Among key diffusible factors, Sonic hedgehog (Shh) is thought to be involved in adult NSC maintenance and proliferation control (Ahn and Joyner, 2005; Balordi and Fishell, 2007; Han et al., 2008; Lai et al., 2003; Machold et al., 2003; Palma et al., 2005; Po et al., 2010). The canonical Wnt pathway has also proven to be an important regulator of proliferation and neurogenesis in adult hippocampal or subventricular zones (Adachi et al., 2007; Kuwabara et al., 2009; Lie et al., 2005). Thus, both signalling pathways seem to share a mitogenic function within these neurogenic niches of the adult nervous system. However, whether the two pathways establish functional interactions in this context has not been addressed. To date, this issue has only been investigated during embryonic development. A recent study reported that these pathways cooperate in the developing spinal cord to coordinately regulate neural cell cycle progression (Alvarez-Medina et al., 2009). This clearly contrasts with the situation described in the midbrain in which Shh repression by Wnt signalling is required for floor plate neurogenesis (Joksimovic et al., 2009). Therefore, despite the vast literature on Wnt and Hedgehog mitogenic effects, the nature of their interactions is difficult to predict and clearly deserves further investigation.

Here, we have addressed this issue in the mature retina by taking advantage of the paradigmatic *Xenopus* ciliary marginal zone (CMZ), a region with active NSCs in its most peripheral region that allows continuous retinal growth during adulthood (Wetts et al., 1989; Perron et al., 1998; Cervený et al., 2011). It was recently demonstrated that these cells in the fish retina are indeed genuine multipotent stem cells (Centanin et al., 2011). We previously showed that canonical Wnt signalling is required to maintain cell proliferation within the CMZ (Denayer et al., 2008). In addition, we found that the Hedgehog pathway has dual functions during retinogenesis, simultaneously promoting cell cycle progression as well as withdrawal of embryonic retinal progenitors (Agathocleous et al., 2007; Locker et al., 2006). Altogether, this precludes a straightforward prediction of how retinal stem/progenitor cells integrate the two signals within the CMZ. Here, we discovered that altering the two pathways leads to opposite proliferative responses. This functional antagonism correlates with non-overlapping production sites of the corresponding morphogens. We also demonstrated that Wnt and Hedgehog signalling pathways restrain each other's activity through the transcriptional regulation of *Gli3* and *Sfrp-1*. We propose a model in which the antagonistic interplay of Wnt and Hedgehog signals, emanating from opposite sides of the CMZ, controls the fine-tuning of post-embryonic proliferation in the retina.

MATERIALS AND METHODS

Embryo collection and transgenic lines

Xenopus laevis embryos were obtained by conventional methods of hormone-induced egg laying and in vitro fertilisation, and staged according to Nieuwkoop and Faber's table of development (Nieuwkoop and Faber, 1994). Transgenic *Xenopus tropicalis* carrying the Wnt reporter construct pbin8LefdGFP have been described previously (Tran et al., 2010). Briefly, the transgene, flanked by chromosomal insulator sequences, contains a synthetic promoter harbouring eight copies of an optimal binding sequence for LEF/TCF upstream of a destabilised eGFP. *X. tropicalis* transgenic embryos were obtained by natural fertilisation between a wild-type female

¹Université Paris-Sud, UPR CNRS 3294, 91405 Orsay, France. ²Department of Biomedical Molecular Biology, Ghent University, B-9002 Ghent, Belgium.

*These authors contributed equally to this work

‡Author for correspondence (muriel.perron@u-psud.fr)

and a transgenic male. The latter was selected beforehand as having a single transgene insertion site (as inferred by mendelian ratios in its progeny) in order to ensure homogeneous levels of GFP expression in the offspring.

Construction of the LEF1-VP16 and LEF1-EnR transgenesis vectors has been described previously (Denayer et al., 2008) and transgenic *X. tropicalis* lines (LEF1-VP16Tg and LEF1-EnRTg) were generated as described (Sekkali et al., 2008). These constructs are fused with the dexamethasone-responsive hormone-binding domain of the human glucocorticoid receptor (GR).

Expression constructs and morpholinos

pCS2-TCF3-VP16GR and *pCS2-dnTCF3-GR* (de Croze et al., 2011), *pCS2-lhh-CD2* [previously called *Bhh* (Locker et al., 2006)], *pCS2-Smo-M2* (Koebnick et al., 2003), *pCS2-cyclinA2* and *pCS2-cdk2* (Decembrini et al., 2006) and *pCS2-GFP* (a gift from David Turner, University of Michigan, Ann Arbor, USA) were described previously. *pCS2-Shh-CD2* and *pCS2-Dhh-CD2* (previously called *Chh*) were generated by subcloning the N-terminal coding regions (devoid of the C-terminal cleavage product) of *Shh* and *Dhh* cDNAs (Egger et al., 1995) into a *pCS2-CD2* vector (Locker et al., 2006) after PCR amplification. *Gli3* and *Sfrp-1* morpholino (Mo) sequences are shown in supplementary material Fig. S1.

Microinjection and in vivo DNA lipofection

Capped mRNAs encoding TCF3-VP16GR and GFP were transcribed from *pCS2* plasmids after *NotI* digestion using the mMessage mMachine SP6 Kit (Ambion). Then, 400 pg of each mRNA was injected into two blastomeres of four-cell stage embryos. *Gli3*, *Sfrp-1* or standard control morpholino oligonucleotides (Gene Tools) were injected into one blastomere at the one-cell stage (30 ng). Their efficacy was tested by analysing in vivo GFP fluorescence following co-injection of a chimeric *GFP* construct fused downstream of the morpholino-complementary sequence (supplementary material Fig. S1).

Lipofection experiments were performed by cotransfecting the indicated *pCS2* constructs together with *pCS2-GFP* at stage 18 into the presumptive region of the retina, as previously described (Ohnuma et al., 2002). Tadpoles were fixed in 4% paraformaldehyde at stage 41 and cryostat sectioned (12 µm). GFP-positive cells were counted and cell types were identified based upon their laminar position and morphology.

Protein activity of GR chimeric constructs was induced by incubating the embryos/tadpoles for 24 hours in 4 µg/ml dexamethasone (DEX, Sigma) from stage 18 (lipofection experiments) or stage 28/30 (injection experiments, transgenic lines).

Pharmacological and recombinant SFRP-1 protein treatments

Cyclopamine (20–100 µM; LC Laboratories) or purmorphamine (100 µM; Calbiochem) was applied to the tadpole culture medium for 24 hours. BIO (6-bromindirubin-3'-oxime, Sigma) and LiCl (Sigma) treatment conditions were adapted to tadpole stages based on the protocols of Meijer and collaborators (Meijer et al., 2003). Those for IWR-1 (Sigma) were adapted from published data on zebrafish (Chen et al., 2009). Concentrations used and drug treatment durations were: BIO, 50 µM for 1 hour; LiCl, 0.3 M for 5 minutes; IWR-1, 50 µM for 24 hours. Control tadpoles were exposed to equivalent dilutions of the corresponding drug solvent (ethanol or dimethyl sulphoxide). Recombinant chick SFRP-1 protein (R&D Systems and a gift from Paola Bovolenta) was described previously (Esteve et al., 2003). Wnt reporter transgenic tadpoles were immersed for 24 hours in 0.1× modified Barth's saline containing 3 ng/µl of the purified soluble SFRP-1 protein. Holes were made in the epidermis to facilitate the penetration of SFRP-1. For analyses at stage 41, drugs or recombinant proteins were applied 24 hours earlier, at stage 39. For analyses at stage 38 or 40 (*X. laevis* or *X. tropicalis*, respectively), they were applied at stage 28/30.

EdU/BrdU incorporation and immunohistochemistry

Tadpoles were injected intra-abdominally or immersed for 3 hours in a 10 mM BrdU solution (Sigma) and then fixed in 4% paraformaldehyde. For birthdating experiments, tadpoles were injected with 1 mM 5-ethynyl-20-deoxyuridine (EdU, Invitrogen) and subsequently incubated

in a 1 mM EdU solution so that EdU would be constantly available. The solution was renewed daily. EdU incorporation was detected on paraffin sections using the Click-iT EdU Imaging Kit according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). Immunohistochemistry was performed on 12 µm cryostat sections as described (Perron et al., 2003), with mouse monoclonal anti-BrdU (1:100, Becton Dickinson), mouse monoclonal anti-GFP (1:500, Molecular Probes), rabbit polyclonal anti-CRALBP (1:1000; an anti-glia antibody provided by Jack Saari, University of Washington, Seattle, USA), mouse monoclonal anti-XAR1 (1:10; a gift from Donald Sakaguchi, Iowa State University, Ames, USA), mouse monoclonal anti-calbindin (1:100, Swant), mouse monoclonal anti-Islet1 (1:100, DSHB), and anti-mouse or anti-rabbit fluorescent secondary antibodies (1:1000, Alexa 488 or 594, Molecular Probes). Mouse monoclonal anti-PCNA (1:1000, Dako) was applied on 12 µm paraffin sections from tadpoles fixed in Bouin solution. Cell nuclei were counterstained with Hoechst (Sigma). Fluorescent staining was visualised with a Zeiss M2 microscope. Images were captured using an AxiocamMRC digital camera (Zeiss) and processed with AxioVision REL 7.8 (Zeiss) and Photoshop CS4 (Adobe) software.

In situ hybridisation

Digoxigenin-labelled antisense RNA probes were generated according to the manufacturer's instructions (DIG RNA Labeling Mix, Roche). Whole-mount in situ hybridisation was carried out as previously described (Perron et al., 2003). Embryos were then vibratome sectioned (50 µm).

Quantitative real-time PCR (qPCR)

Total RNA from 40–100 dissected retinas was isolated using the Aurum Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit (BioRad) or the Nucleospin RNA XS Kit (Macherey Nagel). Reverse transcription was performed using the iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad). qPCR reactions were performed in triplicate using SsoFast EvaGreen Supermix (BioRad) on a C1000 thermal cycler (CFX96 real-time system, BioRad). Results were normalised against the expression of reference genes *ODC* and *RPL8* using CFX Manager software (BioRad). PCR primer sequences are listed in supplementary material Table S1.

Quantification and statistical analyses

At least six embryos per condition and per experiment were analysed. Following image capture, areas of the in situ hybridisation labelling in the CMZ were quantified using AxioVision REL 7.8 or Photoshop CS4. As the signal in the control condition can vary along the dorsoventral axis, quantification was systematically performed in both the dorsal and ventral CMZ. Numeration of BrdU-positive cells in the CMZ was performed by manual counting following delineation of the dorsal and ventral CMZ based on Hoechst staining. Changes in BrdU-positive cell number are presented as percentage increase/decrease relative to the average number found in control CMZ. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test ($P \leq 0.05$).

RESULTS

Hedgehog and Wnt pathways lead to opposite proliferative phenotypes during retinogenesis

As a first step to compare Wnt and Hedgehog involvement in retinal stem/progenitor cell behaviour, we activated each pathway during retinogenesis by in vivo lipofection and performed lineage analyses of transfected cells in the mature retina (Fig. 1, supplementary material Fig. S2). Canonical Wnt signalling activation was achieved by overexpressing a constitutively active form of TCF3 (TCF3-VP16GR) (Agathocleous et al., 2009), a transcriptional effector acting at the nuclear endpoint of the pathway. As previously shown (Agathocleous et al., 2009), forced *TCF3* expression in such assays leads to the maintenance of cells retaining a neuroepithelial morphology characteristic of retinal progenitors (Fig. 1A,C). Agathocleous and collaborators further demonstrated that these neuroepithelial cells are actively proliferating, consistent with a Wnt-induced delay in cell cycle

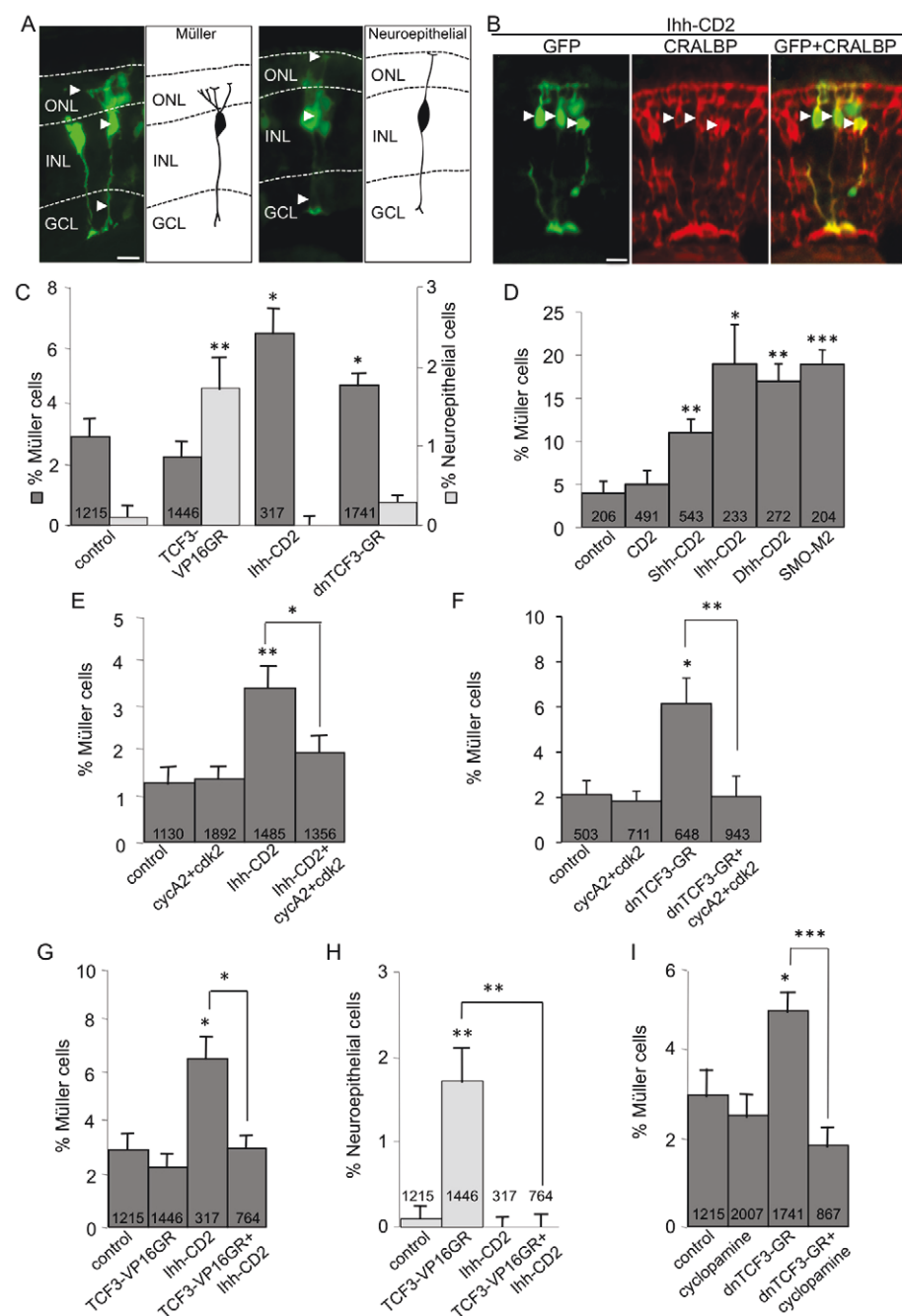


Fig. 1. Interfering with Hedgehog and Wnt pathways leads to opposite effects on precursor cell destiny during retinogenesis. (A,B) Stage 41 *Xenopus* retinal sections following in vivo lipofection. (A) The respective morphologies of GFP-positive Müller versus neuroepithelial cells. Arrowheads indicate the cell represented in the adjacent drawing. (B) Anti-CRALBP immunostaining (Müller cell marker; arrowheads) following *Ihh*-CD2 overexpression. (C-I) Percentage of Müller or neuroepithelial cells observed in stage 41 retinas following in vivo lipofection with the indicated constructs. Cyclopamine treatment was performed from stage 18 onwards on embryos lipofected with *GFP*. The total number of counted cells per condition is indicated in each bar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Student's *t*-test). Mean $\pm$ s.e.m. ONL, outer nuclear layer; INL, inner nuclear layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bars: 10 μ m.

withdrawal (Agathocleous et al., 2009). We then lipofected *Ihh*-CD2, a construct that encodes a membrane-anchored Indian hedgehog (Ihh) protein, allowing for cell-autonomous activation of Hedgehog signalling (Locker et al., 2006). In contrast to the previous situation, *Ihh*-CD2 overexpression did not enhance the proportion of neuroepithelial cells but instead induced a 3-fold increase in Müller glia (Fig. 1A,C), as confirmed by immunostaining using an anti-CRALBP antibody (Fig. 1B). A similar increase in the proportion of Müller cells was obtained upon misexpression of the two other Hedgehog ligands [Shh and Desert hedgehog (Dhh)] and of a constitutively active form of Smoothened called Smo-M2 (Fig. 1D).

Intriguingly, studies in *Xenopus* have revealed that overexpression of cyclin-dependent kinase inhibitors of the Cip/Kip (Ohnuma et al., 1999; Daniels et al., 2004) or INK (M.

Agathocleous and M. Roussel, personal communication) families both pushes precursors out of the cell cycle and favours Müller cell genesis. In line with this, could the Hedgehog-dependent bias toward gliogenesis be linked in any way to the previously demonstrated ability of the pathway to promote precocious cell cycle exit (Locker et al., 2006)? We addressed this issue by counteracting *Ihh*-induced effects on cell cycle withdrawal through co-lipofection with *cyclinA2/cdk2*. These two cell cycle components are known, when co-overexpressed, to delay retinal cell birthdate without altering cell cycle kinetics (Decembrini et al., 2006). We indeed found that this rescued the Müller glia phenotype (Fig. 1E), leading to a retinal cell distribution indistinguishable from that observed in controls (supplementary material Fig. S3A). Importantly, the same held true following blockade of Wnt signalling: overexpression of a dominant-negative form of TCF3

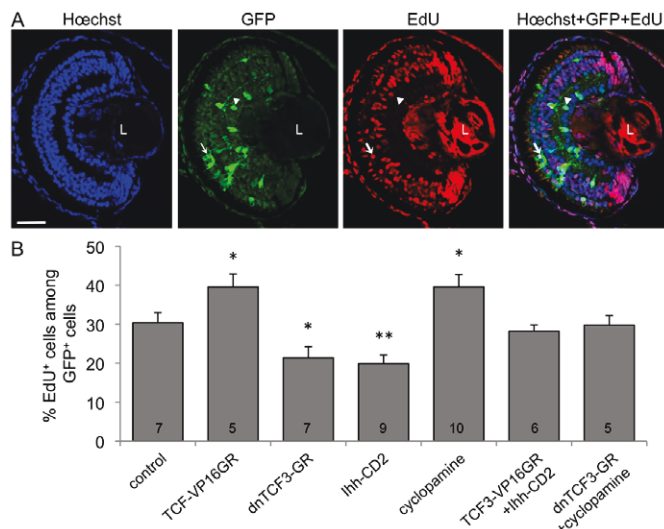


Fig. 2. Hedgehog and Wnt pathways have opposite impacts on cell cycle exit. Birthdating experiments (from stage 32 to stage 41) following in vivo lipofection with the indicated constructs. Cyclopamine treatment was performed from stage 18 onwards on embryos lipofected with *GFP*. Transfected cells that have exited the cell cycle before EdU exposure (stage 32) are EdU⁻ at stage 41, whereas cells that have exited the cell cycle at any time during the EdU incorporation period are EdU⁺. (A) Typical stage 41 retinal sections stained for GFP and EdU. The arrow and arrowhead point to a GFP⁺ EdU⁺ and to a GFP⁺ EdU⁻ cell, respectively. (B) Percentage of EdU⁺ nuclei among transfected cells. The total number of analysed retinas per condition is indicated in each bar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Student's *t*-test). Mean $\pm$ s.e.m. L, lens. Scale bar: 40 μ m.

(*dnTCF3-GR*) enhanced Müller cell genesis as previously shown with other constructs (Van Raay et al., 2005), and this effect was abolished upon co-lipofection with *cyclinA2/cdk2* (Fig. 1C,F, supplementary material Fig. S3B). We thus propose that the increased glial cell proportion induced by Hedgehog activation or Wnt inhibition results, at least in part, from precocious cell cycle exit.

We next examined whether Wnt signalling activation would be sufficient to rescue the Hedgehog phenotype, and vice versa. *TCF3-VP16GR* overexpression indeed prevented Hedgehog-dependent excess in gliogenesis (Fig. 1G). Conversely, the Wnt-induced increase in neuroepithelial cells was abolished upon *Ihh-CD2* co-lipofection (Fig. 1H). In addition, blocking Hedgehog signalling using the Smoothed antagonist cyclopamine also rescued the Müller phenotype of *dnTCF3-GR*-lipofected embryos (Fig. 1I). Together, these data show that Hedgehog and Wnt signalling pathways have opposite outcomes for retinal progenitor destiny, which is likely to reflect their inverse roles in cell cycle exit regulation. We further tested this hypothesis by directly evaluating the timing of cell cycle exit in each condition through birthdating experiments (Fig. 2). Embryos were subjected to constant EdU exposure from stage 32 to stage 41, so that all cells born in that period would be labelled. As expected, *Ihh-CD2* or *dnTCF3-GR* lipofection led to a decreased proportion of EdU-positive cells among transfected cells (including among Müller cells; supplementary material Fig. S4), showing a precocious cell cycle exit, whereas *TCF3-VP16GR* lipofection or cyclopamine treatment led to the opposite effect, indicative of a delayed cell birthdate. Finally, co-activation or

co-inhibition of both pathways rescued the phenotypes back to a control situation. These data thus confirm that the Hedgehog and Wnt signalling pathways have opposite impacts on the timing of retinal cell cycle exit.

Wnt and Hedgehog pathways lead to opposite proliferative phenotypes in the post-embryonic retina

Could such a functional antagonism also hold true in the context of post-embryonic retinal neurogenesis? As a prerequisite to answering this question, we first set up experimental conditions that allow conditional Wnt and Hedgehog signalling activation or inhibition through pharmacological means. The compound 6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO), a selective GSK-3 inhibitor (Meijer et al., 2003), and IWR-1, a small molecule that prevents Axin protein degradation (Chen et al., 2009), were previously described as an effective activator and inhibitor of the canonical Wnt pathway, respectively. We took advantage of a *X. tropicalis* Wnt reporter line (Tran et al., 2010) to control their effectiveness and determine optimal concentrations and exposure conditions. As previously described in *X. laevis* (Denayer et al., 2008), we detected Wnt activity within the CMZ (Fig. 3A). In addition, the destabilised character of the eGFP reporter allowed us to more sharply delineate the territory concerned, which appeared restricted to the peripheral half of the CMZ that includes the stem cell-containing zone. This territory was found to be significantly expanded 24 hours following BIO treatment and dramatically reduced upon IWR-1 exposure (Fig. 3B,C). We thus used these conditions for subsequent analyses. Activity of Hedgehog signalling was assessed through the expression of its target genes *Patched-1* (*Ptc1*) and *Gli1* and could be detected, as expected, within the CMZ (Perron et al., 2003), as well as in the pericocular mesenchyme as previously described in mouse (Dakubo et al., 2008) (Fig. 3D,E). Functional interference with the pathway was achieved using the Smoothed agonist purmorphamine and the antagonist cyclopamine. We found that a 24-hour treatment with these drugs was sufficient for consistent activation or inhibition of the pathway, respectively, as revealed by the dramatic increase or reduction of both *Ptc1* and *Gli1* staining (Fig. 3D-G).

In order to address the respective and interactive contributions of the Wnt and Hedgehog pathways to post-embryonic proliferation, we next performed BrdU incorporation assays following their pharmacological perturbation for 24 hours (Fig. 4). In this time window, although the size of the whole CMZ (as measured by the extent of the *Rx1* labelling area; supplementary material Fig. S5A,B) was seemingly unaffected, significant variations in the number of BrdU-positive cells could be detected. We previously demonstrated that Wnt signalling is required for the maintenance of proliferation at post-embryonic stages (Denayer et al., 2008). Accordingly, BIO-treated tadpoles exhibited an increased number of BrdU-labelled cells in the CMZ compared with control retinas, whereas proliferation levels significantly dropped following IWR-1 treatment (Fig. 4B). Strikingly, exposure to purmorphamine reduced BrdU incorporation below the control level, as observed for IWR-1 treatment. Conversely, tadpole exposure to cyclopamine increased BrdU-positive cell number within the CMZ, thus phenocopying the BIO treatment (Fig. 4B). Moreover, similar changes in the number of PCNA-positive cells were observed for each condition (supplementary material Fig. S6), confirming variations in the size of the whole proliferative cell cohort. Based on our above lipofection data (Fig. 1), we reasoned that co-activating or co-inhibiting both pathways should restore a

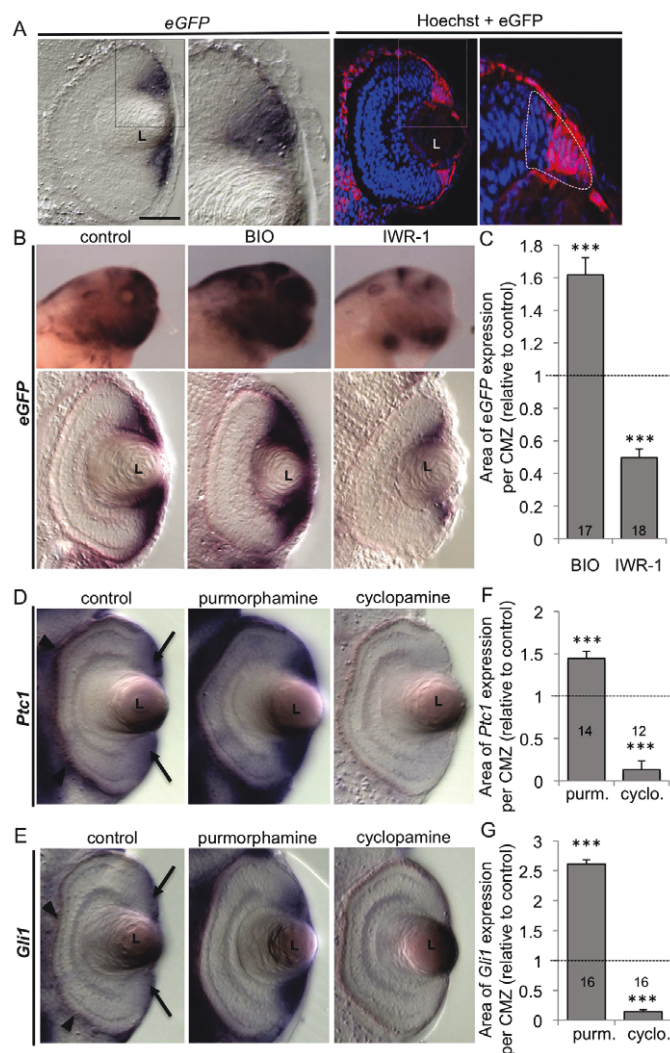


Fig. 3. BIO, IWR-1, purmorphamine and cyclopamine act as efficient Wnt and Hedgehog pathway activators or inhibitors in the *Xenopus* tadpole retina. (A) In situ hybridisation or immunofluorescence analyses of eGFP expression on stage 40 retinal sections from Wnt-responsive transgenic animals. Enlargements of the ciliary marginal zone (CMZ) region (delineated with dotted line) show that GFP expression is strongest in the peripheral half of the CMZ, including the stem cell zone. Note that Wnt activity is also detected in the peripheral retinal pigmented epithelium (RPE). (B,C) In situ hybridisation against eGFP on stage 40 transgenic tadpoles 24 hours following BIO or IWR-1 treatment. (B) Representative images of staining in whole mount (lateral view of the head) and on retinal sections (dorsal side up). (C) Quantification of eGFP staining area per CMZ. (D-G) In situ hybridisation analyses of *Ptc1* (D) and *Gli1* (E) expression on stage 40 retinal sections 24 hours following purmorphamine or cyclopamine treatment. Note that *Ptc1* and *Gli1* are detected in the CMZ (arrows) and in the periocular mesenchyme (arrowheads). (F,G) Quantification of *Ptc1* and *Gli1* staining area per CMZ. The total number of analysed sections per condition is indicated in each bar. *** $P < 0.001$ (Student's *t*-test). Mean $\pm$ s.e.m. L, lens. Scale bar: 40 μ m, except 400 μ m in whole mounts.

wild-type phenotype. Indeed, CMZ proliferation levels following BIO/purmorphamine or IWR-1/cyclopamine co-treatments were not significantly different from the control situation (Fig. 4B). These data clearly demonstrate that altering the Wnt and Hedgehog

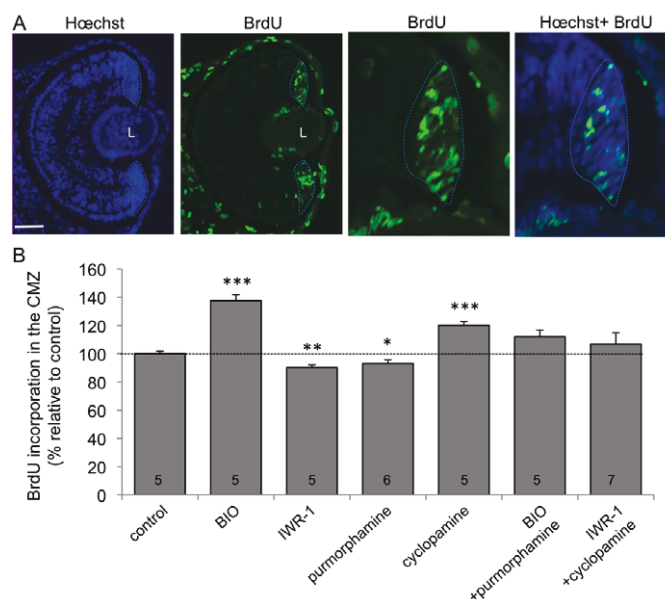


Fig. 4. Interfering with Hedgehog and Wnt pathways leads to opposite proliferative outcomes in the post-embryonic retina. BrdU incorporation assays (3-hour pulse) at stage 41, 24 hours following treatment with the indicated drugs. (A) Control retinal section illustrating how the CMZ, in which BrdU⁺ cells are counted, is delineated (dotted lines) using Hoechst staining. Images on the right show higher magnifications of the CMZ. (B) Quantification of BrdU⁺ cells in the CMZ. The total number of analysed retinas per condition is indicated in each bar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Student's *t*-test). Mean $\pm$ s.e.m. L, lens. Scale bar: 40 μ m.

signalling pathways during a period of 24 hours leads to opposite and counterbalancing proliferative outcomes in the post-embryonic CMZ.

Wnt and Hedgehog morphogens emanate from mutually exclusive territories of the post-embryonic retina

Such a negative Wnt/Hedgehog interplay is reminiscent of their well-established antagonistic functions in the patterning of the spinal cord, where they act as opposed morphogenetic signals along the dorsoventral axis (reviewed by Ulloa and Marti, 2010). We thus wondered whether such morphogen gradients could similarly take place in the CMZ, where both pathways are active (Fig. 3 and Fig. 5C). We determined the spatial distribution of Wnt and Hedgehog ligand transcripts in the mature retina by in situ hybridisation (Fig. 5 and see schematic in Fig. 10A). As previously shown (Perron et al., 2003), *Shh* is mainly expressed in the ganglion cell layer, whereas *Ihh* and *Dhh* are restricted to the central retinal pigmented epithelium (RPE) and are excluded from its peripheral part surrounding the CMZ (Fig. 5A). Among Wnt ligands, neither *Wnt1*, *Wnt8*, *Wnt10b* nor *Wnt11r* could be detected in the mature retina (data not shown). Strikingly, however, *Wnt2b*, *Wnt3a*, *Wnt7b*, *Wnt8b*, *Wnt9a*, *Wnt9b* and *Wnt16* mRNAs were all localised within or around the CMZ. Labelling was found either in the peripheral RPE lining the CMZ, in the stem cell-containing zone of the CMZ, in the presumptive cornea or in epithelial cells of the lens (Fig. 5B; data not shown). Wnt and Hedgehog ligand genes thus exhibit mutually exclusive expression patterns along the central to peripheral axis of the post-embryonic retina, suggesting that opposing gradients might exist within the CMZ.

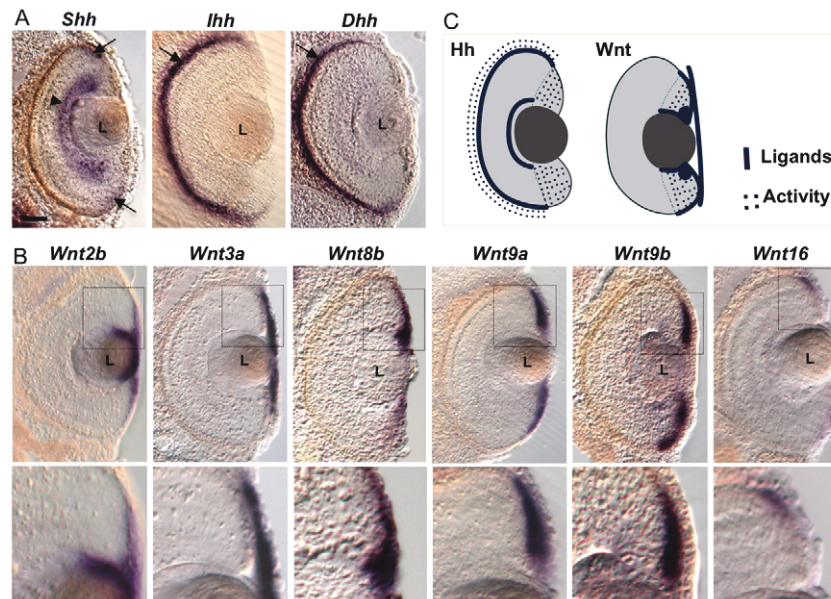


Fig. 5. Wnt and Hedgehog morphogens are expressed in mutually exclusive territories within the post-embryonic retina. (A,B) Retinal sections of stage 39/40 *Xenopus* tadpoles following in situ hybridisation with the indicated probes. (A) *Shh*, *Ihh* and *Dhh* are detected in the central RPE (arrows). Additionally, *Shh* labels the ganglion cell layer (arrowhead). (B) In contrast to Hedgehog genes, those encoding Wnt ligands are all expressed in the peripheral retina. Shown beneath each retinal section is a higher magnification of the CMZ region (boxed). *Wnt2b*, *Wnt8b*, *Wnt9a*, *Wnt9b* and *Wnt16* are detected in the peripheral RPE surrounding the CMZ (*Wnt8b* and *Wnt9a* exhibit a more intense staining dorsally than ventrally). *Wnt8b* is additionally expressed in the most peripheral stem cell-containing region of the CMZ, together with *Wnt2b*, which also labels the peripheral part of the lens. *Wnt3a* transcripts are present in the presumptive cornea and *Wnt7b* is expressed in the lens (not shown). (C) Summary of Hedgehog (Hh) and Wnt ligand expression in the retina, and of domains exhibiting Wnt (in the CMZ) and Hedgehog (in the CMZ and periocular mesenchyme) activity. L, lens. Scale bar: 40 μ m.

The Wnt pathway restrains Hedgehog activity in the CMZ

We next investigated potential cross-regulation between the Wnt and Hedgehog cascades. Using pharmacological and genetic tools, we first analysed the impact of Wnt pathway activation on Hedgehog signalling activity by examining the effects of a 24-hour BIO treatment. Although treated retinas appeared slightly smaller than controls, no developmental delay or defects in the central retina were observed, as assessed by the normal expression pattern of various differentiated cell markers (supplementary material Fig. S7). Consistent with an effective activation of canonical Wnt signalling in the CMZ (Denayer et al., 2008), the expression of *CyclinD1*, an established Wnt transcriptional target gene, was dramatically enhanced compared with the control situation (Fig. 6A). Of note, the overall size of the CMZ as inferred from the *Rx* expression domain was not significantly affected (supplementary material Fig. S5C,D). By contrast, the expression of the Hedgehog transcriptional targets *Ptc1* and *Gli1* was virtually abolished, reflecting a significant inhibition of the pathway (Fig. 6A,B). Importantly, these results were validated by two additional strategies: *TCF3-VP16GR* overexpression by mRNA microinjection at the four-cell stage (Fig. 6C,D) and treatment with LiCl (supplementary material Fig. S8), which is the most frequently used GSK-3 β inhibitor, although supposedly less specific than BIO (Meijer et al., 2003). These data suggest that activating the Wnt pathway attenuates Hedgehog signalling activity in the post-embryonic retina.

We next monitored Hedgehog activity following inhibition of Wnt signalling. Retinas of IWR-1-treated tadpoles displayed reduced *CyclinD1* staining with respect to controls. By contrast, *Gli1* and *Ptc1* expression was strongly enhanced within the CMZ (Fig. 6E,F), suggesting an increase in Hedgehog pathway activity.

To support these in situ hybridisation results, we quantified *Ptc1* expression by qPCR following genetic or pharmacological modulation of Wnt signalling. Consistent with the previous data, we found decreased *Ptc1* mRNA levels upon BIO treatment or *TCF3-VP16GR* injection and the opposite result in IWR-1-treated retinas (Fig. 6G). Finally, we confirmed these results in two *Xenopus* transgenic lines in which the Wnt pathway can be conditionally activated (LEF1-VP16 Tg) or repressed (LEF1-EnR Tg) (Fig. 6H). Together, these data suggest that the Wnt pathway is required to limit Hedgehog activity in the CMZ.

Hedgehog signalling negatively regulates Wnt activity in the CMZ

We then examined whether the Hedgehog pathway might reciprocally inhibit Wnt signalling activity. The Wnt-responsive transgenic tadpoles described above (Fig. 3) were treated for 24 hours with cyclopamine or purmorphamine and then subjected to immunofluorescence and in situ hybridisation to evaluate eGFP protein and mRNA expression levels, respectively. Hedgehog inhibition resulted in increased eGFP staining in the CMZ, whereas its activation led to the opposite phenotype (Fig. 7). Thus, Hedgehog signalling restricts Wnt activity, possibly contributing to its confinement to the peripheral part of the CMZ.

The Hedgehog pathway restricts Wnt activity in the CMZ through transcriptional regulation of *Sfrp-1*

We next investigated the molecular mechanism by which the Hedgehog and Wnt pathways establish these reciprocal cross-regulations. The gene encoding the secreted protein SFRP-1, which is an antagonist of Wnt signalling (Xu et al., 1998),

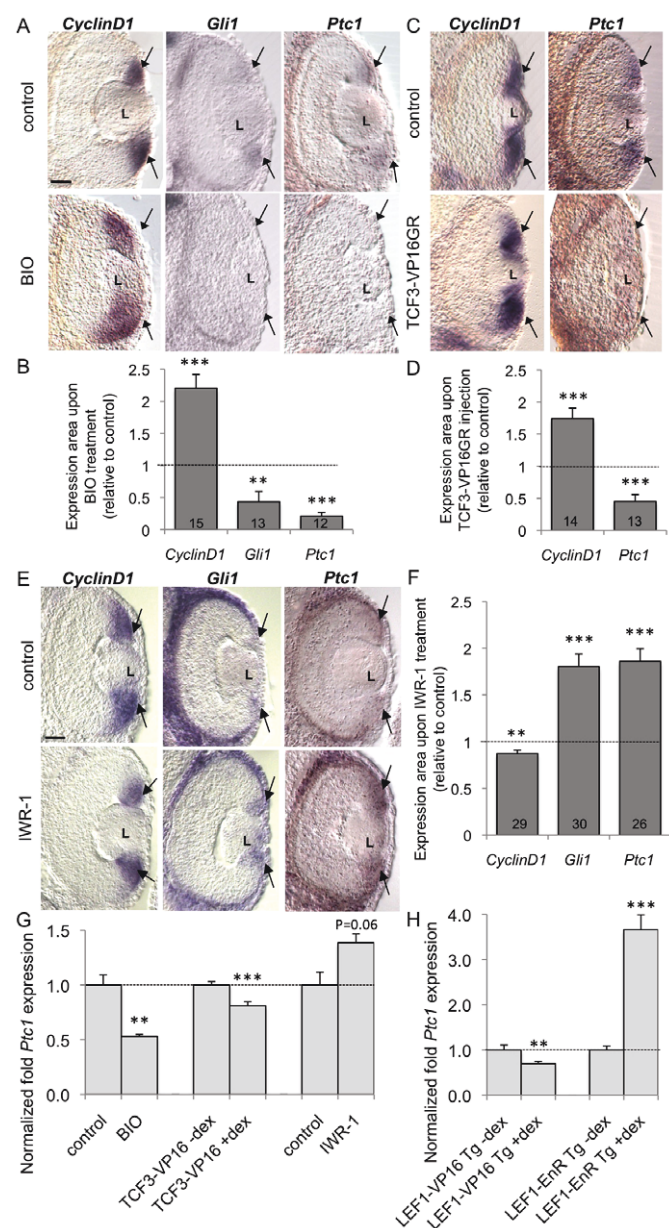


Fig. 6. Impact of Wnt pathway perturbations on Hedgehog signalling activity. (A-F) In situ hybridisation analyses of *CyclinD1*, *Gli1* or *Ptc1* expression on stage 38 retinal sections 24 hours following treatment with BIO (A,B), induction of TCF3-VP16GR activity in injected embryos (C,D), or treatment with IWR-1 (E,F). Arrows indicate CMZ labelling. (B,D,F) Quantification of staining area for each transcript. The total number of analysed sections per condition is indicated in each bar. (G,H) qPCR analysis of retinal *Ptc1* expression following Wnt signalling activation or inhibition as indicated. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Student's *t*-test). Mean $\pm$ s.e.m. L, lens. Scale bars: 40 μ m.

contains GLI binding sites in its promoter region (Katoh and Katoh, 2006) and has been shown to be regulated by Hedgehog in gastric cancer cells (He et al., 2006). In addition, *Sfrp-1* expression was shown to be enhanced by Hedgehog activation in the developing spinal cord (Domanitskaya et al., 2010). These features make *Sfrp-1* a prime candidate as a potential downstream target of the Hedgehog pathway in the post-embryonic retina. Consistent with this hypothesis, we found that

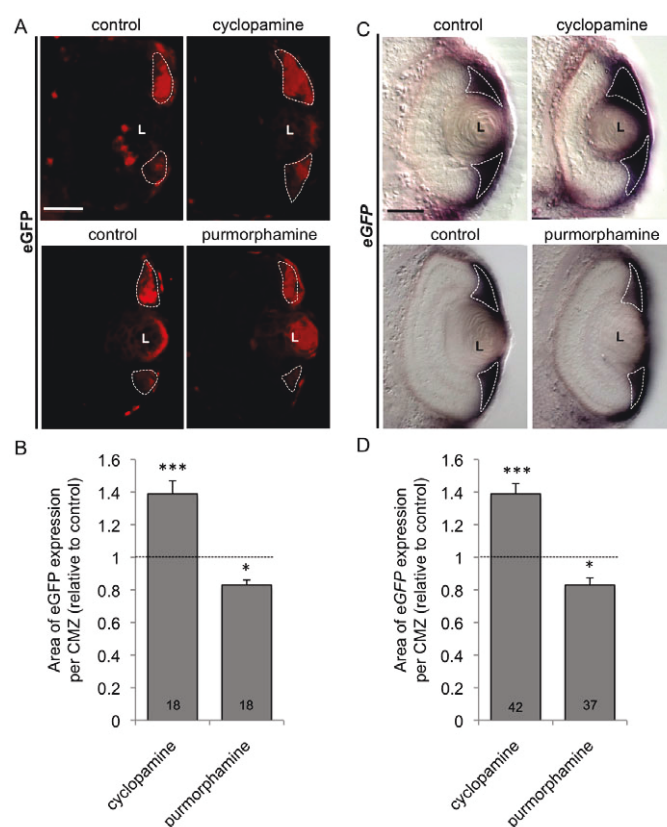


Fig. 7. Hedgehog signalling inhibits Wnt activity.

(A-D) Immunofluorescence (A,B) or in situ hybridisation (C,D) analyses of *eGFP* expression in stage 40 retinas from Wnt-responsive transgenic animals following a 24-hour treatment with either cyclopamine or purmorphamine. (B,D) Quantification of *eGFP* staining area within the CMZ (delineated by dotted lines). Hoechst staining (for immunolabelling) and Nomarski (for in situ hybridisation) were used to delineate the CMZ in order to exclude RPE *eGFP* labelling from the quantification. The total number of analysed sections per condition is indicated in each bar. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ (Student's *t*-test). Mean $\pm$ s.e.m. L, lens. Scale bars: 40 μ m.

Sfrp-1 was highly expressed in the periocular mesenchyme, a tissue that lines *lhh*- and *Dhh*-producing cells of the RPE (Fig. 8A) and exhibits Hedgehog signalling activity as inferred by *Ptc1* and *Gli1* expression (Fig. 3D,E and Fig. 5C). Cyclopamine exposure virtually abolished *Sfrp-1* staining, whereas purmorphamine treatment resulted in a marked enhancement of the signal in this region and revealed expression in cells adjacent to the CMZ (peripheral RPE, presumptive cornea and lens epithelium) (Fig. 8A). This upregulation could be observed by qPCR as little as 8 hours following purmorphamine application (Fig. 8B). These data strongly suggest that Hedgehog signalling regulates *Sfrp-1* expression in the mature retina.

As SFRP-1 is known to establish intricate and multiple interactions with the Wnt pathway (Bovolenta et al., 2008), we tested whether it could inhibit Wnt activity in the CMZ. We found that *eGFP* expression was significantly reduced in the retina of Wnt-responsive transgenic tadpoles exposed for 24 hours to SFRP-1 soluble protein (Fig. 8C,D), whereas it was increased upon morpholino-mediated *Sfrp-1* knockdown (Fig. 8E,F). These data are consistent with SFRP-1 acting as a Wnt signalling repressor in this CMZ context.

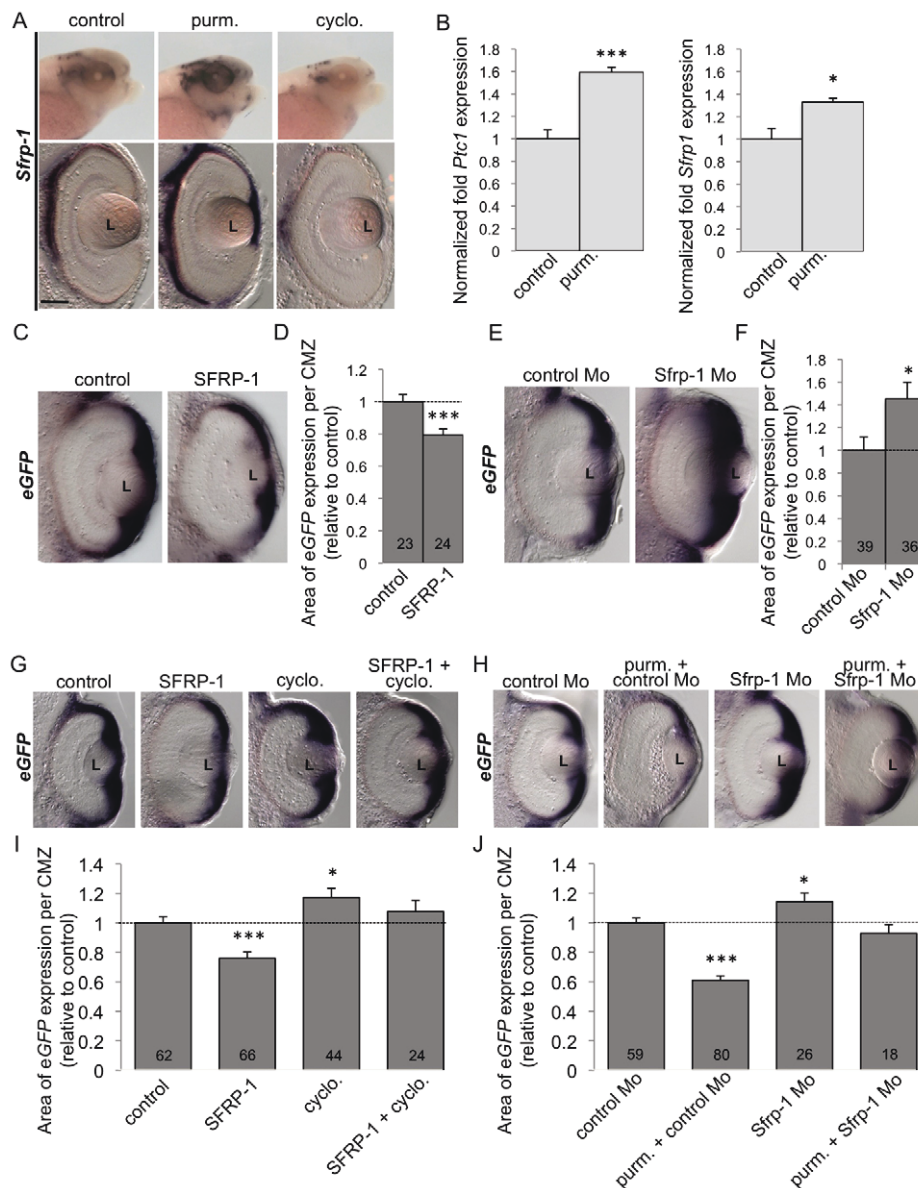


Fig. 8. The Hedgehog pathway negatively regulates Wnt activity through the transcriptional activation of *Sfrp-1*. (A) In situ hybridisation analysis of *Sfrp-1* expression on stage 41 retinal sections following a 24-hour treatment with purmorphamine (purm.) or cyclopamine (cyclo.). (B) qPCR analysis of *Ptc1* (as a control for purmorphamine activity) and *Sfrp-1* expression in the head of stage 38 sibling tadpoles following 8 hours of purmorphamine exposure. (C–J) In situ hybridisation analysis of *eGFP* expression in stage 40 retinas from Wnt-responsive transgenic animals exposed to SFRP-1 protein for 24 hours (C,D,G) or injected with *Sfrp-1* Mo (E,F,H). (G–J) Tadpoles were additionally treated for 24 hours with cyclopamine (G,I) or purmorphamine (H,J). (D,F,I,J) Quantification of *eGFP* staining area per CMZ in each condition. The total number of analysed sections per condition is indicated in each bar. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ (Student's *t*-test). Mean $\pm$ s.e.m. L, lens. Scale bar: 40 μ m.

Finally, to evaluate whether Hedgehog-dependent downregulation of Wnt activity could be mediated by *Sfrp-1*, we performed rescue experiments in Wnt-responsive transgenic embryos. *eGFP* expression was monitored either in *Sfrp-1* morphant tadpoles treated with purmorphamine or following concomitant exposure to SFRP-1 protein and cyclopamine (Fig. 8G–J). In both cases, *eGFP* expression was restored to a level similar to that observed in control embryos. We therefore propose that SFRP-1 serves as the molecular link that mediates the negative impact of the Hedgehog pathway on Wnt activity within the post-embryonic retina.

The Wnt/ β -catenin pathway downregulates Hedgehog activity in the CMZ through *Gli3* transcriptional regulation

Gli3 is known as a transcriptional repressor of Hedgehog signalling in the absence of ligand stimulation (Jacob and Briscoe, 2003). As it is regulated by Wnt activity in the developing neural tube (Alvarez-Medina et al., 2008; Yu et al., 2008), we examined whether this might also be the case within the CMZ. Indeed, BIO-

or LiCl-treated retinas exhibited a significant increase in *Gli3* expression, as assessed by in situ hybridisation or qPCR, whereas IWR-1 exposure led to the opposite phenotype (Fig. 9A–C, supplementary material Fig. S8). This suggests that *Gli3* represents a key downstream effector of the Wnt pathway that might account for its negative impact on Hedgehog activity. Consistent with this hypothesis, we found that morpholino-mediated *Gli3* knockdown could rescue the decreased *Ptc1* expression observed in BIO-treated tadpoles (Fig. 9D). We therefore conclude that Wnt-dependent downregulation of Hedgehog activity is mediated by *Gli3* transcriptional regulation.

DISCUSSION

Our study provides new insights into the regulatory network underlying the finely tuned balance between proliferation and differentiation in a post-embryonic neurogenic niche. We discovered unexpected opposed and counterbalancing functions of Wnt and Hedgehog pathways in the tadpole retina that modulate neural stem/progenitor cell proliferation levels. This study also revealed that Hedgehog and Wnt morphogens are expressed in

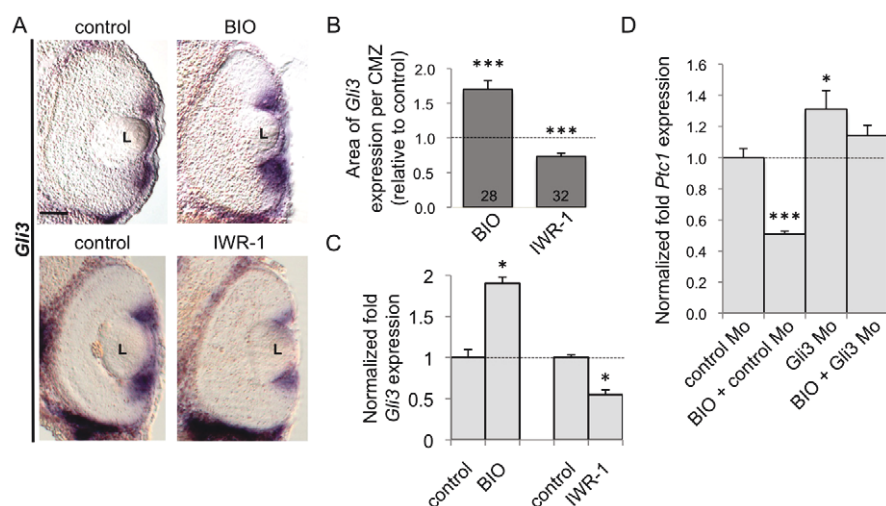


Fig. 9. The Wnt pathway negatively regulates Hedgehog activity through the transcriptional activation of *Gli3*. (A,B) In situ hybridisation analysis of *Gli3* expression (A) on stage 38 retinal sections 24 hours following BIO or IWR-1 treatment. (B) Quantification of *Gli3* staining area per CMZ. The total number of analysed sections per condition is indicated in each bar. (C) qPCR analysis of retinal *Gli3* expression following 24-hour BIO or IWR-1 treatment. (D) qPCR analysis of retinal *Ptc1* expression following 24-hour BIO treatment on *Gli3* Mo-injected tadpoles. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ (Student's *t*-test). Mean $\pm$ s.e.m. L, lens. Scale bar: 40 μ m.

mutually exclusive retinal territories and reciprocally regulate each other's activity within the CMZ. Finally, we showed that this mutual inhibition is achieved by crosstalk involving the transcriptional regulation of *Sfrp-1* and *Gli3*. We propose that an intricate antagonistic interplay of Wnt and Hedgehog pathways tightly regulates the proliferation in the post-embryonic retina (Fig. 10).

A functional antagonism of Wnt and Hedgehog pathways has been described in several developmental processes in both vertebrate and invertebrate species in the context of tissue patterning and cell fate determination (Ahn et al., 2010; Danesin et al., 2009; Glise et al., 2002; Tang et al., 2010; Ulloa and Marti, 2010). Their relationship is however highly dependent on cell context. For instance, they either synergise or exert opposite effects in various aspects of endochondral skeletal development (Mak et al., 2006). Similarly, their interaction during neural development is far from straightforward. Hedgehog is indeed required upstream of the Wnt pathway to promote cell cycle progression in the neural tube (Alvarez-Medina et al., 2009), whereas it must be inhibited by Wnt signalling to allow midbrain progenitor proliferation (Joksimovic et al., 2009). Regarding adult neurogenesis, both pathways are thought to share a mitogenic influence on stem/progenitor cells (reviewed by Mu et al., 2010), suggesting a cooperative mode of action. Strikingly, however, we found in the present study that they instead trigger opposite and counterbalancing proliferative responses within the post-embryonic retina. Based on our lipofection experiments and previous data (Agathocleous et al., 2009; Denayer et al., 2008; Locker et al., 2006), we propose that the Wnt and Hedgehog pathways functionally counteract each other through opposed effects on cell cycle exit. Our study thus highlights for the first time an antagonistic interplay of the two pathways in the control of post-embryonic neural stem/progenitor cell proliferation. Interestingly, opposite influences of Wnt and Hedgehog have recently been described to control colonic epithelial cell renewal in the mammalian intestinal crypt (van den Brink et al., 2004; van Dop et al., 2009). This highlights a striking conservation of their interactions in ontologically unrelated adult stem cell niches.

The mutually exclusive expression patterns of Hedgehog and Wnt ligand genes in the mature retina are highly reminiscent of the situation along the dorsoventral axis of the spinal cord (Ulloa and Marti, 2010). It is thus tempting to imagine the existence of opposing gradients of Wnt and Hedgehog activities within the

CMZ. Notably, Wnt signalling activity is not found throughout the whole CMZ but is restricted to its most peripheral half, at or in the immediate vicinity of Wnt ligand-producing cells. It is thus likely that Wnt proteins act locally to mainly influence retinal stem cell and early progenitor behaviour. By contrast, the more central location of Hedgehog ligand production sites suggests that they primarily impact on older progenitors, i.e. cells that are closer to cell cycle exit. Setting up a Hedgehog-responsive transgenic line would help in visualising the precise territory of Hedgehog activity within the CMZ and would be useful to validate this model. Besides, several studies have reported that the magnitude and the duration of Hedgehog signalling input can elicit different proliferative responses (Dessaud et al., 2010; Joksimovic et al., 2009; Ribes et al., 2010). Wnt/Hedgehog interaction modalities might thus vary along the timecourse of neurogenesis within the CMZ and thus differentially affect distinct cellular populations. Consequently, addressing these issues will be pivotal to further understand how these pathways dynamically coordinate post-embryonic neurogenesis in the retina.

We not only found antagonistic functions of the Wnt and Hedgehog pathways in terms of CMZ cell behaviour, but also revealed that they restrain each other's activity and we propose mechanisms underlying this crosstalk. Our results point to the *Sfrp-1* tumour suppressor gene as a key downstream target of the Hedgehog signalling that accounts for Wnt activity attenuation within the CMZ. This interaction is consistent with data from the intestinal crypt, where it was proposed, based on the expression patterns of *Ihh*, *Sfrp-1* and *Wnt6*, that Hedgehog-dependent *Sfrp-1* regulation could help to confine canonical Wnt signalling within stem and progenitor cells (Katoh and Katoh, 2006). For the first time, we formally demonstrate such a scenario in vivo by showing that (1) *Sfrp-1* expression indeed requires Hedgehog signalling, (2) SFRP-1 acts as a Wnt inhibitor in the CMZ and (3) it is necessary for Hedgehog-dependent downregulation of Wnt signalling. Conversely, how does the Wnt pathway counteract Hedgehog activity? As previously observed in the developing chick spinal cord (Alvarez-Medina et al., 2008; Yu et al., 2008), we propose that this occurs through the activation of *Gli3* transcription, as *Gli3* expression is required for the Wnt-dependent negative regulation of Hedgehog signalling. Whether *Sfrp-1* and *Gli3* regulation is sufficient to account for the observed Wnt/Hedgehog reciprocal inhibition remains to be investigated. Indeed, coordination between the two pathways might be more complicated, with additional

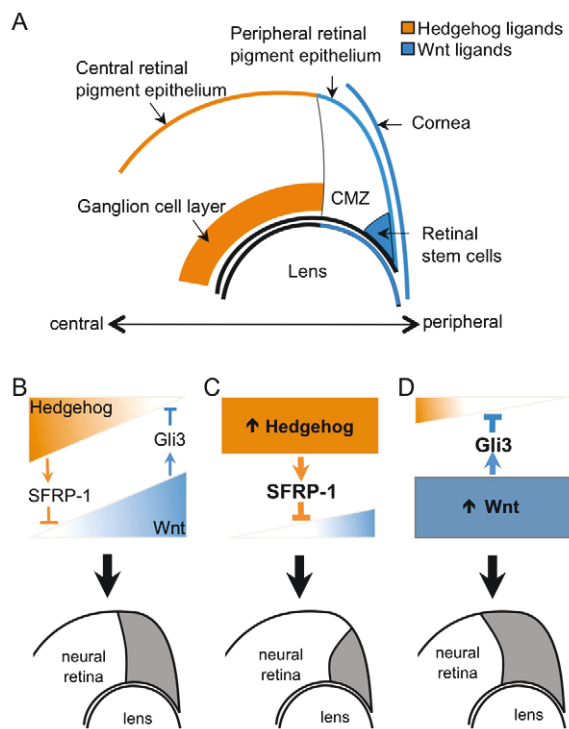


Fig. 10. Model of Wnt and Hedgehog interplay in the post-embryonic retina. (A) Schematic highlighting the mutually exclusive expression domains of Wnt and Hedgehog ligands along the central to peripheral axis of the post-embryonic retina. (B-D) Illustration of the activities of Wnt and Hedgehog pathways in the retinal neurogenic niche and of the proposed crosstalk underlying their mutual negative regulation. Shown are the hypothetical physiological situation (B), and the synopsis of our Hedgehog (C) or Wnt (D) activation experiments. Their opposed impacts on stem/progenitor cell proliferation are represented by changes in the CMZ proliferative cell population (grey) in the drawings beneath.

players at work, such as Sufu, which antagonises Hedgehog signalling in the retina (Cwinn et al., 2011) and has recently been shown to be involved in Hedgehog and Wnt crosstalk in the early *Xenopus* embryo (Min et al., 2011).

As a whole, our study highlights that stem/progenitor cell proliferation within the post-embryonic retina relies on a balance between opposed Wnt and Hedgehog influences (Fig. 10). This might be of direct relevance for setting up stem cell-based strategies to treat neurodegenerative eye diseases. Unlike in mammals, retinal regeneration in adult anuran amphibians occurs at least partly through CMZ stem cell recruitment (reviewed by Locker et al., 2010). It will thus be valuable to elucidate how the Wnt/Hedgehog balance behaves in the context of retinal injury and how it contributes to retinal repair.

Acknowledgements

We thank S. Sokol, S. Ekker, S. Ohnuma, A. Ruiz i Altaba, K. Takeshima, T. Pieler, P. A. Krieg, R. Moon, A. H. Monsoro-Burq, F. Cremisi and J. C. Saari for providing cDNAs or antibodies; P. Bovolenta for supplying SFRP-1 protein; B. Durand for *Gli3* morpholinos; M. Agathocleous for critical reading of the manuscript; M. Amato, V. Agrawal, J. Hamdache and A. Touzot for help with experiments; and C. de Meideros for animal care.

Funding

This research was supported by grants to M.P. from l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS),

Université Paris-Sud, Retina France, Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Institut Fédératif de Recherche NeuroSud Paris (IFR144), and to K.V. from the Fonds Wetenschappelijk Onderzoek (FWO), the Belgian Federation against Cancer and the 'Geconcerteerde Onderzoeksacties of Ghent University'. C.B. is an ANR and Region Ile de France Fellow.

Competing interests statement

The authors declare no competing financial interests.

Supplementary material

Supplementary material available online at <http://dev.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dev.079582/-/DC1>

References

- Adachi, K., Mirzadeh, Z., Sakaguchi, M., Yamashita, T., Nikolcheva, T., Gotoh, Y., Peltz, G., Gong, L., Kawase, T., Alvarez-Buylla, A. et al. (2007). Beta-catenin signalling promotes proliferation of progenitor cells in the adult mouse subventricular zone. *Stem Cells* **25**, 2827-2836.
- Agathocleous, M., Locker, M., Harris, W. A. and Perron, M. (2007). A general role of hedgehog in the regulation of proliferation. *Cell Cycle* **6**, 156-159.
- Agathocleous, M., Iordanova, I., Willardsen, M. I., Xue, X. Y., Vetter, M. L., Harris, W. A. and Moore, K. B. (2009). A directional Wnt/beta-catenin-Sox2-proneural pathway regulates the transition from proliferation to differentiation in the *Xenopus* retina. *Development* **136**, 3289-3299.
- Ahn, S. and Joyner, A. L. (2005). In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* **437**, 894-897.
- Ahn, Y., Sanderson, B. W., Klein, O. D. and Krumlauf, R. (2010). Inhibition of Wnt signalling by Wise (Sostdc1) and negative feedback from Shh controls tooth number and patterning. *Development* **137**, 3221-3231.
- Alvarez-Medina, R., Cayuso, J., Okubo, T., Takada, S. and Marti, E. (2008). Wnt canonical pathway restricts graded Shh/Gli patterning activity through the regulation of Gli3 expression. *Development* **135**, 237-247.
- Alvarez-Medina, R., Le Dreau, G., Ros, M. and Marti, E. (2009). Hedgehog activation is required upstream of Wnt signalling to control neural progenitor proliferation. *Development* **136**, 3301-3309.
- Balordi, F. and Fishell, G. (2007). Hedgehog signalling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons. *J. Neurosci.* **27**, 5936-5947.
- Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J. M., Cisneros, E. and Lopez-Rios, J. (2008). Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J. Cell Sci.* **121**, 737-746.
- Centanin, L., Hoekendorf, B. and Wittbrodt, J. (2011). Fate restriction and multipotency in retinal stem cells. *Cell Stem Cell* **9**, 553-562.
- Cervený, K. L., Varga, M. and Wilson, S. W. (2011). Continued growth and circuit building in the anamniote visual system. *Dev. Neurobiol.* **72**, 328-345.
- Chen, B., Dodge, M. E., Tang, W., Lu, J., Ma, Z., Fan, C. W., Wei, S., Hao, W., Kilgore, J., Williams, N. S. et al. (2009). Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signalling in tissue regeneration and cancer. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 100-107.
- Cwinn, M. A., Mazerolle, C., McNeill, B., Ringuette, R., Thurig, S., Hui, C. C. and Wallace, V. A. (2011). Suppressor of fused is required to maintain the multipotency of neural progenitor cells in the retina. *J. Neurosci.* **31**, 5169-5180.
- Dakubo, G. D., Mazerolle, C., Furimsky, M., Yu, C., St-Jacques, B., McMahon, A. P. and Wallace, V. A. (2008). Indian hedgehog signaling from endothelial cells is required for sclera and retinal pigment epithelium development in the mouse eye. *Dev. Biol.* **320**, 242-255.
- Danesin, C., Peres, J. N., Johansson, M., Snowden, V., Cording, A., Papalopulu, N. and Houart, C. (2009). Integration of telencephalic Wnt and hedgehog signalling center activities by Foxg1. *Dev. Cell* **16**, 576-587.
- Daniels, M., Dhokia, V., Richard-Paillaillon, L. and Ohnuma, S. (2004). Identification of *Xenopus* cyclin-dependent kinase inhibitors, p16Xic2 and p17Xic3. *Gene* **342**, 41-47.
- de Croze, N., Maczkowiak, F. and Monsoro-Burq, A. H. (2011). Reiterative AP2a activity controls sequential steps in the neural crest gene regulatory network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 155-160.
- Decembrini, S., Andreazzoli, M., Vignali, R., Barsacchi, G. and Cremisi, F. (2006). Timing the generation of distinct retinal cells by homeobox proteins. *PLoS Biol.* **4**, e272.
- Denayer, T., Locker, M., Borday, C., Deroo, T., Janssens, S., Hecht, A., van Roy, F., Perron, M. and Vleminckx, K. (2008). Canonical Wnt signalling controls proliferation of retinal stem/progenitor cells in postembryonic *Xenopus* eyes. *Stem Cells* **26**, 2063-2074.
- Dessaud, E., Ribes, V., Balaskas, N., Yang, L. L., Pierani, A., Kicheva, A., Novitsch, B. G., Briscoe, J. and Sasai, N. (2010). Dynamic assignment and maintenance of positional identity in the ventral neural tube by the morphogen sonic hedgehog. *PLoS Biol.* **8**, e1000382.
- Domanitskaya, E., Wacker, A., Mauti, O., Baeriswyl, T., Esteve, P., Bovolenta, P. and Stoeckli, E. T. (2010). Sonic hedgehog guides post-crossing commissural

- axons both directly and indirectly by regulating Wnt activity. *J. Neurosci.* **30**, 11167-11176.
- Ekker, S. C., McGrew, L. L., Lai, C. J., Lee, J. J., von Kessler, D. P., Moon, R. T. and Beachy, P. A.** (1995). Distinct expression and shared activities of members of the hedgehog gene family of *Xenopus laevis*. *Development* **121**, 2337-2347.
- Esteve, P., Trousse, F., Rodriguez, J. and Bovolenta, P.** (2003). SFRP1 modulates retina cell differentiation through a beta-catenin-independent mechanism. *J. Cell Sci.* **116**, 2471-2481.
- Glise, B., Jones, D. L. and Ingham, P. W.** (2002). Notch and Wingless modulate the response of cells to Hedgehog signalling in the *Drosophila* wing. *Dev. Biol.* **248**, 93-106.
- Han, Y. G., Spassky, N., Romaguera-Ros, M., Garcia-Verdugo, J. M., Aguilar, A., Schneider-Maunoury, S. and Alvarez-Buylla, A.** (2008). Hedgehog signalling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat. Neurosci.* **11**, 277-284.
- He, J., Sheng, T., Stelzer, A. A., Li, C., Zhang, X., Sinha, M., Luxon, B. A. and Xie, J.** (2006). Suppressing Wnt signalling by the hedgehog pathway through sFRP-1. *J. Biol. Chem.* **281**, 35598-35602.
- Jacob, J. and Briscoe, J.** (2003). Gli proteins and the control of spinal-cord patterning. *EMBO Rep.* **4**, 761-765.
- Joksimovic, M., Yun, B. A., Kittappa, R., Anderegg, A. M., Chang, W. W., Taketo, M. M., McKay, R. D. and Awatramani, R. B.** (2009). Wnt antagonism of Shh facilitates midbrain floor plate neurogenesis. *Nat. Neurosci.* **12**, 125-131.
- Katoh, Y. and Katoh, M.** (2006). WNT antagonist, SFRP1, is Hedgehog signalling target. *Int. J. Mol. Med.* **17**, 171-175.
- Koebernick, K., Hollemann, T. and Pieler, T.** (2003). A restrictive role for Hedgehog signalling during otic specification in *Xenopus*. *Dev. Biol.* **260**, 325-338.
- Kuwabara, T., Hsieh, J., Muotri, A., Yeo, G., Warashina, M., Lie, D. C., Moore, L., Nakashima, K., Asashima, M. and Gage, F. H.** (2009). Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat. Neurosci.* **12**, 1097-1105.
- Lai, K., Kaspar, B. K., Gage, F. H. and Schaffer, D. V.** (2003). Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat. Neurosci.* **6**, 21-27.
- Lie, D. C., Colamarino, S. A., Song, H. J., Desire, L., Mira, H., Consiglio, A., Lein, E. S., Jessberger, S., Lansford, H., Dearie, A. R. et al.** (2005). Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* **437**, 1370-1375.
- Locker, M., Agathocleous, M., Amato, M. A., Parain, K., Harris, W. A. and Perron, M.** (2006). Hedgehog signalling and the retina: insights into the mechanisms controlling the proliferative properties of neural precursors. *Genes Dev.* **20**, 3036-3048.
- Locker, M., El Yakoubi, W., Mazurier, N., Dullin, J. P. and Perron, M.** (2010). A decade of mammalian retinal stem cell research. *Arch. Ital. Biol.* **148**, 59-72.
- Machold, R., Hayashi, S., Rutlin, M., Muzumdar, M. D., Nery, S., Corbin, J. G., Gritti-Linde, A., Dellovade, T., Porter, J. A., Rubin, L. L. et al.** (2003). Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* **39**, 937-950.
- Mak, K. K., Chen, M. H., Day, T. F., Chuang, P. T. and Yang, Y.** (2006). Wnt/beta-catenin signalling interacts differentially with Ihh signalling in controlling endochondral bone and synovial joint formation. *Development* **133**, 3695-3707.
- Meijer, L., Skaltsounis, A. L., Magiatis, P., Polychronopoulos, P., Knockaert, M., Leost, M., Ryan, X. P., Vonica, C. A., Brivanlou, A., Dajani, R. et al.** (2003). GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chem. Biol.* **10**, 1255-1266.
- Min, T. H., Kriebel, M., Hou, S. and Pera, E. M.** (2011). The dual regulator Sufu integrates Hedgehog and Wnt signals in the early *Xenopus* embryo. *Dev. Biol.* **358**, 262-276.
- Mu, Y., Lee, S. W. and Gage, F. H.** (2010). Signalling in adult neurogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* **20**, 416-423.
- Nieuwkoop, P. D. and Faber, J.** (1994). *Normal Table of Xenopus laevis*. New York: Garland.
- Ohnuma, S., Philpott, A., Wang, K., Holt, C. E. and Harris, W. A.** (1999). p27Xic1, a Cdk inhibitor, promotes the determination of glial cells in *Xenopus* retina. *Cell* **99**, 499-510.
- Ohnuma, S., Mann, F., Boy, S., Perron, M. and Harris, W. A.** (2002). Lipofection strategy for the study of *Xenopus* retinal development. *Methods* **28**, 411-419.
- Palma, V., Lim, D. A., Dahmane, N., Sanchez, P., Brionne, T. C., Herzberg, C. D., Gitten, Y., Carleton, A., Alvarez-Buylla, A. and Ruiz i Altaba, A.** (2005). Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* **132**, 335-344.
- Perron, M., Kanekar, S., Vetter, M. L. and Harris, W. A.** (1998). The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the *Xenopus* eye. *Dev. Biol.* **199**, 185-200.
- Perron, M., Boy, S., Amato, M. A., Viczian, A., Koebernick, K., Pieler, T. and Harris, W. A.** (2003). A novel function for Hedgehog signalling in retinal pigment epithelium differentiation. *Development* **130**, 1565-1577.
- Po, A., Ferretti, E., Miele, E., De Smaele, E., Paganelli, A., Canettieri, G., Coni, S., Di Marcotullio, L., Biffoni, M., Massimi, L. et al.** (2010). Hedgehog controls neural stem cells through p53-independent regulation of Nanog. *EMBO J.* **29**, 2646-2658.
- Ribes, V., Balaskas, N., Sasai, N., Cruz, C., Dessaud, E., Cayuso, J., Tozer, S., Yang, L. L., Novitsch, B., Marti, E. et al.** (2010). Distinct Sonic Hedgehog signalling dynamics specify floor plate and ventral neuronal progenitors in the vertebrate neural tube. *Genes Dev.* **24**, 1186-1200.
- Sekkali, B., Tran, H. T., Crabbe, E., De Beule, C., Van Roy, F. and Vleminckx, K.** (2008). Chicken beta-globin insulator overcomes variegation of transgenes in *Xenopus* embryos. *FASEB J.* **22**, 2534-2540.
- Tang, M., Villaescusa, J. C., Luo, S. X., Guitarte, C., Lei, S., Miyamoto, Y., Taketo, M. M., Arenas, E. and Huang, E. J.** (2010). Interactions of Wnt/beta-catenin signalling and sonic hedgehog regulate the neurogenesis of ventral midbrain dopamine neurons. *J. Neurosci.* **30**, 9280-9291.
- Tran, H. T., Sekkali, B., Van Imschoot, G., Janssens, S. and Vleminckx, K.** (2010). Wnt/beta-catenin signalling is involved in the induction and maintenance of primitive hematopoiesis in the vertebrate embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 16160-16165.
- Ulloa, F. and Marti, E.** (2010). Wnt won the war: antagonistic role of Wnt over Shh controls dorso-ventral patterning of the vertebrate neural tube. *Dev. Dyn.* **239**, 69-76.
- van den Brink, G. R., Bleuming, S. A., Hardwick, J. C., Schepman, B. L., Offerhaus, G. J., Keller, J. J., Nielsen, C., Gaffield, W., van Deventer, S. J., Roberts, D. J. et al.** (2004). Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signalling in colonic epithelial cell differentiation. *Nat. Genet.* **36**, 277-282.
- van Dop, W. A., Uhmman, A., Wijgerde, M., Sleddens-Linkels, E., Heijmans, J., Offerhaus, G. J., van den Bergh Weerman, M. A., Boeckxstaens, G. E., Hommes, D. W., Hardwick, J. C. et al.** (2009). Depletion of the colonic epithelial precursor cell compartment upon conditional activation of the hedgehog pathway. *Gastroenterology* **136**, 2195-2203 e1-7.
- Van Raay, T. J., Moore, K. B., Iordanova, I., Steele, M., Jamrich, M., Harris, W. A. and Vetter, M. L.** (2005). Frizzled 5 signalling governs the neural potential of progenitors in the developing *Xenopus* retina. *Neuron* **46**, 23-36.
- Wetts, R., Serbedzija, G. N. and Fraser, S. E.** (1989). Cell lineage analysis reveals multipotent precursors in the ciliary margin of the frog retina. *Dev. Biol.* **136**, 254-263.
- Xu, Q., D'Amore, P. A. and Sokol, S. Y.** (1998). Functional and biochemical interactions of Wnts with FrzA, a secreted Wnt antagonist. *Development* **125**, 4767-4776.
- Yu, W., McDonnell, K., Taketo, M. M. and Bai, C. B.** (2008). Wnt signalling determines ventral spinal cord cell fates in a time-dependent manner. *Development* **135**, 3687-3696.

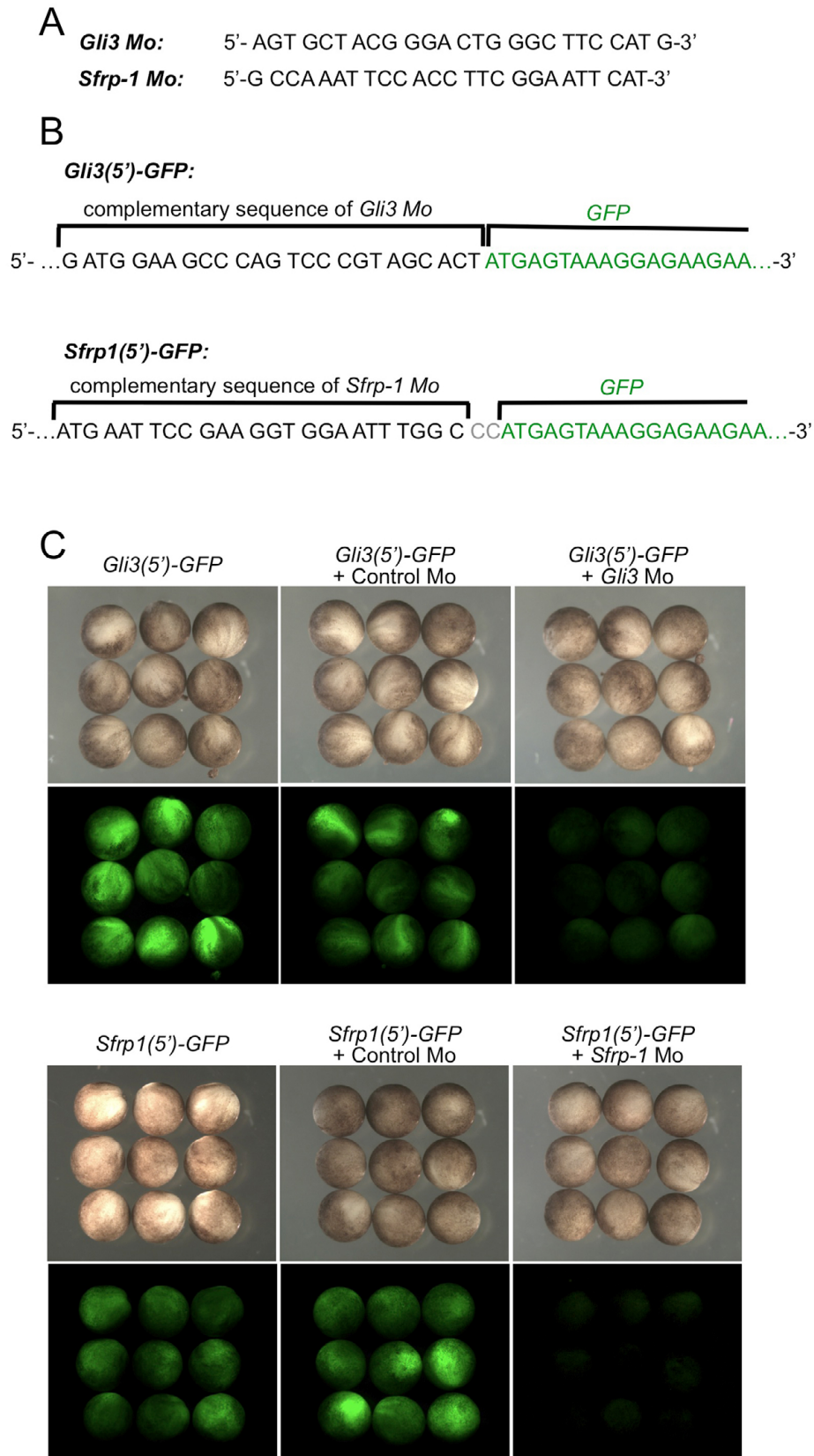


Fig. S1. In vivo validation of *Gli3* and *Sfrp-1* morpholino efficiency. (A) *Gli3* and *Sfrp-1* morpholinos (Mo) have been designed to target the ATG region of the corresponding transcripts. (B) Schematic representation of the chimeric constructs containing *GFP* fused downstream of *Gli3* or *Sfrp-1* Mo-complementary sequence [*Gli3*(5')-*GFP* or *Sfrp-1*(5')-*GFP*]. (C) In vivo *GFP* fluorescence was analysed at stage 19 following co-injection of the indicated Mo and *GFP* mRNA constructs. *Gli3* and *Sfrp-1* Mo inhibited *GFP* translation from *Gli3*(5')-*GFP* and *Sfrp-1*(5')-*GFP* constructs, respectively, whereas control Mo did not.

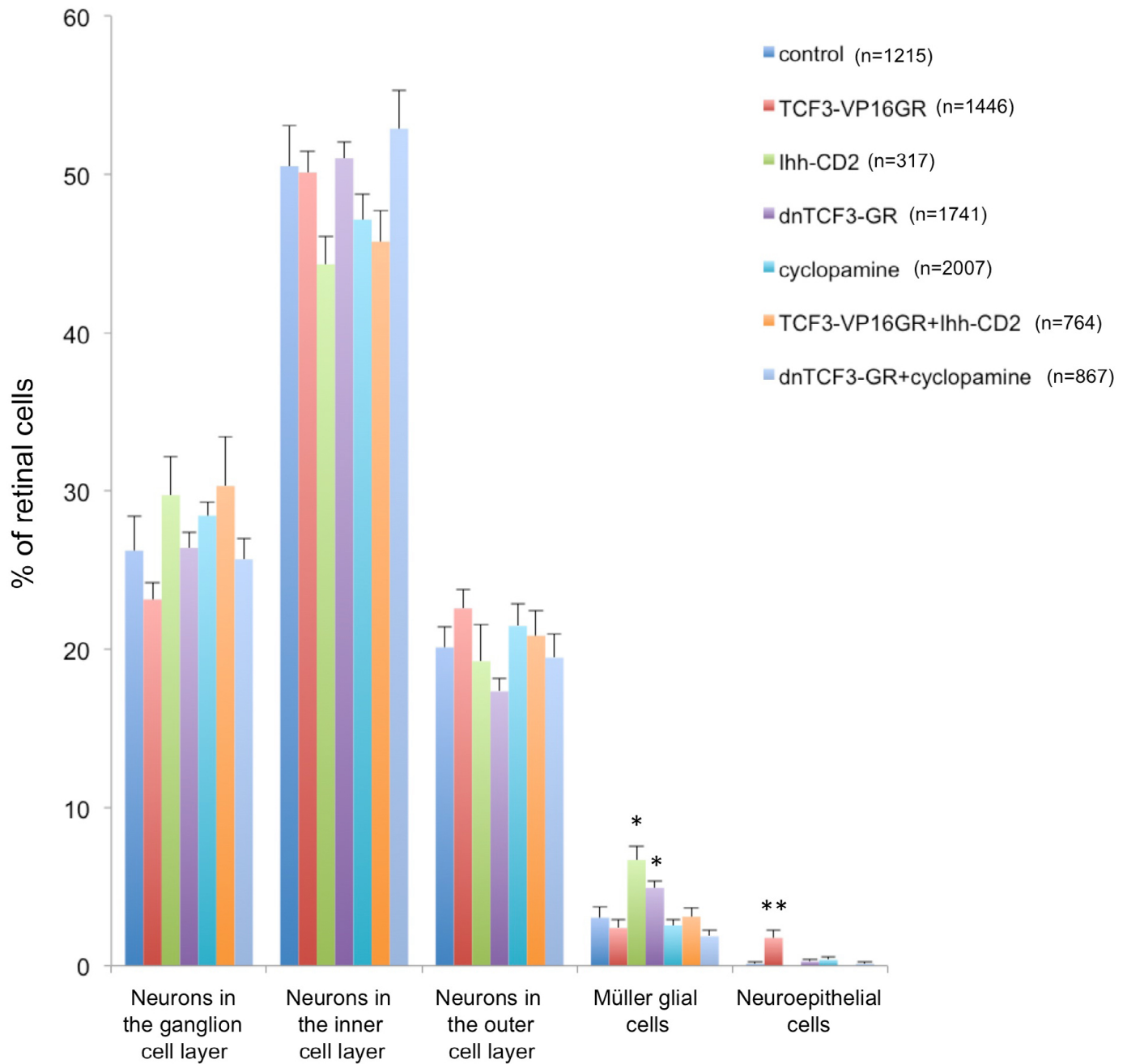


Fig. S2. Clonal analysis of cell type distribution in the retina following interference with Wnt and Hedgehog signalling pathways. Percentage of retinal cells observed in stage 41 retinas following in vivo lipofection with the indicated constructs. Cyclopamine treatment was performed from stage 18 onwards on embryos lipofected with *GFP*. Hedgehog or Wnt signalling perturbation significantly affects the percentage of Müller or neuroepithelial cells (see also Fig. 1). However, as these cells represent very minor cell subpopulations, their variations do not significantly impact on the percentage of neurons (which represent around 95% of total cells). Total number of counted cells is indicated for each condition. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Student's *t*-test).

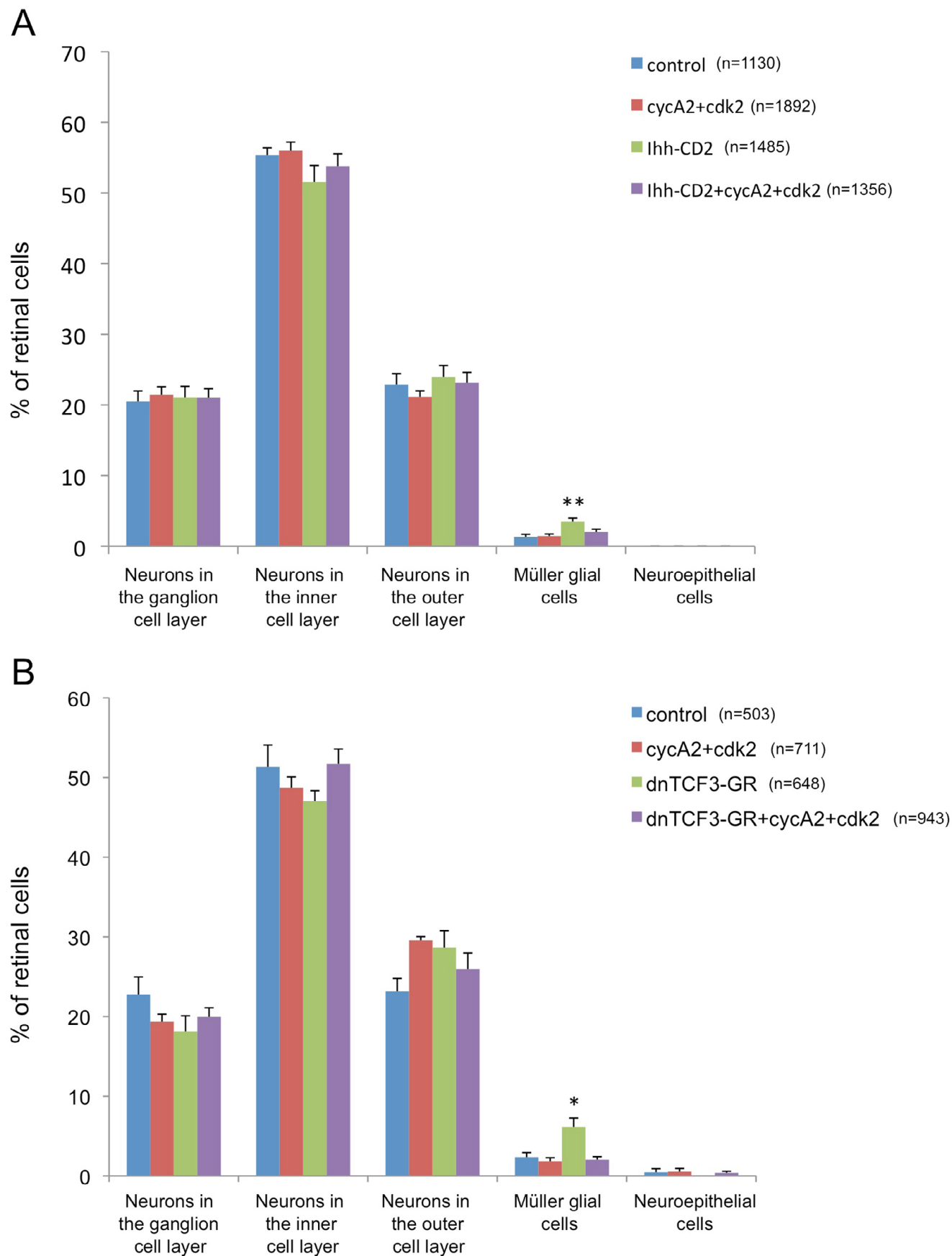


Fig. S3. Co-lipofection of *cyclinA2/cdk2* with either *Ihh-CD2* or *dnTCF3-GR* leads to a cell distribution indistinguishable from that observed in a control situation. (A,B) Percentage of retinal cells observed in stage 41 retinas following in vivo lipofection with the indicated constructs. Total number of counted cells is indicated for each condition. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Student's *t*-test).

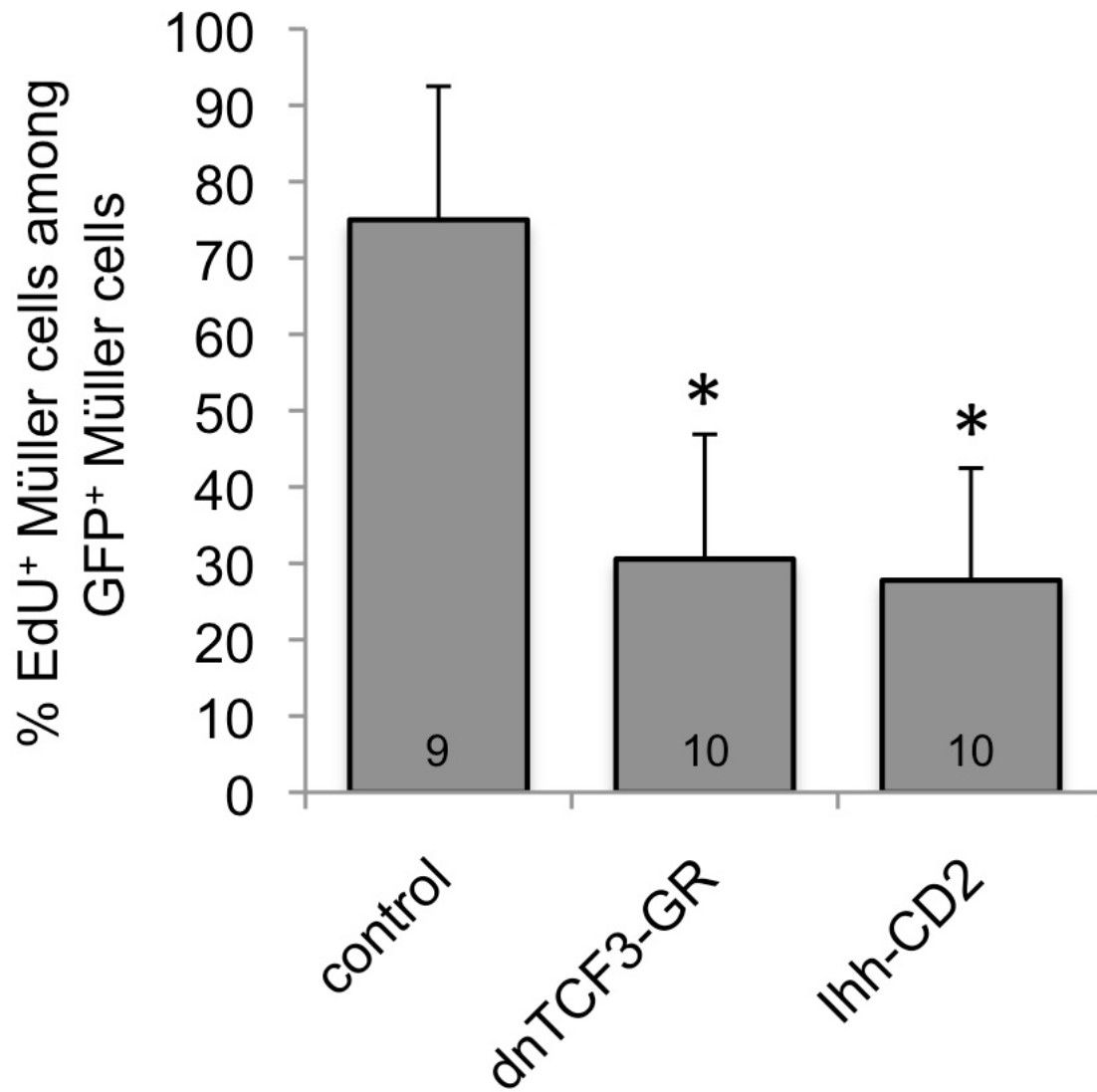


Fig. S4. Hedgehog and Wnt pathways have opposite impacts on cell cycle exit of Müller cells. Birthdating experiments (from stage 32 to stage 41) following in vivo lipofection with the indicated constructs. Transfected Müller cells that have exited the cell cycle before EdU exposure (stage 32) are EdU⁻ at stage 41, whereas Müller cells that have exited the cell cycle at any time during the EdU incorporation period are EdU⁺. Graph represents the percentage of EdU⁺ Müller cells among transfected Müller cells. Total number of analysed Müller cells per condition is indicated in each bar. * $P < 0.05$ (Student's *t*-test).

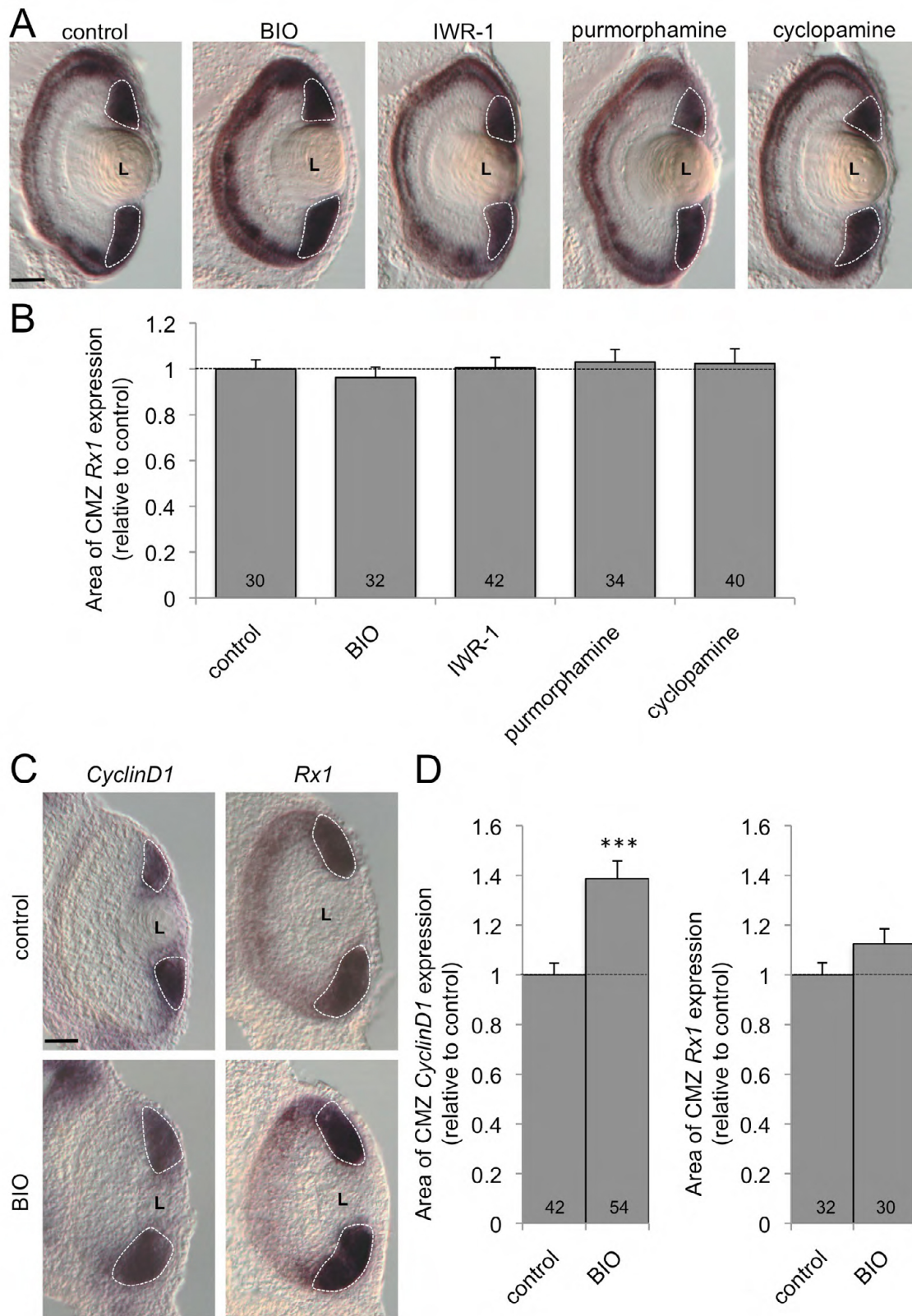


Fig. S5. The overall size of the CMZ is not affected upon pharmacological perturbation of the Wnt or Hedgehog signalling pathway. (A,B) In situ hybridisation analyses (A) of *Rx1* expression on stage 41 retinal sections 24 hours following BIO, IWR-1, purmorphamine or cyclopamine treatment as indicated. (B) Quantification of *Rx1* staining area per CMZ in each condition. (C,D) In situ hybridisation analyses (C) of *CyclinD1* or *Rx1* expression on stage 38 retinal sections 24 hours following treatment with BIO. (D) Quantifications of staining area for each transcript. Total number of analysed sections per condition is indicated in each bar. *** $P < 0.001$ (Student's *t*-test). Labelling in the CMZ is delineated with dotted lines. L, lens. Scale bar: 40 μ m.

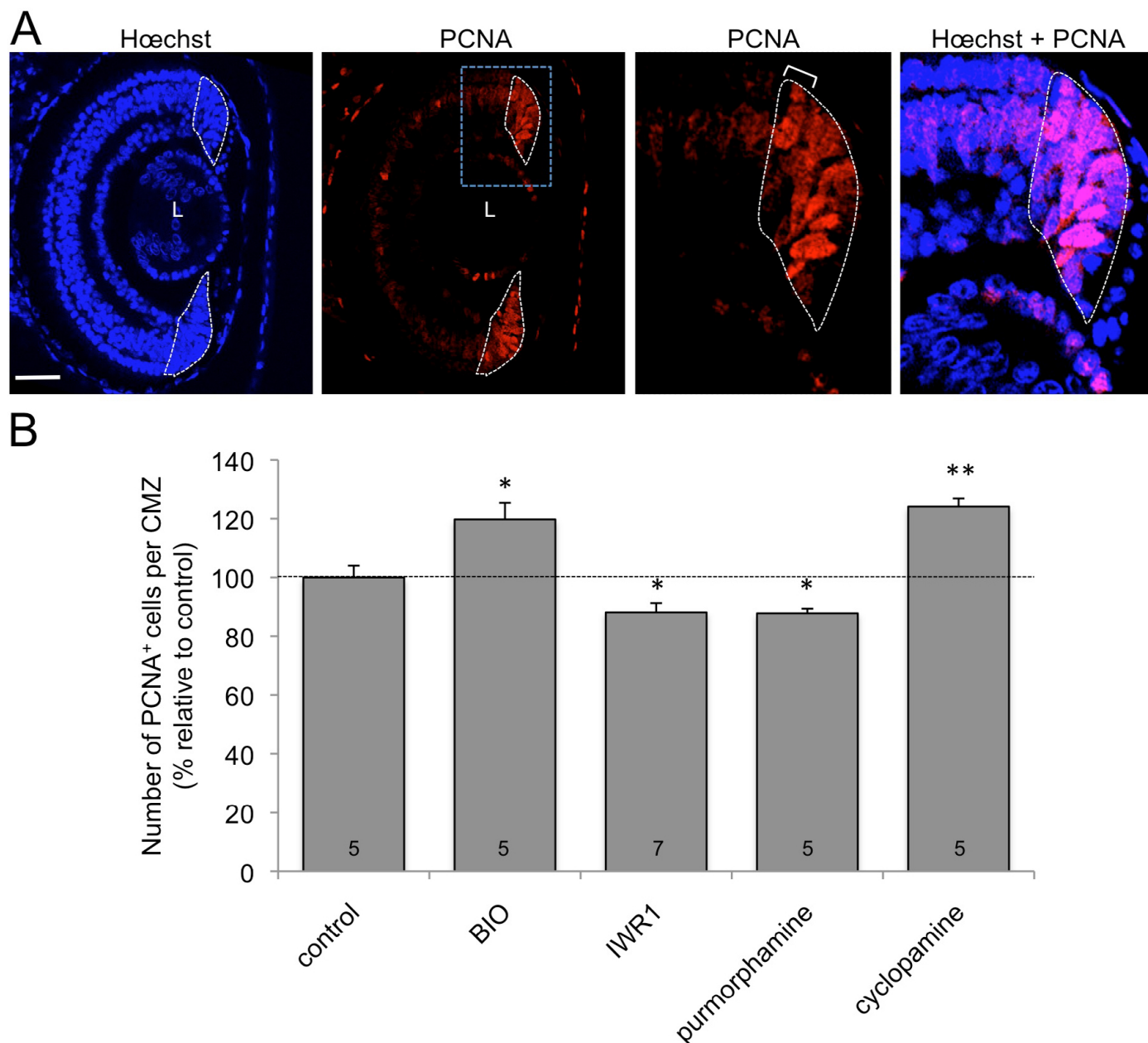


Fig. S6. PCNA immunostaining in the post-embryonic retina following pharmacological perturbation of the Wnt or Hedgehog signalling pathway. PCNA labelling analysis on stage 41 retinal sections 24 hours following treatment with the indicated drugs. **(A)** Typical control retinal section immunostained with anti-PCNA. Pictures on the right show high magnifications of the CMZ (delineated with dotted lines). Note that PCNA labels the whole CMZ, i.e. proliferative cells as expected, but also newly born postmitotic cells in the most central part of the CMZ (bracket). This is likely to be due to the long half-life of the antigen. **(B)** Quantification of PCNA⁺ cells in the CMZ. Total number of analysed retinas per condition is indicated in each bar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Student's t -test). L, lens. Scale bar: 40 μm .

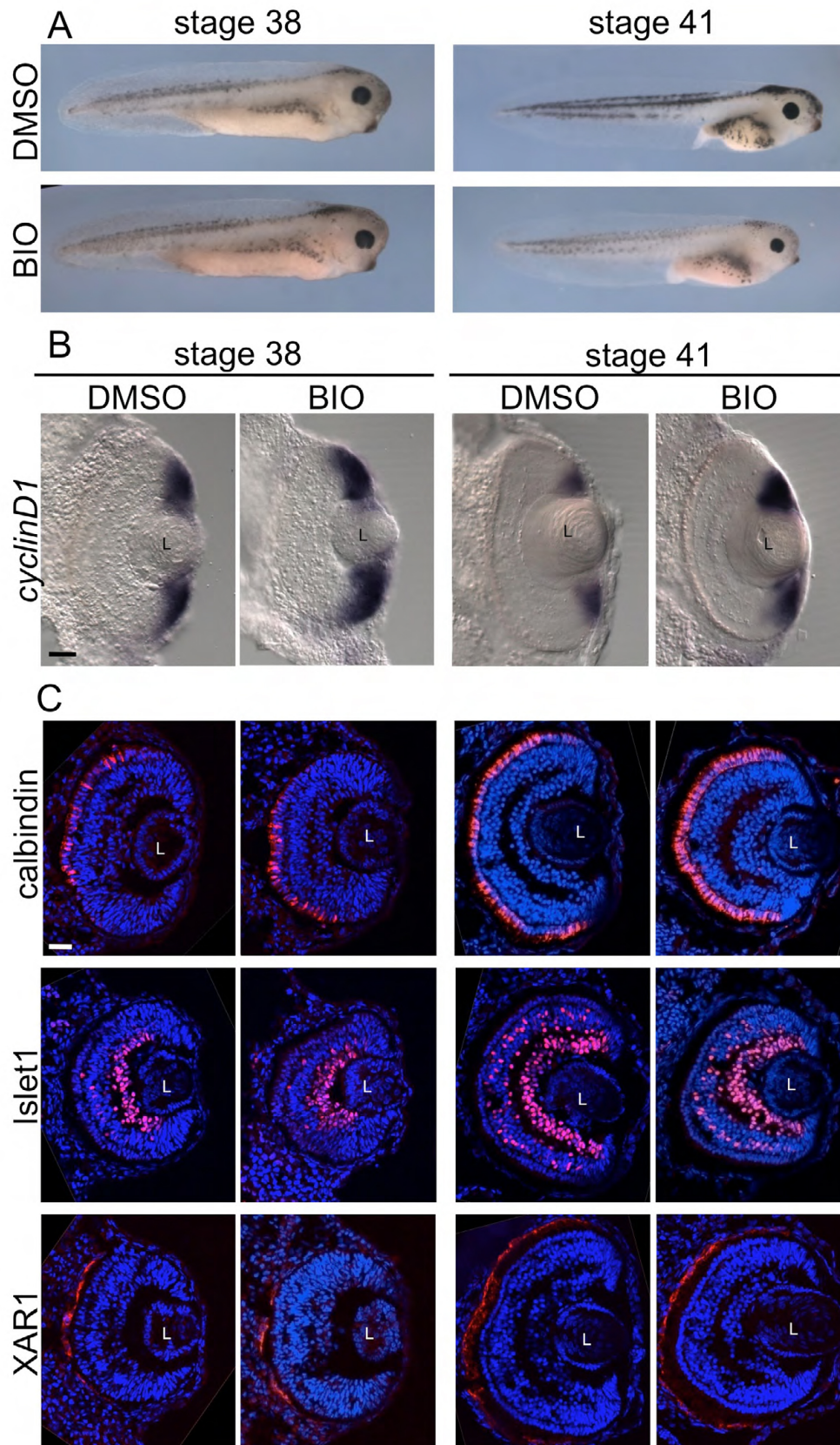


Fig. S7. Twenty-four hours of Wnt pathway activation does not delay development nor does it affect the central retina. (A) Tadpoles treated with BIO for 24 hours do not display any developmental delay, as judged by their overall morphology. (B) In situ hybridisation analysis of *CyclinD1* expression on retinal sections following a 24-hour BIO treatment, illustrating the effective activation of the Wnt pathway. (C) Immunofluorescence analysis of cell type-specific markers on sibling tadpoles. Calbindin is a marker of photoreceptor cells, Islet1 labels ganglion cells and a subtype of bipolar cells and XAR1 stains the RPE. L, lens. Scale bar: 40 μ m.

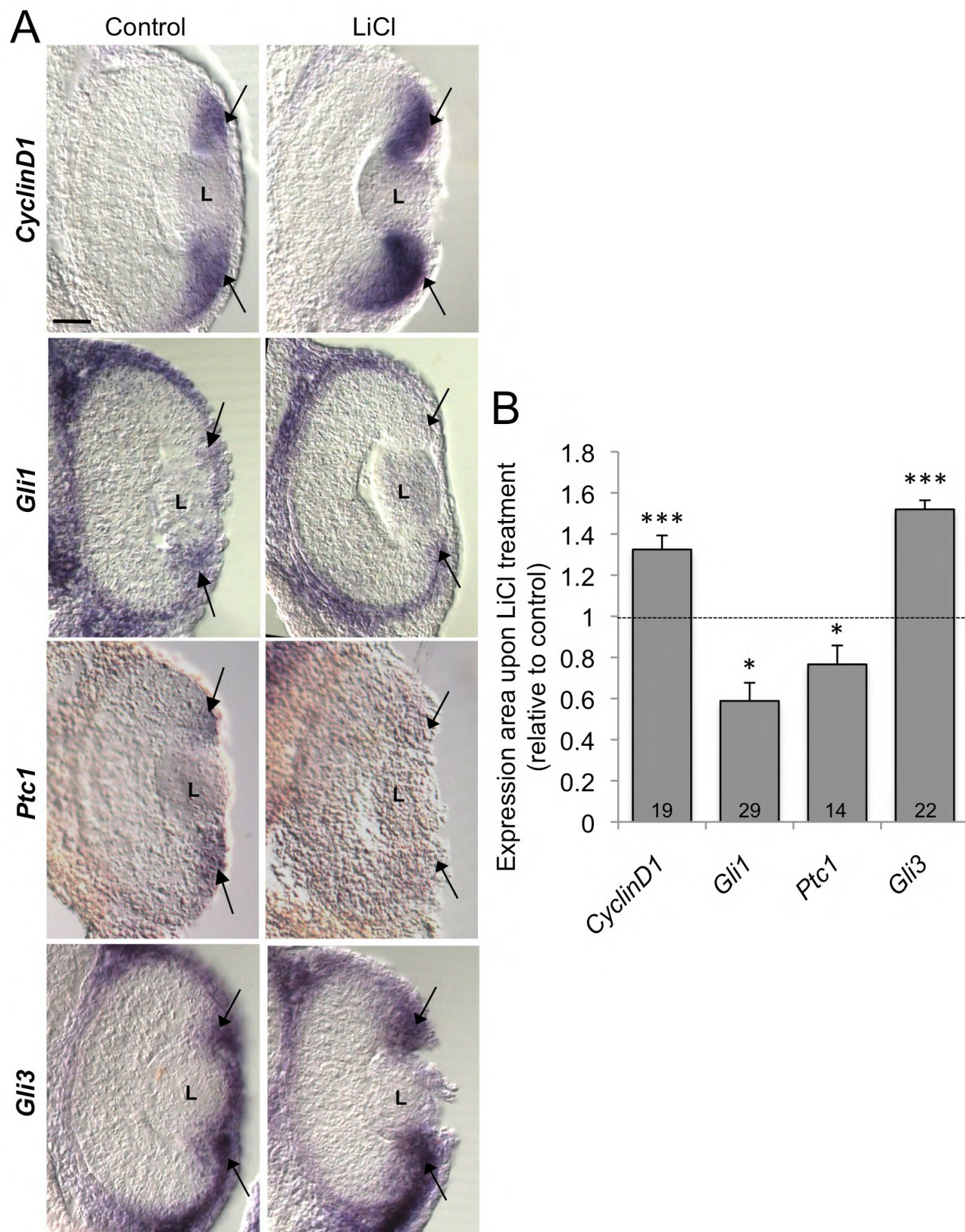


Fig. S8. Wnt pathway activation downregulates the Hedgehog target genes *Gli1* and *Ptc1* but increases *Gli3* expression. (A,B) In situ hybridisation analyses (A) of *CyclinD1*, *Gli1*, *Ptc1* or *Gli3* expression on stage 38 retinal sections 24 hours following LiCl treatment. Arrows indicate CMZ labelling. (B) Quantification of staining area for each gene. Compared with controls, LiCl-treated embryos exhibit decreased *Gli1* and *Ptc1* staining, whereas *Gli3* expression is enhanced. Total number of analysed sections per condition is indicated in each bar. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ (Student's *t*-test). L, lens. Scale bar: 40 μm .

Table S1. PCR primer sequences

<i>Xenopus laevis</i> qPCR primers		
Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Gli3</i>	GGCCCCACCAACACCACTG	CCGTGGGACATTGACCGAAGGA
<i>Patched1</i>	CAGCTGCCCAGCCGAGGGTA	GGGCGAAATTGGCATCGCAGTA
<i>ODC</i>	GCTTCTGGAGCGGGCAAAGGA	CCAAGCTCAGCCCCCATGTCA
<i>RPL8</i>	CCACGTGTCCGTGGTGTGGCTA	GCGCAGACGACCAGTACGACGA
<i>Sfrp1</i>	CAGTGAGACAATGGCGGAGGTGAA	GGGGCGAAGAGAGAGCACAGGA
<i>Xenopus tropicalis</i> qPCR primers		
Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Patched1</i>	CAGCTGCCCAGCCGAGGGTA	TCCTGGTCAGGCGGCGCTACTA
<i>ODC</i>	CATGGCATTCTCCCTGAAGTACCAGAA	GGACAGATGGTAGGGGCAAGCTCA
<i>RPL8</i>	CGCCACCGTTATCTCCCACAATC	CCACCAGCAACAACCCCAACA

3. Recherche de nouveaux acteurs de la prolifération et de la détermination cellulaire de la rétine

3.1. Identification de nouveaux marqueurs rétiniens

Afin d'identifier de nouveaux acteurs du réseau de signalisation et du réseau transcriptionnel impliqués dans la prolifération des précurseurs et la spécification des sous-types rétiniens, j'ai cherché de nouveaux marqueurs de la rétino-genèse tels que des marqueurs de cellules souches ou de différentes populations de cellules progénitrices. Pour cela, lors de ma deuxième année de thèse, j'ai participé, dans le cadre d'une collaboration avec Karine Parain (Assistante Ingénieure au laboratoire) et Nicolas Pollet (Metamorphosys-ISSB, Genopole, CNRS, Université d'Evry, Evry), à la réalisation d'un crible à grande échelle. Les résultats sont résumés ci-dessous et présentés dans l'article N°3 :

Publication :

Parain K*, **Mazurier N***, Bronchain O, Borday C, Cabochette P, Chesneau A, Colozza G, El Yakoubi W, Hamdache J, Locker M, Gilchrist M, Pollet N, Perron M (2011) A large scale screen for neural stem cell markers in *Xenopus* retina. ***Developmental Neurobiology***, 72(4):491-506. *co-premier auteur.

Le principe de cette étude repose sur des hybridations *in situ* systématiques de sondes anti-sens d'ARN de *Xenopus tropicalis* conçues à partir de deux sources. La première provient de séquences partielles d'ADNc choisies au hasard dans une banque d'EST (Expressed Sequence Tag) extrait de têtes entières et de rétines embryonnaires (Fierro et al., 2007). La seconde source est issue de séquences d'ADNc complètes et entièrement séquencées au Genoscope (données non publiées). Les hybridations *in situ* ont été réalisées sur des têtards entiers de *Xenopus tropicalis*. Par la suite, les têtards présentant un marquage dans la rétine ont été sectionnés pour une analyse fine du profil d'expression dans la rétine.

A partir de 1113 clones préalablement séquencés partiellement ou complètement, 485 (44%) ont présenté un profil d'expression dans la rétine. Parmi eux, nous avons pu identifier 15 marqueurs de toute la ZMC, 6 gènes exclusivement exprimés dans des cellules progénitrices et 18 marqueurs spécifiques des cellules souches. D'autre part, ce crible a permis la mise en évidence de nombreux autres marqueurs des différents types cellulaires rétiniens. Nous avons donc décidé de rendre ces données accessibles à la communauté scientifique en développant en collaboration avec M. Gilchrist (MRC, National Institute for Medical Research, London, UK) un nouveau module de la base de données XenMARK (Gilchrist et al., 2009), afin de pouvoir annoter les patrons d'expression sur coupes de rétines. Ce site constitue la première base de données de marqueurs d'un tissu à l'échelle cellulaire. Il s'agit d'un outil d'utilisation simple et rapide pour rechercher, en coloriant la zone d'expression choisie, des marqueurs rétiniens par exemple d'un type de neurones (photorécepteurs, cellules ganglionnaires...) ou des cellules souches et/ou progénitrices.

Nous avons ensuite centré notre étude sur les 18 gènes spécifiquement exprimés à l'extrême périphérie de la ZMC, là où résident les cellules souches rétiennes. L'un d'eux, le facteur de transcription *Hes4*, a fait l'objet d'études fonctionnelles au laboratoire. Les résultats suggèrent que le gène *Hes4* maintient dans un état « souche » (une population cellulaire embryonnaire destinée à devenir le pool de cellules souches rétiennes post-embryonnaires (El Yakoubi et al., 2012). Les autres gènes identifiés à la suite de ce crible à grande échelle codent principalement pour des types protéiques impliqués dans la régulation du cycle cellulaire mais aussi dans le métabolisme, la transduction des signaux ou encore le contrôle de l'expression génique.

Article N°3

*A large scale screen for neural stem cell
markers in Xenopus retina*

A Large Scale Screen for Neural Stem Cell Markers in *Xenopus* Retina

Karine Parain,^{1*} Nicolas Mazurier,^{1*} Odile Bronchain,¹ Caroline Borday,¹ Pauline Cabochette,¹ Albert Chesneau,¹ Gabriele Colozza,¹ Warif El Yakoubi,¹ Johanna Hamdache,¹ Morgane Locker,¹ Michael J. Gilchrist,² Nicolas Pollet,³ Muriel Perron¹

¹ Neurobiology and Development Laboratory, CNRS UPR 3294, Univ Paris-Sud, Orsay, France

² MRC National Institute for Medical Research, The Ridgeway, Mill Hill, London NW7 1AA, United Kingdom

³ Metamorphosys—iSSB, Genopole, CNRS, University of Evry, Evry, France

Received 26 April 2011; revised 24 August 2011; accepted 25 August 2011

ABSTRACT: Neural stem cell research suffers from a lack of molecular markers to specifically assess stem or progenitor cell properties. The organization of the *Xenopus* ciliary marginal zone (CMZ) in the retina allows the spatial distinction of these two cell types: stem cells are confined to the most peripheral region, while progenitors are more central. Despite this clear advantage, very few genes specifically expressed in retinal stem cells have been discovered so far in this model. To gain insight into the molecular signature of these cells, we performed a large-scale expression screen in the *Xenopus* CMZ, establishing it as a model system for stem cell gene profiling. Eighteen genes expressed specifically in the CMZ stem cell compartment were retrieved and are discussed here. These encode various types of proteins, including factors associated with proliferation,

mitotic spindle organization, DNA/RNA processing, and cell adhesion. In addition, the publication of this work in a special issue on *Xenopus* prompted us to give a more general illustration of the value of large-scale screens in this model species. Thus, beyond neural stem cell specific genes, we give a broader highlight of our screen outcome, describing in particular other retinal cell markers that we found. Finally, we present how these can all be easily retrieved through a novel module we developed in the web-based annotation tool XenMARK, and illustrate the potential of this powerful searchable database in the context of the retina. © 2011 Wiley Periodicals, Inc. *Develop Neurobiol* 72: 491–506, 2012

Keywords: neural stem cells; retina; XenMARK; *Xenopus*

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence to: M. Perron (muriel.perron@u-psud.fr).

Contract grant sponsors: ANR (06-JCJC-0108-01 and 056054); CNRS, Univ Paris-Sud, Retina France, ARC (1108); Medical Research Council (U.1175.01.007.00002.01); Genopole, Genoscope, CNRS and University of Evry.

© 2011 Wiley Periodicals, Inc.

Published online 30 August 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI 10.1002/dneu.20973

INTRODUCTION

The vertebrate retina is a model system for studying mechanisms underlying neural cell proliferation, fate choice, signaling, and tissue patterning. This comes from its accessibility and remarkable simplicity. The retina indeed only contains six major classes of neurons and a single class of glial cell, the Müller glia. These cell types can be easily distinguished from one another by their morphology and laminar position within the three nuclear layers of the retina. The

outer nuclear layer consists of two major classes of photoreceptors, rods and cones. The inner nuclear layer contains Müller cells, as well as horizontal, bipolar, and amacrine interneurons. The ganglion cell layer is composed of displaced amacrine cells and retinal ganglion cells, which send their axons through the optic nerve to various targets in the brain. Significantly, in fish and amphibians, a site of continuous neurogenesis is found in the periphery of the mature retina, allowing it to grow throughout the lifespan of these animals. This region, called the ciliary marginal zone (CMZ), consists of a ring of cells organized in a spatial gradient of differentiation: at the extreme edge lie multipotent and self-renewing stem cells, while more centrally are situated committed, proliferative progenitors, followed by differentiating neuroblasts and finally post-mitotic neurons. Notably, it has been shown that this spatial order recapitulates the temporal events occurring during embryonic neurogenesis (Perron et al., 1998; Casarosa et al., 2005). In amphibians, ciliary marginal cells participate in the regeneration process after retinal injury (Keefe, 1973; Yoshii et al., 2007). The situation is different in birds and mammals. Hatched chicken retinas contain a population of proliferating cells at the peripheral margin, but their activity is only transient and their neurogenic potential more limited compared to that of fish and amphibians (Fischer and Reh, 2000). A rudimentary CMZ has also been found in newborn opossums (Kubota et al., 2002). Although no similar structure has been recognized in placental mammals, the marginal region of the adult human retina was recently reported to contain cells that express stem cell markers and proliferate in response to EGF (Epidermal Growth Factor (Bhatia et al., 2009)). This led to the proposal that the human retina might be endowed with some regenerative potential. In addition, cells able to clonally expand and express retinal cell markers when cultured *in vitro* (Ahmad et al., 2000; Tropepe et al., 2000; Coles et al., 2004) were identified in the murine and human ciliary body epithelium, a tissue derived from the optic cup and located between the retina and the iris. The ciliary body of the adult mammalian eye might thus harbor a population of retinal stem cells, although in a quiescent state *in vivo*. Despite an open debate on their differentiation capabilities (MacNeil et al., 2007; Cicero et al., 2009; reviewed in Locker et al., 2010), their discovery offered hope for the use of stem cell-based therapies to treat neurodegenerative diseases of the eye, and intensified interest for research in the field of retinal stem cell biology.

Reliable markers of stem and progenitor cells are critical in this context to distinguish and characterize these cell types. The CMZ of amphibians offers an

exceptional model to search for such markers *in vivo*, as its spatial organization allows to discriminate the stem cell niche from the progenitor-containing zone. We thus used it as a paradigm to identify retinal stem cell marker genes. To this end, we performed a large scale *in situ* hybridization screen, and identified many novel markers for a number of retinal cell types. To provide a simple discovery method based on gene expression pattern retrieval, we used the XenMARK bioinformatic tool to generate spatial annotation of the 485 images of labeled retinal sections generated in our study. As a useful comparison point, known markers of various retinal cell populations already available in the literature were also included in the database. From our screen, we were able to define 18 previously unknown retinal stem cell marker genes based on their specific expression in the most peripheral region of the CMZ. This represents a huge step in the field of retinal stem cells, given the very low number of such markers described so far.

METHODS

cDNA Libraries

cDNA clones derive from two different Libraries: LIBEST_016859 NIH_XGC_tropTe3 (clones RY0BAD1 and RY0BAD2) and LIBEST_015540 *Xenopus tropicalis* xthr plasmid (clones EC2CAA2 and EC2CAA19).

Large Scale RNA Probe Synthesis

DNA preparations using “Nucleospin Multi-96 Plus Plasmid” were performed following the manufacturer’s instructions (Macherey Nagel). Polymerase chain reaction (PCR) amplifications of cDNA inserts were carried out with M13F/M13R or T3/T7 primers in 96-well plates. Digoxigenin-labeled antisense RNA probes were generated with T7 RNA polymerase from about 100 ng of PCR product, according to the manufacturer’s instruction (Roche). RNA probes were then purified using sephadex G50 columns in a Multiscreen 96-well plate as previously described (Pollet and Niehrs, 2001).

Large-Scale Whole Mount *In Situ* Hybridization

Xenopus tropicalis embryos were obtained by hormone-induced egg laying and natural spawning. Stage 39 tadpoles were fixed in MEMFA (3.7% formaldehyde, 1× MEM) for at least 2 h at room temperature and stored at −20°C in 100% methanol. The protocol for embryo preparation before *in situ* hybridization mainly derives from the work by Harland (1991). Briefly, embryos were rehydrated and treated with 10 µg/mL proteinase K for 10 min. A bleaching treatment (Broadbent and Read, 1999) was then performed, followed by a 20-min post-fixation in 4% paraformaldehyde plus 0.3%

glutaraldehyde. Embryos were subsequently pre-hybridized at least 4 h in hybridization buffer at 63°C and stored at –20°C for subsequent use. The *in situ* hybridization steps were performed as described by Pollet and Niehrs (2001), with minor additional changes. Briefly, following overnight incubation at 63°C with the probes, specimens were rinsed in 2× Saline-Sodium Citrate (SSC)/hybridization buffer (50:50) and washed for 40 min twice in 2× SSC and twice in 0.2× SSC at 65°C. Before incubation with anti-DIG antibody, embryos were rinsed in TNX (0.1% Tris, 0.05M NaCl, 0.1% Triton X100) and incubated for 2 h in TNX/2% BR (Blocking Reagent, Roche). Alkaline Phosphatase-conjugated anti-DIG antibody (Roche 1/10,000) was applied overnight at 4°C or 2 h room temperature in TNX/2% BR. Embryos were then rinsed five times for 1 h in TNX. Alkaline phosphatase activity was revealed using NBT/BCIP substrate (Roche). The hybridization and the washing steps were performed either manually or using an *In Situ* Pro robot (Intavis). Selected embryos were then vibratome sectioned (50 µm).

Imaging and XenMARK Annotation

Whole mount images were captured using an Olympus SZX12 stereomicroscope with a Spot Insight color camera. Retinal sections were analyzed with a M2 Zeiss microscope and images captured with a digital camera AxioCam MRC and AxioVision Rel 7.8 software.

Groups of images were uploaded to XenMARK, the database of queryable gene expression patterns for *Xenopus*. Annotation of expression patterns were performed following previously described procedure (Gilchrist et al., 2009). To extend the XenMARK system to support this work, we added a schematic line drawing of a stage 39 retinal section, from which markers can be retrieved by selecting a zone of interest.

Sequence Analysis and Annotation

Our cDNA sequences were compared to the RefSeq and the *Xenopus tropicalis* genome sequence databases using NCBI BLAST. We accepted a match when aligned sequences were more than 95% identical over at least 200 bp. We then used the matches to RefSeq sequences to assign a gene name and symbol from Xenbase to the corresponding cDNA clone. In parallel, we used matches to the *X. tropicalis* genome sequence to confirm the identity of cDNA clones or to identify the corresponding gene when its sequence was not found in RefSeq. Finally, we extracted the protein sequences for the genes corresponding to our clones, and performed a Gene ontology (GO) annotation using Blast2GO (Conesa et al., 2005).

RESULTS AND DISCUSSION

A Large Scale *In Situ* Hybridization Screen to Isolate Retinal Cell Markers

The main goal of this study was to isolate novel retinal stem cell markers. Taking advantage of the well-characterized spatial organization of the *Xenopus* CMZ,

we undertook a large scale *in situ* hybridization screen and looked for genes specifically expressed in its most peripheral stem cell containing region. *Xenopus tropicalis* probes were designed from two sources: (a) partial cDNA sequences from two arbitrarily selected 384-well plates from an embryonic head and retina library which had been EST-sequenced earlier (Fierro et al., 2007) and (b) predicted full-length cDNAs from two 384-well plates entirely sequenced (unpublished data). One thousand one hundred six bacterial clones from these were successfully used to generate PCR templates for RNA probe synthesis. These probes were then tested in whole mount *in situ* hybridizations on stage 39 *Xenopus tropicalis* tadpoles.

From the whole mount expression profiles, 26% of the clones were scored as showing ubiquitous labeling, 27% generated weak or undetectable signal and 47% displayed restricted staining, based on previously described criteria (Pollet et al., 2005). Although the present study focuses on the retina, it is worth mentioning that we found genes of potential interest as markers for a variety of other tissues, such as the liver, pronephros, brain, etc (Fig. 1). For our purposes, specimens exhibiting labeled eyes ($n = 485$, 44%) were sectioned for further analysis of the precise expression profile.

To sort out expression patterns into distinct categories, we subdivided the eye into nine compartments [Fig. 2(A–I)]: the CMZ at the periphery of the retina (A), comprising a stem cell containing region at the tip (B) and a progenitor containing region in the central part (C), the lens (D), the ganglion cell layer (E), the inner nuclear layer (F), the outer nuclear layer (G), the retinal pigment epithelium (H), and the optic nerve (I). Out of 485 analyzed clones, 371 displayed unambiguous expression patterns in the eye, and amongst those, we scored 95 clones (20%) showing a specific and exclusive expression pattern in one of the nine defined areas (Fig. 2, Table 1, and Supporting Information Table 1).

Retinal Neuron Markers Retrieved from the Screen

Compared to microarray or RNA deep sequencing analyses, this type of screen is quantitatively limited in terms of sorted genes but has the qualitative advantage that it allows for immediate visualization of gene expression specificity as a primary mode of analysis. As far as retinal neurons are concerned, our *in situ* hybridization screen was most successful in isolating specific ganglion cell markers (Fig. 2); indeed we found 33 *Xenopus* genes exclusively

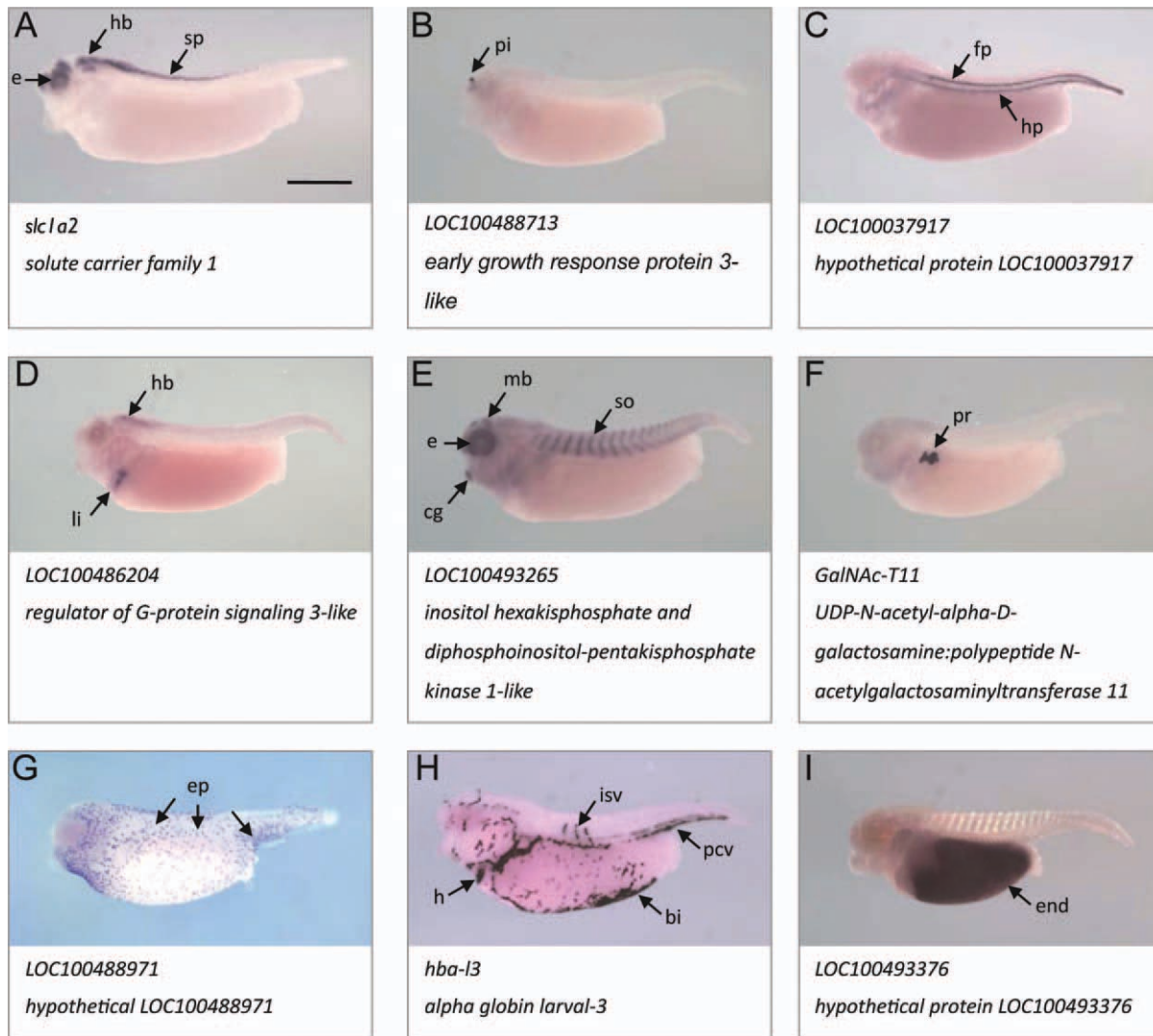


Figure 1 Diversity of whole mount expression profiles retrieved from the screen. Examples of expression patterns obtained from the screen following whole mount *in situ* hybridization on stage 39 *Xenopus tropicalis* tadpoles. As expected from the origin of the cDNA libraries, a large proportion of the clones display expression in the nervous system including the eye (A) or in restricted areas of the nervous system such as the pineal gland (B) or floorplate/hypochord (C). Some are expressed in both the nervous system and in another tissue, such as the liver (D) or the somites (E). Other, however, are exclusively expressed outside the nervous system, for instance in the pronephros (F), in specialized cells of the epidermis, probably ionocytes (G), in blood islands and vessels (H) or in the endoderm (I). bi: blood islands; cg: cement gland; e: eye; end: endoderm; ep: scattered epidermal cells; fp: floorplate; h: heart; hb: hindbrain; hp: hypochord; isv: inter somitic vein; li: liver; mb: midbrain; pcv: posterior cardinal vein; pi: pineal gland; pr: pronephros; so: somites; sp: spinal chord. Tadpoles are shown in lateral view, dorsal to the top and anterior to the left. Gene symbol and gene description are indicated under each panel. Scale bar = 500 μ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

expressed in the ganglion cell layer. One of these is an already known marker of this cell type in *Xenopus*, *neuropilin 1* (Fujisawa et al., 1995), which is involved in axon guidance. Others represent novel

markers, and two interesting examples will be given here. The phosphatase slingshot has previously been described to be involved in growth cone motility and neurite extension (Endo et al., 2007; Wen et al.,

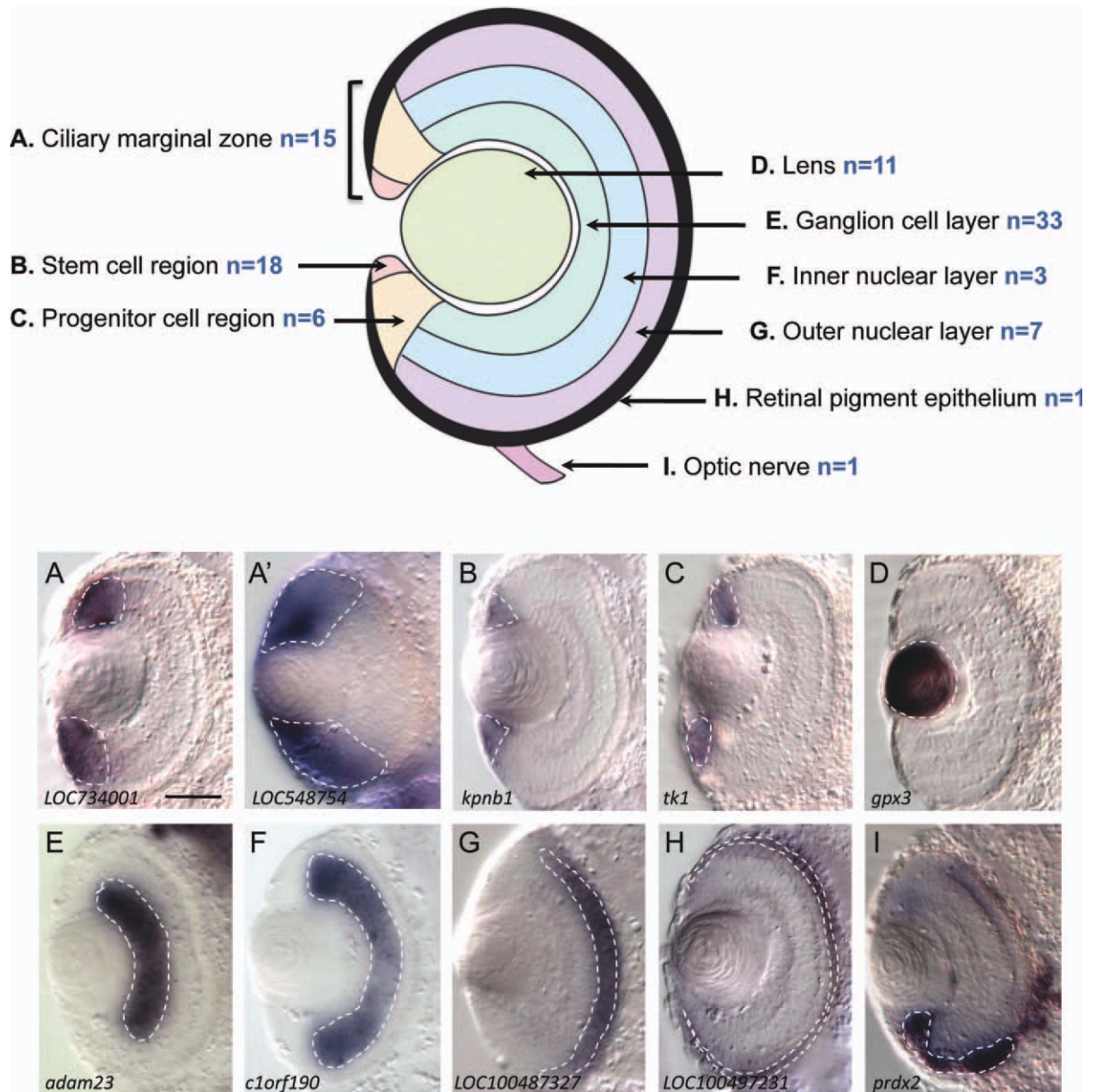


Figure 2 Classification of specific retinal markers retrieved from the screen. Schematic diagram illustrates the chosen subdivisions of the tadpole retina. *n* indicates the number of markers retrieved from the screen that exhibit specific expression in only one of these compartments. Pictures below are stage 39 transverse retinal sections (dorsal up) that provide typical examples of such markers, with a correspondence to the schematic lettering (A–I). A fuzzy staining in the CMZ that invades the nuclear layers (A') is not considered CMZ-specific. White dotted lines delineate the staining. Gene symbol is indicated under each panel. Scale bar = 50 μ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

2007). Our finding that protein phosphatase slingshot homolog 2-like labels ganglion cells thus makes it a potential candidate as a player in ganglion cell axon growth. The tubby-like proteins (TULPs) are expressed in various cell types of the murine retina (Ikeda et al., 2003). Among them, both *tub* and *Tulp1* genes have been implicated in retinitis pig-

mentosa or Leber congenital amaurosis, two retinal degenerative diseases (Ikeda et al., 2003; Xi et al., 2006). Whilst *Tulp1* is specifically expressed in photoreceptors, *tub* seems to have a broader expression pattern in the adult mouse retina (Ikeda et al., 2003), but has not been described so far during retinal development. Interestingly, we found here that *tub* is

Table 1 List of the 18 Retinal Stem Cell Markers Retrieved from the Screen

	Clone id	Gene Sequence Ref	Gene Symbol	Gene Description
A	RY0BAD1DH05	XM_002943439.1	<i>alpl</i>	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
B	RY0BAD1AB03	NM_001005661.1	<i>sulf2</i>	sulfatase 2
C	RY0BAD2BB02	XM_002939535.1	<i>spry4</i>	sprouty homolog 4-like
D	RY0BAD1BG08	XM_002932809.1	<i>gxytl1</i>	glucoside xylosyltransferase 1 transcript variant 2
E	RY0BAD1BH11	NM_001008078.2	<i>mgrn1</i>	mahogunin, ring finger 1
F	EC2CAA19CH04	NM_203539.1	<i>hes4</i>	hairy and enhancer of split 4
G	EC2CAA2AA11	NM_203967.1	<i>nop58</i>	NOP58 ribonucleoprotein homolog
H	RY0BAD1AH11	XR_098072.1	<i>LOC100127707</i>	partial miscRNA
I	EC2CAA2AH01	NM_203689.1	<i>randp1</i>	RAN binding protein 1
J	RY0BAD2CF11	XM_002940151.1	<i>kpnb1</i>	karyopherin (importin) beta 1
K	EC2CAA2AG04	NM_001016570.2	<i>aurka</i>	aurora kinase A
L	RY0BAD2CE12	NM_203859.1	<i>ncapg</i>	non-SMC condensin I complex, subunit G
M	RY0BND2CE04	NM_001045766.1	<i>zmcm3</i>	zygotic DNA replication licensing factor mcm3
N	RY0BAD2AG02	NM_001008082.1	<i>mcmmbp</i>	minichromosome maintenance complex binding protein
O	EC2CAA2AD03	NM_001079190	<i>ssbp1</i>	single-stranded DNA binding protein 1
P	RY0BAD2CE03	NM_001126979.1	<i>trmt2a</i>	TRM2 tRNA methyltransferase 2 homolog A
Q	RY0BAD2DA01	NM_001102684.1	<i>dnajc27</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 27
R	RY0BAD1BA07	XM_002931571.1	<i>fndc3b</i>	Fibronectin type III domain-containing protein 3B-like

specifically expressed in the ganglion cell layer of the *Xenopus* tadpole (see Fig. 7). Whether this is different from the situation in murines remains to be investigated.

Among seven specific markers of the outer nuclear layer, we found a *Xenopus* homologue of creatine kinase, an important enzyme of vertebrate metabolism, known to be present in chick and bovine photoreceptor cells (Wallimann et al., 1986; Hemmer et al., 1993). Creatine kinase may play an important role in photo-transduction by providing energy for the visual cycle (Hemmer et al., 1993). As it is exclusively expressed in photoreceptors and not in any other retinal neurons, it can thus be considered as a novel specific marker of this cell type. *Xenopus calbindin 1* gene, which encodes a calcium binding protein, is also specifically expressed in photoreceptors, confirming previous immunohistochemistry data (Chang and Harris, 1998 and our unpublished data). This contrasts strikingly with its behavior in mammals, where it is used as a horizontal cell marker (Peichl and Gonzalez-Soriano, 1993). Such a non-conserved expression profile between vertebrates is rare, but should be kept in mind whenever genes from our screen are selected for use as retinal cell type markers in other organisms.

We also isolated many genes displaying various bimodal expression patterns: in two different nuclear layers for instance, or in both a nuclear layer and the CMZ (Supporting Information Fig. 1). In addition, some probes were found to label the inner and/or outer plexiform layers, suggesting an unusual cellular sub-localization of the RNA in the

dendrites or the axons of retinal neurons (data not shown).

Whole CMZ and Progenitor Markers Retrieved from the Screen

Regarding genes expressed in the whole CMZ, our results showed that the staining could be ranked in two categories: sharp or fuzzy. We assume that the former is true CMZ specific expression, with clear staining and sharp boundaries [Fig. 2(A)], whilst the latter suggests a gradient of expression that goes beyond the CMZ towards the central retina [Fig. 2(A')]. In the fuzzy cases, we also noted that the staining tends to extend into the epidermis surrounding the retina. Such an expression pattern may thus reflect ubiquitous rather than CMZ-specific expression. In line with this idea, such a profile was frequently seen with probes against genes encoding ribosomal proteins (data not shown), which we presume to be ubiquitously expressed. For this reason, we thus scored as CMZ markers only genes exhibiting sharp expression boundaries (15 genes; Fig. 2).

Many genes previously described in the literature as being involved in retinal cell fate decision display a restricted expression pattern in the central CMZ, where progenitor cells reside. Notably, most of these encode transcription factors (reviewed in Henningfeld et al., 2007). Interestingly, the six genes that we retrieved in the present screen as being exclusively expressed in the central CMZ are not transcription factors and represent potential candidates for involve-

ment in retinal cell proliferation/determination. In particular, some of these markers, such as *cd82*, may be key regulators of the signaling pathways at work in progenitor cells. *cd82* encodes a tetraspanin membrane protein that can function as a suppressor of tumor metastasis (Tonoli and Barrett, 2005). It has recently been shown to suppress canonical Wnt signaling activity *in vitro* and to induce a significant decrease in β -catenin protein levels (Chairoungdua et al., 2010). The *cd82* gene was also shown to be upregulated after retinal injury in rat (Vazquez-Chona et al., 2004), but its role in this context and during retinal development has not been investigated yet.

Identification of Specific Retinal Stem Cell Markers

Our main objective in this work was to uncover novel specific markers of retinal stem cells. Several lines of evidence locate these cells at the tip of the CMZ (Wetts et al., 1989; Perron et al., 1998). Beside their multipotency, which was determined over 25 years ago (Wetts et al., 1989), two other stemness features of these peripheral cells were recently demonstrated: slow dividing properties and self-renewal abilities (Xue and Harris, 2012). Some genes were previously reported as being expressed in these cells but not exclusively. This is the case of *pax6*, *rax* (*Rx*), or *six6* (*Opx2*), which all label the whole CMZ and some differentiated neurons (Perron et al., 1998). Genes displaying an expression pattern tightly restricted to the tip of the CMZ, such as *gli3* (Perron et al., 2003), have rarely been described so far. Here we found 18 genes for which expression was restricted to the peripheral CMZ region and excluded from its central part [Fig. 3(A–R) and Table 1]. We therefore categorized them as retinal stem cell markers. Retrieval of the tissue non-specific alkaline phosphatase gene [Fig. 3(A)], a marker of embryonic stem cells, constitutes a good proof of principle for our screening strategy. This is also consistent with the recent finding that this enzyme is enriched in neural precursor cells of the adult mouse brain and important for neural stem cell proliferation and differentiation *in vitro* (Kermer et al., 2010). Moreover, four of our retinal stem cell markers, *nop58*, *kpn1*, *aurka* and *zmcm3*, belong to the previously established protein-protein network PluriNet, a network associated with stem cell pluripotency (Müller et al., 2008).

Notably, although expression domains of the 18 genes encompassed the stem cell containing region, their expansion differed significantly from one to another. This was quantified by measuring the extent of each staining relative to the total CMZ area. We found values ranging from less than 25% to approxi-

mately 50% of the CMZ [Fig. 3(S)]. Based on the previously described subdivisions of the *Xenopus* CMZ (Perron et al., 1998; Ohnuma et al., 2002), it is thus likely that genes displaying the largest expression domains are expressed in both stem cells and young progenitors. In addition, we cannot exclude the possibility that the retrieved markers label distinct retinal stem cell subpopulations. Accumulating evidences point to a great heterogeneity of adult neural stem cells in the brain (Alvarez-Buylla et al., 2008), and whether this holds true in the CMZ remains to be investigated.

Beyond their common expression in the stem cell zone of the CMZ, we also noted that the identified markers labeled lens epithelial cells as well (Fig. 3). In addition, most of candidates displayed a strikingly similar expression profile in whole embryos, strongly suggesting that they represent members of the same synexpression group (Fig. 4). All of them, except *sulfatase 2* [Fig. 4(B)], labeled the branchial arches. This may however reflect some background expression given the known tendency of this region to pick up unspecific staining. More interestingly, in addition to the eye, the brain was systematically stained, suggesting that the retrieved genes may be general neural stem cell markers. Importantly, most of them are mainly expressed in a stripe at the midbrain–hindbrain boundary (MHB). The MHB contains the isthmus organizer, a critical signaling center that controls both patterning and growth of this region of the brain. In particular, a group of *Hes* factors, including *Her9*, which is closely related to *Hes4*, one of our retinal stem cell specific candidates [Fig. 4(F) and see below], have been shown in zebrafish to have crucial functions in the maintenance of the progenitor pool in this zone (Geling et al., 2003; Ninkovic et al., 2008; Stigloher et al., 2008). It is therefore tempting to speculate that some of the novel markers identified in the screen and expressed in this region might also participate in this process. Finally, a staining was also often detected in the tailbud. The tip of the young tadpole tail contains distinct proliferative cell populations consisting of undifferentiated mesodermal and ectodermal cells, which allow for continuous growth of the tail during the larval stages, but will eventually differentiate into neural tube, notochord, and segmented somites (Gont et al., 1993). The tailbud has the striking ability to regenerate the original tail when isolated in culture (Deuchar, 1975). It should therefore not be surprising to find neural stem cell markers in this region.

Gene Ontology Analysis of Retinal Stem Cell Markers Retrieved from the Screen

GO classification of our markers revealed a variety of associated cellular components, biological processes,

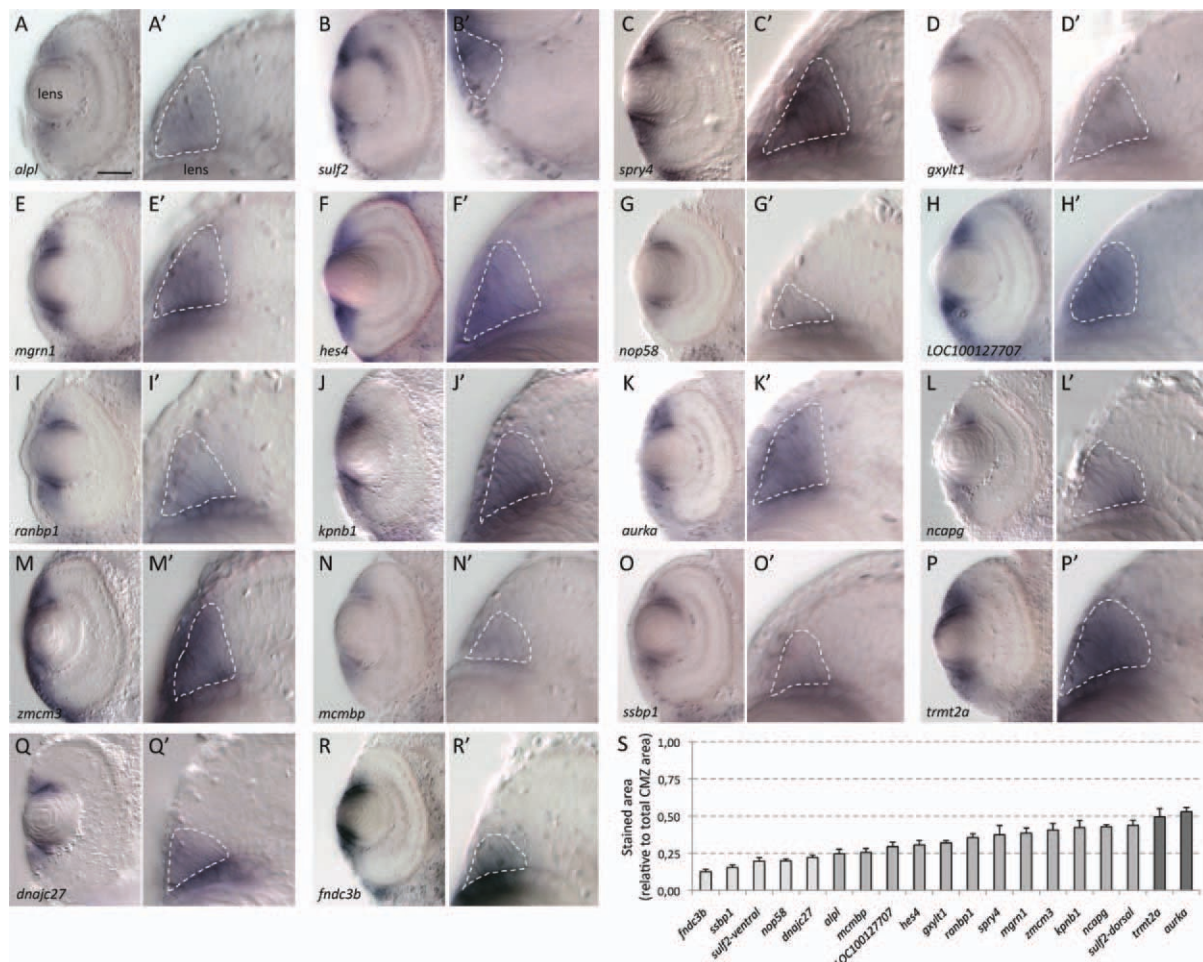


Figure 3 Novel retinal stem cell markers retrieved from the screen. A–R: Stage 39 retinal sections showing the specific expression in retinal stem cells of the 18 clones isolated from the screen (gene symbol is indicated on each panel). A'–R': Magnification of the corresponding dorsal CMZ (except for *sulf2* in (B–B') for which the ventral CMZ is shown). White dotted lines delineate the staining. S: Quantification of the staining extent in the dorsal CMZ. Values represent the stained surface relative to total CMZ area and are given as mean $\pm$ SEM (n = at least 6 retinal sections per clone). Note that although all clones are expressed in the stem cell containing region of the CMZ, staining expansion differs from one to another (light grey: less than 25% of the CMZ area; medium grey: between 25 and 45%; dark grey: more than 45%). In addition, major dorso-ventral variability is observed for *sulf2*, which was thus quantified in both the dorsal and ventral CMZ as indicated. Scale bar = 50 μ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

and molecular functions (Fig. 5). Four potential regulators of signal transduction whose role in the retina has not been addressed yet were found [Fig. 3(B–E)]. These include sulfatase 2 [*sulf2*; Fig. 3(B)], a member of the heparin-degrading endosulfatases, and sprouty homolog 4-like [*spry4*; Fig. 3(C)], which belongs to the sprouty family of receptor tyrosine kinase inhibitors. Both are known to exert an inhibitory effect on the fibroblast growth factor signaling pathway (Mason et al., 2004; Rosen and Lemjabbar-Alaoui, 2010). Intriguingly, *sulf2* expression displays a clear dorso-ventral asymmetry, being restricted ventrally to the

stem cell zone, while exhibiting a more diffuse dorsal expression, spreading into the ganglion cell layer [Fig. 3(B,S)]. The third potential regulator of signal transduction encodes the glucoside xylosyltransferase 1 [*gxy1t1*; Fig. 3(D)], a member of the glycosyltransferase 8 family. Interestingly, this enzyme was recently reported to participate in extensive glycosylation of the Notch receptor (Sethi et al., 2010). Although the functional impact of such modifications is far from being understood, glycosylations catalyzed by the enzymes Fringe and Rumi have been shown to play key roles in Notch signaling modulation (Haines and

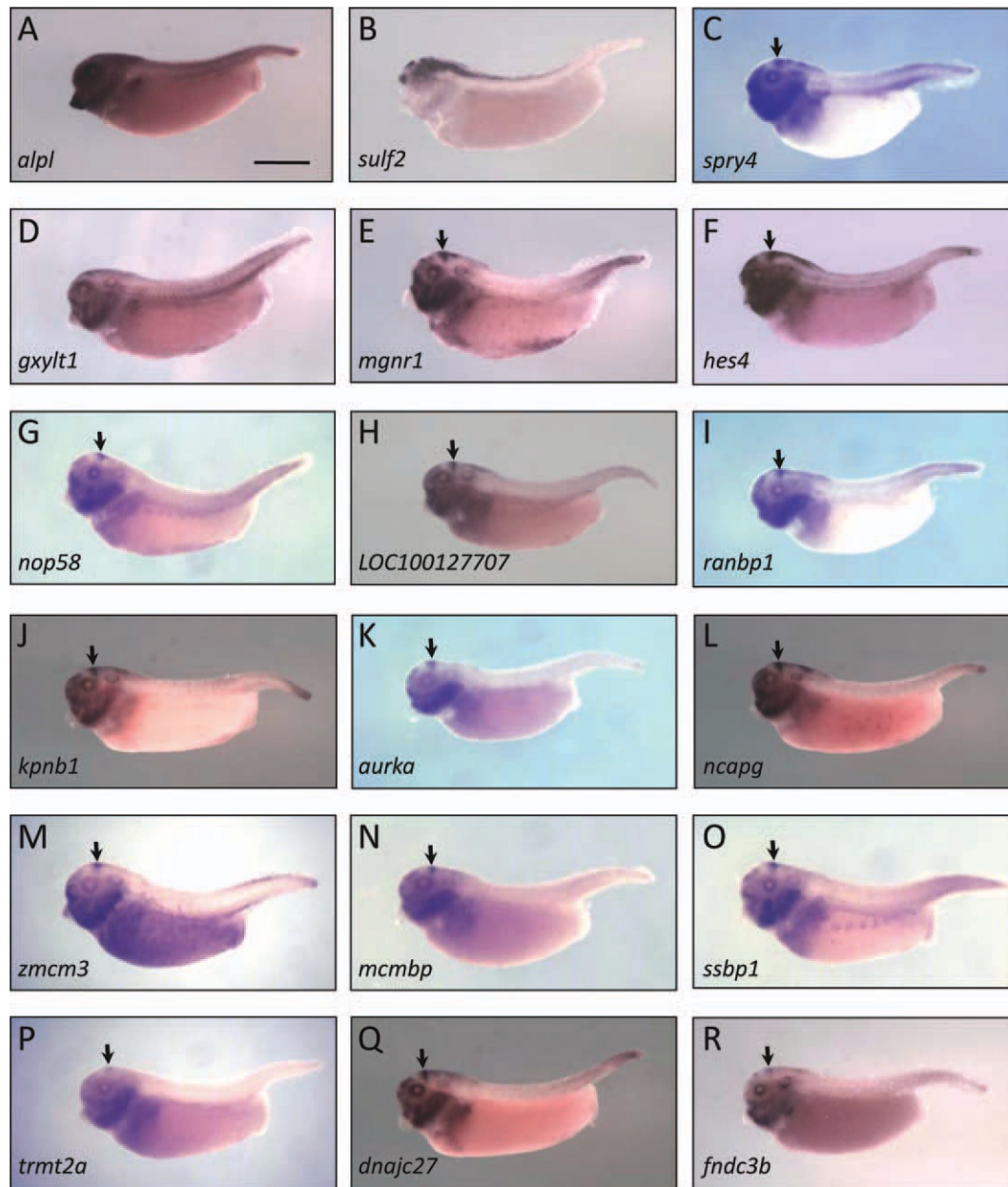


Figure 4 Expression of novel retinal stem cell markers in whole tadpoles. Whole mount expression patterns on stage 39 tadpoles of the 18 retinal stem cell markers. Most clones exhibit a strikingly similar expression profile, strongly suggesting that they form a synexpression group. In particular, in addition to the eye, selected clones label the midbrain–hindbrain boundary (arrows). The tip of the tail is also stained in most of these pictures. Gene symbol is indicated on each panel. Scale bar = 500 μ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

Irvine, 2003; Acar et al., 2008; Fernandez-Valdivia et al., 2011). Relationships of *gxylt1* with Notch signaling may thus be an interesting lead to follow to uncover its involvement in retinal stem cells. Finally, we also isolated *mahogunin ring finger-1* [*mgrn1*; Fig. 3(E)], which encodes a C3HC4 RING domain-containing protein with ubiquitin ligase activity (He et al., 2003). *mgrn1*-

null mutant mice have a pleiotropic phenotype but defects in neural stem cell activity have not been described so far. Of note, this protein has been proposed to be a crucial actor of endosome-to-lysosome trafficking (Kim et al., 2007) and might as such be involved in the regulation of the potency and duration of intracellular signaling within the retinal stem cell niche.

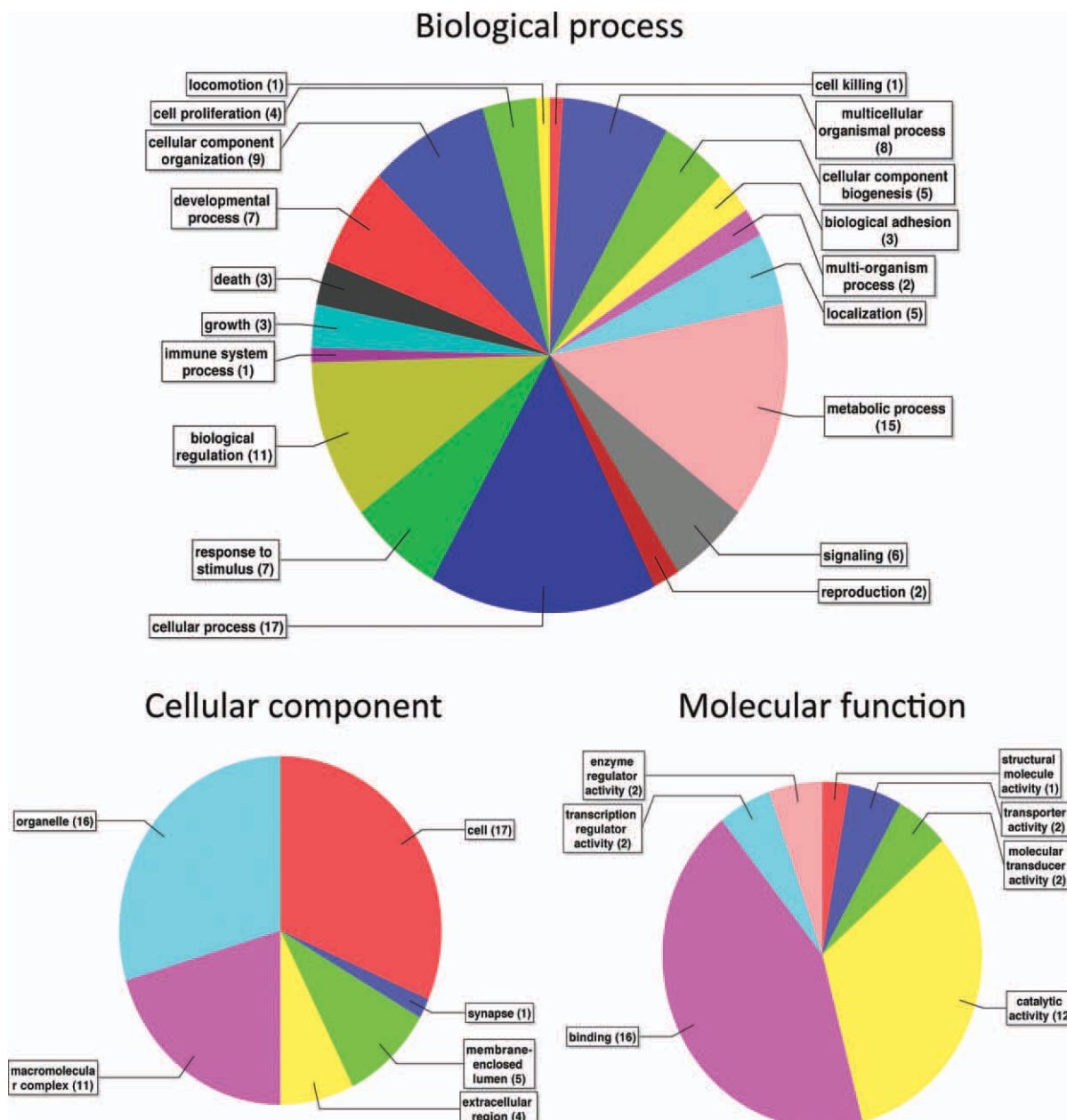


Figure 5 Combined graph of GO annotation for the 18 retinal stem cell markers retrieved from the screen. These pie charts depict the results of a GO annotation made on the 18 retinal stem cell markers using the biological process, the molecular function or the cellular component thesaurus. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

Three factors potentially involved in gene expression regulation were isolated [Fig. 3(F–H)]. Among them is the transcriptional repressor *hes4* [Fig. 3(F)], which we previously and independently identified as being specifically expressed in the stem cell containing region of the *Xenopus* retina. A great number of studies show Hes family members to act as essential regulators of neural stem cell activity in the brain

Developmental Neurobiology

(reviewed in Kageyama et al., 2008). In line with this, *hes4* seems to play a crucial role in retinal stem cells by keeping them in a proliferative and undifferentiated state during retinogenesis (our unpublished data). The two other identified factors in this gene expression category are potential post-transcriptional regulators: an RNA binding protein, the snoRNP-associated protein NOP58 [Fig. 3(G)], and a hypo-

thetical non-coding RNA [misc RNA, Fig. 3(H)]. The function of these genes in neural stem cells remain to be investigated.

We also pulled out four molecules known to be involved in diverse processes associated with cell cycle [Fig. 3(I–L)]. Surprisingly, three of them, namely RAN binding protein 1 [ranbp1; Fig. 3(I)], karyopherin (importin) β 1 [kpnb1; Fig. 3(J)], and the mitotic regulator aurora kinase A [aurka; Fig. 3(K)] are direct or indirect effectors of the Ran GTPase (Avis and Clarke, 1996; Ciciarello et al., 2004; Ding et al., 2011). The Ran network is known to act in nucleocytoplasmic transport and during mitosis to regulate spindle assembly and cell cycle progression (reviewed in Clarke and Zhang, 2008). In addition, Ran has also been involved in asymmetric division of the vertebrate oocyte by controlling spindle organization and positioning (Deng et al., 2007; reviewed in Verlhac and Dumont, 2008). This is of particular interest in the field of neural stem cells, as recent studies have unveiled the key contribution of spindle orientation in stem cell self-renewing asymmetric division (Lesage et al., 2010). Whether the Ran network may serve such a function in retinal stem cells is however unknown. The fourth factor belonging to the cell cycle GO group is the non-SMC condensin I complex, subunit G [ncapg; Fig. 3(L)]. ncapg, which regulates chromosome condensation and segregation during mitosis, has previously been described as specifically expressed in the zebrafish CMZ (Seipold et al., 2009). Interestingly, its loss of function was reported to cause increased rates of apoptosis among CMZ cells, probably due to chromosomal non-disjunction and consequent tetraploidization (Seipold et al., 2009).

Belonging to the GO group of nucleic acid metabolic process, we found two factors associated with the minichromosome maintenance complex (MCM): the zygotic DNA replication licensing factor mcm3 [zmcm3; Fig. 3(M)] and the MCM binding protein [mcmbp; Fig. 3(N)]. Interestingly, a mutation in MCM3 results in reduced CMZ in the fish retina (Gross et al., 2005). MCM is a group of highly conserved proteins essential for the initiation of DNA replication. In addition, it has also been implicated in the maintenance of genomic integrity as a platform for multiple DNA damage-dependent regulatory signals (Forsburg, 2004). Our finding that two factors associated with the MCM are strongly expressed in the retinal stem cell compartment is particularly interesting considering that stem cells must employ particular mechanisms to prevent the propagation of mutations (Tichy, 2011). In line with this, we identified in the same GO group the single-stranded DNA binding protein 1 [ssbpl; Fig. 3(O)] and TRM2 tRNA methyltransferase 2 homolog A [trmt2a; Fig.

3(P)], which have also been shown to play important roles in DNA damage responses (Choudhury et al., 2007; Richard et al., 2008).

Belonging to the GO group of protein metabolic process, we found DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 27 [dnajc27; Fig. 3(Q)]. Hsp proteins are involved in protein folding and typically associated with stress response. Such an enrichment of *dnajc27* in retinal stem cells is consistent with the discovery that embryonic stem cells exhibit enhanced stress tolerance and high levels of chaperone expression (Prinsloo et al., 2009). Interestingly too, the *mammalian relative of DnaJ (Mrj)* appears to be required for neural stem cell self-renewal (Watson et al., 2009).

Finally, a last promising marker discovered from the screen is a molecule potentially involved in cell adhesion within the stem cell niche, the fibronectin type III domain-containing protein 3B-like [fndc3b; Fig. 3(R)].

XenMARK Annotation

To retrieve markers gathered from our screen in a straightforward and powerful way, we took advantage of the existing Web-based annotation tool, XenMARK (<http://genomics.nimr.mrc.ac.uk/apps/XenMARK/>). XenMARK is a database for *Xenopus* gene expression patterns that allows the formulation of queries by specific location or region in the embryo through direct mark-up on schematic diagrams (Gilchrist et al., 2009). We thus designed a novel module in XenMARK, allowing manual annotation on a retinal section diagram depicting the nine compartments described above (Fig. 2). We also annotated all our whole mount pictures in order to associate them with the retinal expression patterns, and to make them available to the whole community. For each clone, three images of whole mount specimens and three of the corresponding retinal sections (when the eye was labeled) were uploaded to the database, making a total of 4672 images: 3243 of whole mount and 1429 of retinal sections. As previously described (Gilchrist et al., 2009), one image per clone tested was chosen for annotation, whilst the others were marked as duplicates. The annotator could choose to describe each expression pattern as ubiquitous, no expression, indistinct, or to manually annotate it on the corresponding diagram. Figure 6 illustrates the annotation procedure on whole embryos or on retinal sections. Among the whole mount *in situ* hybridization pictures, 292 were classified as ubiquitous, 180 as no expression, 117 as indistinct, 2130 as duplicates, and 524 were annotated with specific expression patterns. Among the retinal section pictures, 6 were classified

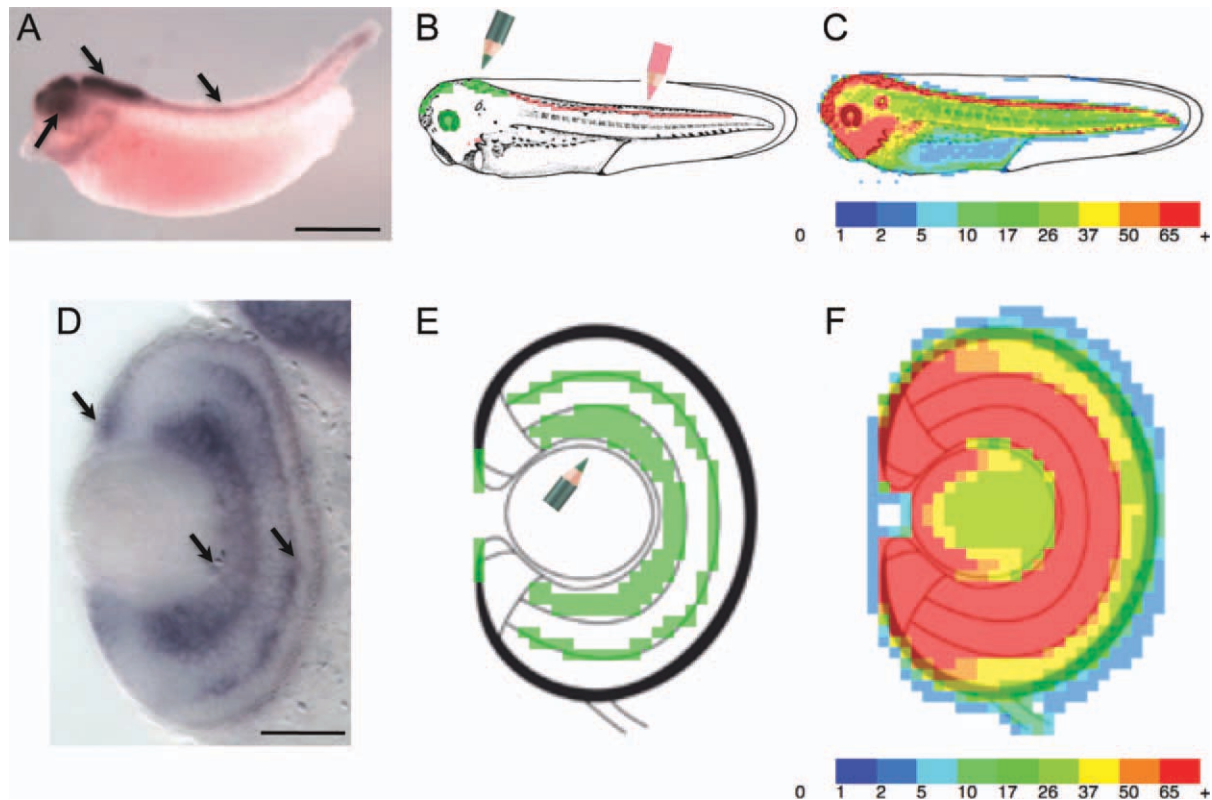


Figure 6 XenMARK annotation of *in situ* hybridization patterns from both whole tadpoles and retinal sections. Illustration of the annotation process of whole mount (A,B) or retinal (D,E) expression patterns using the XenMARK bioinformatic tool. The procedure consists in manually transferring the expression profiles observed on original images to schematic diagrams, by direct mark-up of selected zones. Intensity of the staining can be distinguished. In (B) for instance, strong expression in the brain and eye is drawn in green, while faint expression in the spinal cord is in red. D,E: Show an example of a complex retinal expression pattern (D), where three sites of expression (arrows) have been drawn to the schematic (green in E). C,F: The full set of annotations is superimposed on heatmap diagrams, revealing the lowest to densest caches of data. Heatmap color scales reflect numbers of annotated images at each pixel. Of note, pixels outside the retina schematic correspond to the corneal epithelium on one hand, and the periocular mesenchyma on the other hand, where a couple of clones were expressed. Scale bar = 500 μm (A) or 50 μm (D). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

as ubiquitous, 12 as no expression, 96 as indistinct, 944 as duplicates, and 371 were annotated.

Fuelling the Database with Known Retinal Markers

To make this novel collection of retinal markers the largest possible, we decided to fuel the XenMARK database with *in situ* image annotations of already known *Xenopus* markers. From the literature, we picked genes for which retinal expression profiles were available on sections of either *Xenopus laevis* or *Xenopus tropicalis* tadpoles. To widen our set of genes, we retained images from embryos ranging

from stage 34 to stage 54. All were annotated on the same retinal section diagram since the general architecture of the retina does not vary much during this period. For two markers, however, two developmental stages were selected because of important qualitative differences in labeling distribution. Although not exhaustive, as many as 202 markers could be added this way, comprising a total of 173 images annotated as having restricted staining. Due to copyright issues, access to most of these images requires the user to go through a PubMed link directed to the manuscript of origin, except for the 54 of them which correspond to our own unpublished retinal images.

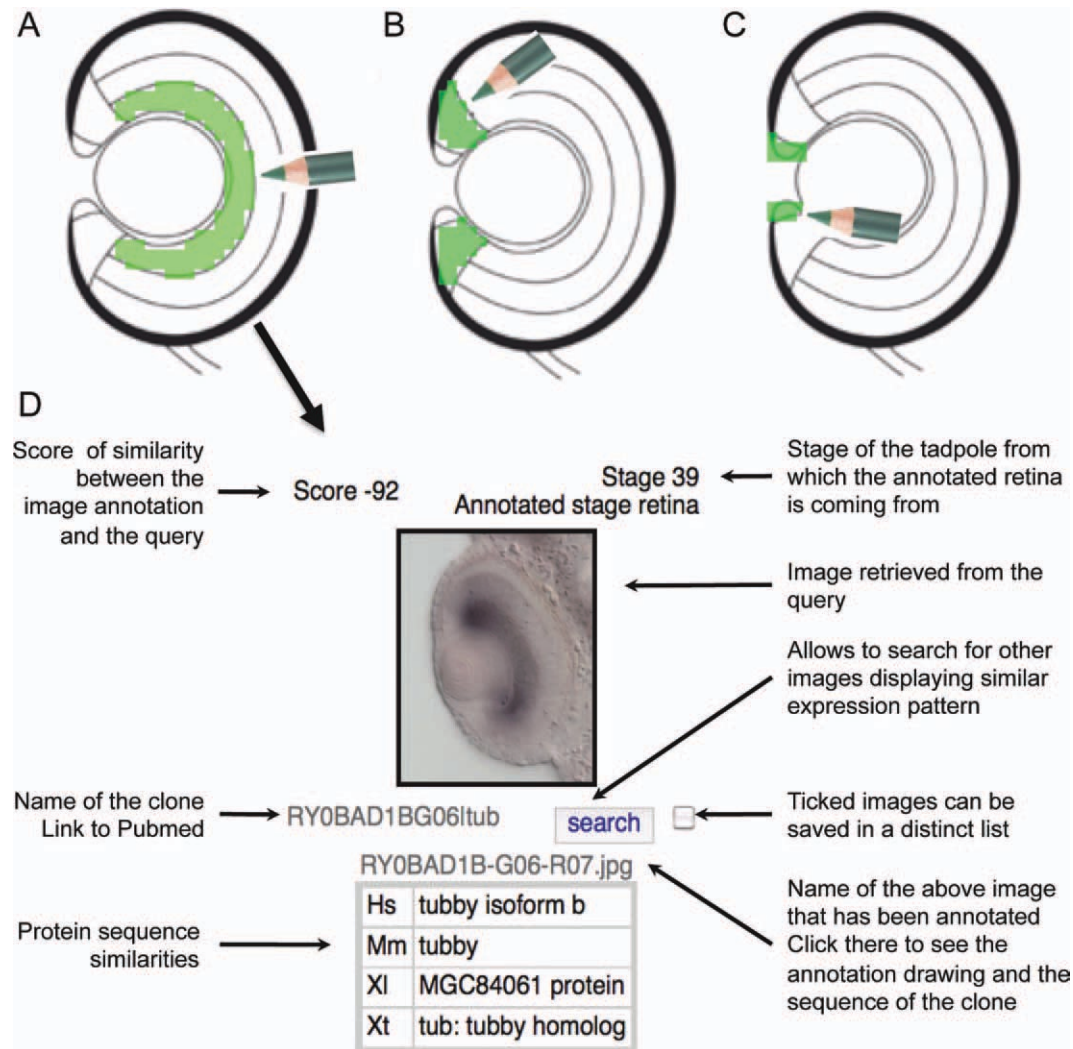


Figure 7 Retrieving retinal markers of interest from the XenMARK database. Using the “Search by expression tool,” one can mark-up the area of interest on the retinal section diagram, such as the ganglion cell layer (A), the progenitor cell region (B), or the stem cell containing area (C). Results of the query are subsequently displayed as a list of images fulfilling the requested expression pattern. D: Illustrates one image retrieved following a query as in (A). The various details provided on the image, the clone name and the corresponding sequence are indicated. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

Retrieval of Retinal Markers from the XenMARK Database

As a whole, we collected and annotated 544 images of expression pattern on retinal sections, gathered from our screen (371) or from the literature (173). To retrieve markers, the “search by expression” tool should be used to mark-up the zone of interest on the schematic of the retina. Figure 7 depicts example queries along with one typical image retrieved from the search. To assess the accuracy of the retrieval tool, we verified that known markers sorted out as expected. For instance, images of many bHLH tran-

scription factors known to be expressed in the central CMZ (such as *ash3*, *ato7*, *ptf1a*, *foxN4*, *neurog2*, *ascl1*, *hey1* (*hrt1*), or *hes2*; reviewed in Henningfeld et al., 2007) showed up following the mark-up of this zone. This validates the use of the database to retrieve specific retinal markers from our screen.

Importantly, when the progenitor cell-containing region was marked-up, and the query limited to the 12 first images, 11 corresponded to those gathered from the literature and only one from our screen. In contrast, when the stem cell zone of the CMZ was selected as query, we obtained the inverse situation: only one

image out of 12 was from the literature, while 11 were from our screen. This clearly highlights the success of our screen in providing a significant advance in our knowledge of retinal stem cell molecular signature.

Beside this immediate benefit, a future challenge will be to keep this collection alive and growing by constantly updating the XenMARK database upon discovery of novel retinal markers by the whole *Xenopus* community. Additionally, we believe that this work represents a useful proof of principle of the versatility of the XenMARK system. Hopefully, this bioinformatic tool will support further developments and will be customized to gather cell type specific markers of other organs using this sectional approach.

Authors are grateful to C. de Meideros for animal care.

REFERENCES

- Acar M, Jafar-Nejad H, Takeuchi H, Rajan A, Ibrani D, Rana NA, Pan H, et al. 2008. Rumi is a CAP10 domain glycosyltransferase that modifies Notch and is required for Notch signaling. *Cell* 132:247–258.
- Ahmad I, Tang L, Pham H. 2000. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun* 270:517–521.
- Alvarez-Buylla A, Kohwi M, Nguyen TM, Merkle FT. 2008. The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73:357–365.
- Avis JM, Clarke PR. 1996. Ran, a GTPase involved in nuclear processes: Its regulators and effectors. *J Cell Sci* 109 (Part 10):2423–2427.
- Bhatia B, Singhal S, Lawrence JM, Khaw PT, Limb GA. 2009. Distribution of Muller stem cells within the neural retina: Evidence for the existence of a ciliary margin-like zone in the adult human eye. *Exp Eye Res* 89:373–382.
- Broadbent J, Read EM. 1999. Wholemount *in situ* hybridization of *Xenopus* and zebrafish embryos. *Methods Mol Biol* 127:57–67.
- Casarosa S, Leone P, Cannata S, Santini F, Pinchera A, Barsacchi G, Andreazzoli M. 2005. Genetic analysis of metamorphic and premetamorphic *Xenopus* ciliary marginal zone. *Dev Dyn* 233:646–651.
- Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, Hull M, Caplan MJ. 2010. Exosome release of β -catenin: A novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J Cell Biol* 190:1079–1091.
- Chang WS, Harris WA. 1998. Sequential genesis and determination of cone and rod photoreceptors in *Xenopus*. *J Neurobiol* 35:227–244.
- Choudhury SA, Asefa B, Kauler P, Chow TY. 2007. Synergistic effect of TRM2/RNC1 and EXO1 in DNA double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem* 304:127–134.
- Cicero SA, Johnson D, Reyntjens S, Frase S, Connell S, Chow LM, Baker SJ, et al. 2009. Cells previously identified as retinal stem cells are pigmented ciliary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:6685–6690.
- Ciciarello M, Mangiacasale R, Thibier C, Guarguaglini G, Marchetti E, Di Fiore B, Lavia P. 2004. Importin β is transported to spindle poles during mitosis and regulates Ran-dependent spindle assembly factors in mammalian cells. *J Cell Sci* 117:6511–6522.
- Clarke PR, Zhang C. 2008. Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:464–477.
- Coles BL, Angenieux B, Inoue T, Del Rio-Tsonis K, Spence JR, McInnes RR, Arsenijevic Y, et al. 2004. Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15772–15777.
- Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Talon M, Robles M. 2005. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21:3674–3676.
- Deng M, Suraneni P, Schultz RM, Li R. 2007. The Ran GTPase mediates chromatin signaling to control cortical polarity during polar body extrusion in mouse oocytes. *Dev Cell* 12:301–308.
- Deuchar EM. 1975. Regeneration of the tail bud in *Xenopus* embryos. *J Exp Zool* 192:381–390.
- Ding J, Swain JE, Smith GD. 2011. Aurora kinase-A regulates microtubule organizing center (MTOC) localization, chromosome dynamics, and histone-H3 phosphorylation in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 78:80–90.
- Endo M, Ohashi K, Mizuno K. 2007. LIM kinase and slingshot are critical for neurite extension. *J Biol Chem* 282:13692–13702.
- Fernandez-Valdivia R, Takeuchi H, Samarghandi A, Lopez M, Leonardi J, Haltiwanger RS, Jafar-Nejad H. 2011. Regulation of mammalian Notch signaling and embryonic development by the protein *O*-glucosyltransferase Rumi. *Development* 138:1925–1934.
- Fierro AC, Thuret R, Coen L, Perron M, Demeneix BA, Wegnez M, Gyapay G, et al. 2007. Exploring nervous system transcriptomes during embryogenesis and metamorphosis in *Xenopus tropicalis* using EST analysis. *BMC Genomics* 8:118.
- Fischer AJ, Reh TA. 2000. Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev Biol* 220:197–210.
- Forsburg SL. 2004. Eukaryotic MCM proteins: Beyond replication initiation. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:109–131.
- Fujisawa H, Takagi S, Hirata T. 1995. Growth-associated expression of a membrane protein, neuropilin, in *Xenopus* optic nerve fibers. *Dev Neurosci* 17:343–349.
- Geling A, Itoh M, Tallafuss A, Chapouton P, Tannhauser B, Kuwada JY, Chitnis AB, et al. 2003. bHLH transcription factor Her5 links patterning to regional inhibition of neurogenesis at the midbrain-hindbrain boundary. *Development* 130:1591–1604.
- Gilchrist MJ, Christensen MB, Bronchain O, Brunet F, Chesneau A, Fenger U, Geach TJ, et al. 2009. Database

- of queryable gene expression patterns for *Xenopus*. *Dev Dyn* 238:1379–1388.
- Gont LK, Steinbeisser H, Blumberg B, de Robertis EM. 1993. Tail formation as a continuation of gastrulation: The multiple cell populations of the *Xenopus* tailbud derive from the late blastopore lip. *Development* 119:991–1004.
- Gross JM, Perkins BD, Amsterdam A, Egaña A, Darland T, Matsui JI, Sciascia S, et al. 2005. Identification of zebrafish insertional mutants with defects in visual system development and function. *Genetics* 170:245–261.
- Haines N, Irvine KD. 2003. Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:786–797.
- Harland RM. 1991. *In situ* hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol* 36:685–695.
- He L, Eldridge AG, Jackson PK, Gunn TM, Barsh GS. 2003. Accessory proteins for melanocortin signaling: Attractin and mahogunin. *Ann NY Acad Sci* 994:288–298.
- Hemmer W, Riesinger I, Wallimann T, Eppenberger HM, Quest AF. 1993. Brain-type creatine kinase in photoreceptor cell outer segments: Role of a phosphocreatine circuit in outer segment energy metabolism and phototransduction. *J Cell Sci* 106 (Part 2):671–683.
- Henningfeld KA, Locker M, Perron M. 2007. *Xenopus* primary neurogenesis and retinogenesis. *Funct Dev Embryol* 1:26–36.
- Ikeda S, Ikeda A, Naggert JK, Nishina PM. 2003. Towards understanding the function of the tubby gene family in the retina. *Adv Exp Med Biol* 533:309–314.
- Kageyama R, Ohtsuka T, Kobayashi T. 2008. Roles of Hes genes in neural development. *Dev Growth Differ* 50 (Suppl 1):S97–103.
- Keefe JR. 1973. An analysis of urodelian retinal regeneration. I. Studies of the cellular source of retinal regeneration in *Notophthalmus viridescens* utilizing 3 *H*-thymidine and colchicine. *J Exp Zool* 184:185–206.
- Kerner V, Ritter M, Albuquerque B, Leib C, Stanke M, Zimmermann H. 2010. Knockdown of tissue non-specific alkaline phosphatase impairs neural stem cell proliferation and differentiation. *Neurosci Lett* 485:208–211.
- Kim BY, Olzmann JA, Barsh GS, Chin LS, Li L. 2007. Spongiform neurodegeneration-associated E3 ligase Mahogunin ubiquitylates TSG101 and regulates endosomal trafficking. *Mol Biol Cell* 18:1129–1142.
- Kubota R, Hokoc JN, Moshiri A, McGuire C, Reh TA. 2002. A comparative study of neurogenesis in the retinal ciliary marginal zone of homeothermic vertebrates. *Brain Res Dev Brain Res* 134:31–41.
- Lesage B, Gutierrez I, Marti E, Gonzalez C. 2010. Neural stem cells: The need for a proper orientation. *Curr Opin Genet Dev* 20:438–442.
- Locker M, El Yakoubi W, Mazurier N, Dullin JP, Perron M. 2010. A decade of mammalian retinal stem cell research. *Arch Ital Biol* 148:59–72.
- MacNeil A, Pearson RA, MacLaren RE, Smith AJ, Sowden JC, Ali RR. 2007. Comparative analysis of progenitor cells isolated from the iris, pars plana, and ciliary body of the adult porcine eye. *Stem Cells* 25:2430–2438.
- Mason JM, Morrison DJ, Bassit B, Dimri M, Band H, Licht JD, Gross I. 2004. Tyrosine phosphorylation of Sprouty proteins regulates their ability to inhibit growth factor signaling: A dual feedback loop. *Mol Biol Cell* 15:2176–2188.
- Müller FJ, Laurent LC, Kostka D, Ulitsky I, Williams R, Lu C, Park IH, et al. 2008. Regulatory networks define phenotypic classes of human stem cell lines. *Nature* 455:401–405.
- Ninkovic J, Stigloher C, Lillesaar C, Bally-Cuif L. 2008. Gsk3 β /PKA and Gli1 regulate the maintenance of neural progenitors at the midbrain-hindbrain boundary in concert with E(Spl) factor activity. *Development* 135:3137–3148.
- Ohnuma S, Hopper S, Wang KC, Philpott A, Harris WA. 2002. Co-ordinating retinal histogenesis: Early cell cycle exit enhances early cell fate determination in the *Xenopus* retina. *Development* 129:2435–2446.
- Peichl L, Gonzalez-Soriano J. 1993. Unexpected presence of neurofilaments in axon-bearing horizontal cells of the mammalian retina. *J Neurosci* 13:4091–4100.
- Perron M, Boy S, Amato MA, Viczian A, Koebernick K, Pieler T, Harris WA. 2003. A novel function for Hedgehog signalling in retinal pigment epithelium differentiation. *Development* 130:1565–1577.
- Perron M, Kanekar S, Vetter ML, Harris WA. 1998. The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the *Xenopus* eye. *Dev Biol* 199:185–200.
- Pollet N, Muncke N, Verbeek B, Li Y, Fenger U, Delius H, Niehrs C. 2005. An atlas of differential gene expression during early *Xenopus* embryogenesis. *Mech Dev* 122:365–439.
- Pollet N, Niehrs C. 2001. Expression profiling by systematic high-throughput *in situ* hybridization to whole-mount embryos. *Methods Mol Biol* 175:309–321.
- Prinsloo E, Setati MM, Longshaw VM, Blatch GL. 2009. Chaperoning stem cells: A role for heat shock proteins in the modulation of stem cell self-renewal and differentiation? *Bioessays* 31:370–377.
- Richard DJ, Bolderson E, Cubeddu L, Wadsworth RI, Savage K, Sharma GG, Nicolette ML. 2008. Single-stranded DNA-binding protein hSSB1 is critical for genomic stability. *Nature* 453:677–681.
- Rosen SD, Lemjabbar-Alaoui H. 2010. Sulf-2: An extracellular modulator of cell signaling and a cancer target candidate. *Expert Opin Ther Targets* 14:935–949.
- Seipold S, Priller FC, Goldsmith P, Harris WA, Baier H, Abdelilah-Seyfried S. 2009. Non-SMC condensin I complex proteins control chromosome segregation and survival of proliferating cells in the zebrafish neural retina. *BMC Dev Biol* 9:40.
- Sethi MK, Buettner FF, Krylov VB, Takeuchi H, Nifantiev NE, Haltiwanger RS, Gerardy-Schahn R, et al. 2010. Identification of glycosyltransferase 8 family members as xylosyltransferases acting on O-glucosylated notch epidermal growth factor repeats. *J Biol Chem* 285:1582–1586.
- Stigloher C, Chapouton P, Adolf B, Bally-Cuif L. 2008. Identification of neural progenitor pools by E(Spl) factors in the embryonic and adult brain. *Brain Res Bull* 75:266–273.

- Tichy ED. 2011. Mechanisms maintaining genomic integrity in embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Exp Biol Med* (Maywood) 236:987–996.
- Tonoli H, Barrett JC. 2005. CD82 metastasis suppressor gene: A potential target for new therapeutics? *Trends Mol Med* 11:563–570.
- Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, van der Kooy D. 2000. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 287:2032–2036.
- Vazquez-Chona F, Song BK, Geisert EE Jr. 2004. Temporal changes in gene expression after injury in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:2737–2746.
- Verlhac MH, Dumont J. 2008. Interactions between chromosomes, microfilaments and microtubules revealed by the study of small GTPases in a big cell, the vertebrate oocyte. *Mol Cell Endocrinol* 282:12–17.
- Wallimann T, Wegmann G, Moser H, Huber R, Eppenberger HM. 1986. High content of creatine kinase in chicken retina: Compartmentalized localization of creatine kinase isoenzymes in photoreceptor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:3816–3819.
- Watson ED, Mattar P, Schuurmans C, Cross JC. 2009. Neural stem cell self-renewal requires the Mrj co-chaperone. *Dev Dyn* 238:2564–2574.
- Wen Z, Han L, Bamburg JR, Shim S, Ming GL, Zheng JQ. 2007. BMP gradients steer nerve growth cones by a balancing act of LIM kinase and Slingshot phosphatase on ADF/cofilin. *J Cell Biol* 178:107–119.
- Wetts R, Serbedzija GN, Fraser SE. 1989. Cell lineage analysis reveals multipotent precursors in the ciliary margin of the frog retina. *Dev Biol* 136:254–263.
- Xi Q, Pauer GJ, Traboulsi EI, Hagstrom SA. 2006. Mutation screen of the TUB gene in patients with retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis. *Exp Eye Res* 83:569–573.
- Xue XY, Harris WA. 2012. Using *myc* genes to search for stem cells in the ciliary margin of the *Xenopus* retina. *Dev Neurobiol* 72:475–490.
- Yoshii C, Ueda Y, Okamoto M, Araki M. 2007. Neural retinal regeneration in the anuran amphibian *Xenopus laevis* post-metamorphosis: transdifferentiation of retinal pigmented epithelium regenerates the neural retina. *Dev Biol* 303:45–56.

3.2. Analyses fonctionnelles de nouveaux marqueurs des cellules progénitrices rétiniennes

Dans la continuité de mes travaux sur le facteur de transcription *Ascl1*, j'ai recherché parmi les gènes identifiés dans le crible ceux présentant un patron d'expression spécifique des cellules progénitrices et pouvant potentiellement être impliqués dans la spécification des types ou sous-types rétiniens. J'ai également recherché dans la littérature d'autres gènes candidats possibles.

3.2.1. Les marqueurs des cellules progénitrices issus du crible à grande échelle

A l'issue du crible, nous avons identifié six gènes spécifiquement exprimés dans la région des cellules progénitrices excluant la zone des cellules souches de la ZMC : *Thymidine Kinase 1*; *CD82*; *PIN2/TERF1 interacting, telomerase inhibitor 1* ; *Regulator of G-protein signaling 12* ; *Protein FAM123B-like* ; *Arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein-like* (**Figure 53**).

▪ Expressions des six marqueurs des cellules progénitrices

Des différences de patrons d'expression sont observées au sein de cette zone (**Figure 53**). Par exemple, *CD82* semblent avoir une expression plus restreinte à la zone des progéniteurs post-mitotiques contrairement à *Regulator of G-protein signaling 12* qui s'exprime dans toute la zone progénitrices. Le gène *Protein FAM123B-like* semble quant à lui plutôt exprimé dans les précurseurs des cellules ganglionnaires.

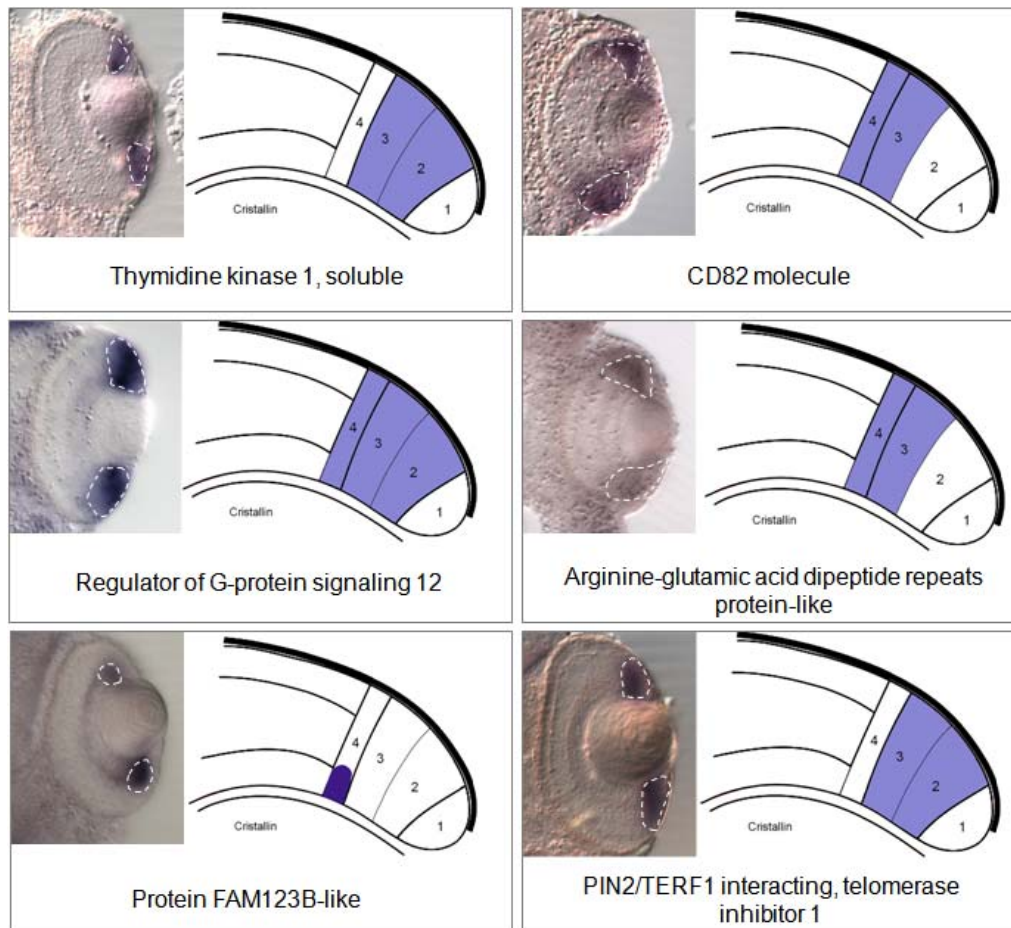


Figure 53 : Identification de 6 nouveaux marqueurs des cellules progénitrices de la ZMC. Hybridation *in situ* réalisée sur les embryons entiers au stade 39. Ceux-ci ont ensuite été sectionnés au niveau de la rétine afin de regarder plus finement leurs patrons d'expression. Les rétines sont orientées côté dorsal vers le haut. Le patron d'expression de ces gènes, entouré par un cercle pointillé, se restreint à la région centrale de la ZMC qui contient les cellules progénitrices, excluant la zone des cellules souches rétinienne. Pour chacun d'eux, un schéma sur la droite récapitule leur patron d'expression. 1, zone des cellules souches ; 2/3, zones des progéniteurs en prolifération et 4, zone des progéniteurs post-mitotiques.

▪ « Gene ontology » des six marqueurs des cellules progénitrices

Il est décrit que la majeure partie des gènes identifiés à ce jour comme impliqués dans le choix du destin neuronal sont des facteurs de transcription (revue dans Henningfeld et al., 2007). Il nous a donc paru intéressant de découvrir dans ce crible 6 facteurs dont aucun ne code pour des facteurs de transcription.

Arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein-like (RERE-like) est une protéine de la famille des Atrophin (Wang & Tsai, 2008) qui ont été décrites en tant que co-répresseurs de

récepteurs nucléaires. La perte de la signalisation médiée par les Atrophin provoque de multiples défauts développementaux chez la souris, le poisson zèbre ou la drosophile. De plus une forme altérée de cette protéine est associée à des maladies neurodégénératives. Le rôle de ces protéines dans la rétine n'a pas encore été élucidé.

Le gène *CD82* code pour protéine membranaire tetraspanine pouvant agir comme suppresseur de tumeur métastatique (Tonoli and Barrett, 2005). Il a récemment été montré qu'il entraîne une suppression de l'activité de la voie canonique Wnt *in vitro* en induisant une diminution significative du niveau de β -catenin (Chairoungdua et al., 2010). De plus, *CD82* est régulé positivement après une lésion dans la rétine de rat (Vazquez-Chona et al., 2004). Cependant, son rôle au cours de la rétinogenèse n'a pas été étudié.

Regulator of G-protein signaling 12 (RGS12) est un facteur qui contient des domaines de liaison à Ras et donc pourrait jouer un rôle dans la transduction du signal médié par Ras (Willard et al., 2007). Contrairement à nos observations dans la rétine où RGS12 n'est exprimé que dans des cellules progénitrices, il s'exprime dans les neurones du cerveau chez le rat (López-Aranda et al., 2006). Là encore, son rôle dans les progéniteurs rétiniens est inconnu à ce jour.

La thymidine kinase 1 (TK1) est une enzyme impliquée dans la synthèse de l'ADN donc jouant un rôle dans la régulation du cycle cellulaire. Son niveau d'expression est utilisé pour la détection des cellules tumorales en prolifération (Aufderklamm et al., 2012). Son expression restreinte à une partie des cellules en division de la ZMC est donc plutôt surprenante. Sachant que des composants du cycle cellulaire comme p27 par exemple sont impliqués également dans la spécification des progéniteurs rétiniens, il serait intéressant de déterminer le rôle de TK1 au cours de la rétinogenèse.

IN2/TERF1 interacting, telomerase inhibitor 1 (PINX1) est un gène suppresseur de tumeur (Zhou & Lu, 2001). PinX1 inhibe l'activité télomerase de certaines cellules tumorales et promeut ainsi leur apoptose. PinX1 est lui aussi impliqué dans des processus liés à la division cellulaire, en particulier, il jouerait un rôle dans la ségrégation des chromosomes (Yuan et al., 2009). A nouveau, on peut donc s'étonner de son profil d'expression restreint à une sous population de cellules en division dans la ZMC et il serait intéressant de connaître son rôle dans ces cellules.

La protéine FAM123B (WTX) est également un suppresseur de tumeur. Ce gène est fréquemment muté dans les tumeurs de Wilms (néphroblastomes) (Huff, 2011). Il a récemment été montré que WTX module les activités des signalisations Wnt et p53 (Kim et al., 2012). L'homologue de WTX que nous avons identifié chez le xénope, protéine FAM123B-like, constitue donc un candidat intéressant à étudier dans le contexte de nos travaux sur la voie de signalisation Wnt dans la ZMC.

3.2.2. Une approche gène candidat : le facteur *Dlx2*

Au cours de cette recherche de nouveaux acteurs impliqués dans la régulation du destin neuronal, j'ai également combiné une approche gène candidat. Il est connu que les facteurs de transcription de la famille *Dlx* sont capables de réguler la spécification des neurones dopaminergiques dans le thalamus ventral (Andrews et al., 2003). De plus, leur expression ectopique est suffisante pour induire l'expression d'un marqueur des neurones GABAergiques, l'enzyme GAD (glutamic acid decarboxylase) (Stühmer et al., 2002). Les protéines *Dlx* peuvent également coopérer avec d'autres facteurs pour promouvoir un destin GABAergique dans le cerveau de souris (Heinrich et al., 2011). De plus, il a été démontré que le facteur de transcription *Ascl1* peut réguler l'expression des gènes *Dlx1* et *Dlx2* dans le cerveau antérieur (Poitras et al., 2007). Ces données indiquent que les gènes *Dlx* sont étroitement impliqués dans la spécification des sous-types neuronaux dans le système nerveux.

Concernant le rôle des gènes *Dlx* au cours de la rétino-genèse, il a été montré que des rétines doublement déficientes pour *Dlx1* et *Dlx2* présente une diminution du nombre de cellules ganglionnaires et une augmentation des photorécepteurs (de Melo et al., 2005 et 2008). Cependant, des études plus récentes ont démontré que le gain de fonction par l'utilisation de rétrovirus de *Dlx1* ou *Dlx2* seul mène à une augmentation du nombre de cellules amacrines et bipolaires accompagné d'une diminution des photorécepteurs à bâtonnets. En revanche, l'expression combinée de *Dlx1* ou *Dlx2* avec *Brn-3b* (aussi nommé POU4F2, impliqué dans la genèse des cellules ganglionnaires) conduit à la production de cellules ganglionnaires et une inhibition des cellules amacrines (Feng et al., 2011). De plus, aucune étude n'a mis en évidence un quelconque rôle des gènes *Dlx* dans la spécification des

sous-types dans la rétine, mise à part une qui montre une co-expression de *Dlx2* avec un marqueur des neurones GABAergiques chez la souris (l'enzyme Gad, glutamic acid decarboxylase) (de Melo et al., 2003).

L'ensemble de ces données suggèrent que *Dlx2* est un acteur de la spécification des types rétiniens. Cependant son rôle au cours de la rétino-genèse n'est pas si clair et mérite d'être évalué pour ensuite regarder son implication dans la spécification des sous-types cellulaires de la rétine. C'est pourquoi j'ai choisi de l'étudier en parallèle des candidats issus du crible.

Contrairement à la plupart des gènes précédents, l'expression de *Dlx2* se confine à une sous-population très restreinte de progéniteurs rétiniens de la ZMC (**Figure 54**).

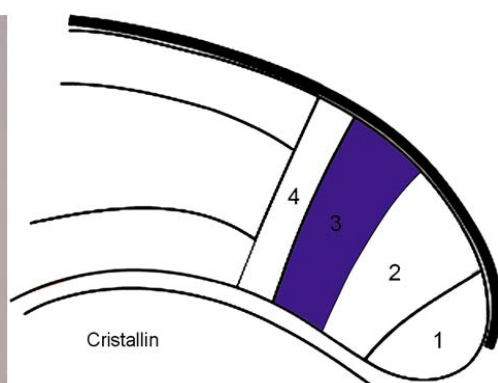


Figure 54 : Le territoire d'expression du gène *Dlx2* est restreint à une petite population de cellules progénitrices de la ZMC. Hybridation *in situ* réalisée sur les embryons entiers au stade 39. Ceux-ci ont ensuite été sectionnés au niveau de la rétine afin de regarder plus finement leurs patrons d'expression.

La rétine est orientée coté dorsal vers le haut. Le patron d'expression de *Dlx2*, entouré par un cercle pointillé, se restreint à la zone 3 de la ZMC. Un schéma de la ZMC sur la droite récapitule son patron d'expression. 1, zone des cellules souches ; 2/3, zones des progéniteurs en prolifération et 4, zone des progéniteurs post-mitotiques.

3.2.3. Etude des gains de fonction des candidats sélectionnés

La caractérisation fonctionnelle des gènes candidats est une étude que j'ai réalisée avec l'aide d'Ujjwal BANERJEE, étudiant indien niveau Licence que j'ai encadré pendant son stage de 2 mois. Les résultats qui seront présentés par la suite ne sont que préliminaires et demandent à être confirmés. Afin de choisir le ou les candidats pour des analyses fonctionnelles plus poussées, la première démarche était de réaliser un petit crible fonctionnel visant à identifier s'ils sont impliqués dans la spécification neuronale au cours de la rétino-genèse. Des expériences de gain de fonction dans la rétine ont donc été menées par

lipofection *in vivo* permettant d'observer leur impact sur la genèse des grandes classes neurales (**Figure 55**).

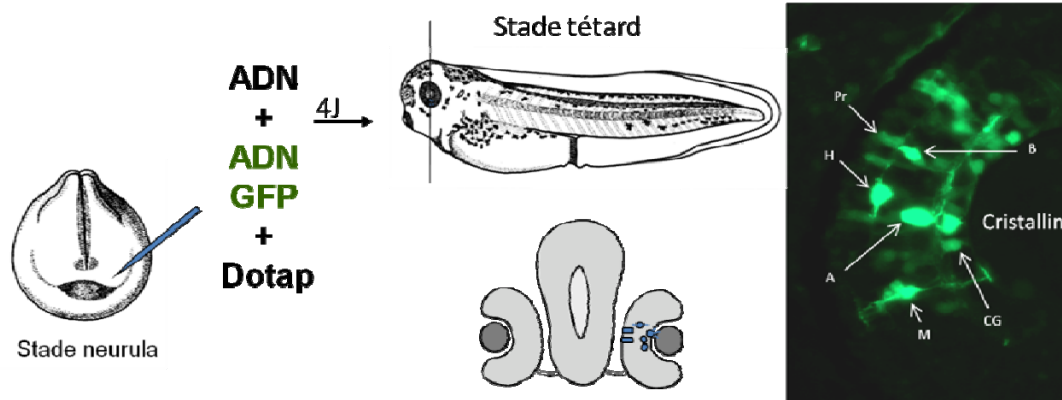


Figure 55 : Principe de la technique de lipofection *in vivo*. La technique de lipofection *in vivo* consiste à injecter l'ADN du gène d'intérêt préalablement cloné dans un vecteur d'expression ainsi qu'un marqueur tel que la GFP (green fluorescent protein), mélangé à une solution lipofectante, le dotap. Le dotap contient des liposomes permettant la transfection de l'ADN dans les cellules. L'injection se fait au stade neurula, au niveau de la région présumptive de la rétine. Grâce à la GFP, il est possible de suivre la descendance des cellules transfectées (coupe transversale de rétine contenant des cellules GFP+ vertes, à droite). Les types cellulaires sont identifiés par leur morphologie et leur position (Pr, photorécepteur ; H, horizontale ; B, bipolaire ; A, amacrine ; CG, cellule ganglionnaire ; M, müller)

La protéine FAM123B étant exprimée au niveau des progéniteurs des cellules ganglionnaires, Arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein-like présentant un patron plutôt diffus et associé à des problèmes de clonages pour PINX1 et RGS12, je n'ai analysé que le gain de fonction que de trois gènes sur les sept : *TK1*, *CD82* et *Dlx2*. Les résultats préliminaires obtenus sont présentés dans la **Figure 56**.

La surexpression de *Dlx2* entraîne une augmentation importante du nombre de cellules ganglionnaires ainsi qu'une diminution significative du nombre de cellules bipolaires et Müller. Ce résultat très intéressant est similaire au gain de fonction des gènes proneuraux tels qu'*Ascl1* ou *Neurog2* dans la rétine (Wang and Harris, 2005), classiquement défini comme effet proneural. En outre, tout comme *Ascl1*, il est possible que ce facteur puisse en plus de son effet proneural agir sur la spécification des sous-types neuronaux au sein d'une classe neuronale particulière. Il serait donc intéressant par la suite d'étudier l'effet de sa surexpression sur les sous-types GABAergiques présents dans la couche des cellules

ganglionnaire dans la rétine et de positionner *Dlx2* dans le réseau transcriptionnel des facteurs proneuraux.

En ce qui concerne l'impact du gain de fonction des gènes *TK1* et *CD82*, les effets obtenus sont minimes. La surexpression de *TK1* entraîne une diminution du nombre de cellules de Müller et une tendance à l'augmentation des cellules ganglionnaires. Bien que cet effet ne soit pas significatif ($P > 0,05$), ce facteur semble aussi avoir un effet plutôt proneural dans la rétine. La surexpression de *CD82* provoque une augmentation (non significative) des cellules amacrines aux dépens des cellules bipolaires (diminution significative).

Des analyses plus poussées des phénotypes (prolifération, détermination des sous-types) et des approches de perte de fonction sont nécessaires à présent pour mieux évaluer les rôles joués par *TK1* et *CD82* dans les progéniteurs rétiniens au cours du développement de la rétine.

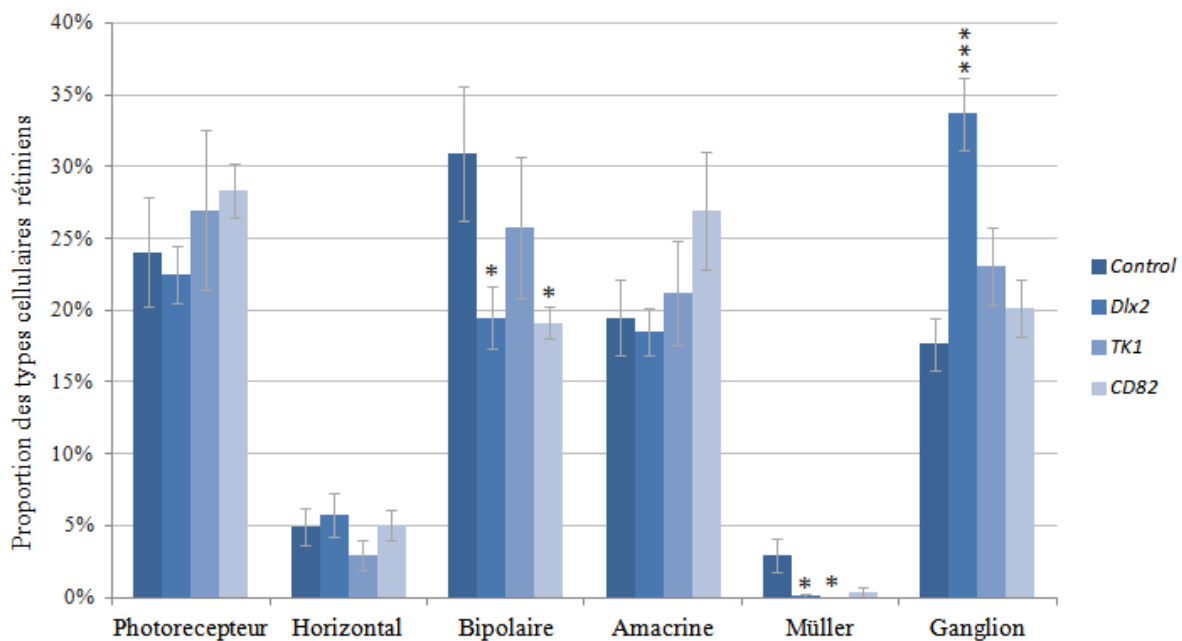


Figure 56 : Un effet proneural classique de la surexpression de *Dlx2*. Analyse de la distribution des types cellulaires de la rétine au stade 41 après lipofection *in vivo* des gènes *Dlx2*, *Tk1* et *CD82* au stade neurula. Valeurs moyennées $\pm$ s.e.m. $P < 0,001$ (***) et $P < 0,05$ (*); t-test. (Contrôle, $n=11$ rétines ; *Dlx2*, $n=15$ rétines ; *TK1*, $n=8$ rétines ; *CD82*, $n=9$ rétines).

III. Discussion et perspectives

1. Rôle du gène *Ascl1* dans le contrôle de la détermination cellulaire dans la rétine

***Ascl1* : facteur proneural où gène de détermination de sous-types rétiniens ?**

La grande majorité des analyses menées sur le facteur de transcription *Ascl1* montre qu'il est requis pour le choix entre un destin neuronal ou glial (Hatakeyama et al., 2001 ; Nelson et al., 2009 ; Tomita et al., 2000 ; Tomita et al., 1996) et participe, avec d'autres gènes proneuraux, à la progression de la vague neurogénique dans la rétine (Hufnagel et al., 2010). Des expériences de lignage chez la souris ont montré que les progéniteurs *Ascl1*⁺ contribuent à la genèse de tous les types cellulaires de la rétine à l'exception des cellules ganglionnaires (Brzezinski et al., 2011). Cependant il a été montré que la surexpression d'*Ascl1* chez le poulet induit une surproduction de cellules amacrines suggérant qu'il pourrait être impliqué dans la détermination de cellules GABAergiques (Mao et al., 2009). En effet, bien que j'ai confirmé que la surexpression d'*Ascl1* dans la rétine du xénope conduit à une modification de la distribution des types cellulaires similaire à d'autres facteurs proneuraux bHLH tels que *Neurog2* ou *Atoh7* (Kanekar et al., 1997 ; Ohnuma et al., 2002 ; Perron et al., 1999 ; Wang and Harris, 2005), son impact sur la genèse des sous-types est différent. *Ascl1* est le seul facteur de ces trois facteurs, en condition de surexpression clonale, à induire une augmentation du nombre de neurones GABAergiques dans la couche des cellules ganglionnaires (amacrines déplacées) de la rétine. Ces résultats suggèrent donc qu'*Ascl1* est capable de favoriser un destin GABAergique parmi les neurones qu'il promeut.

Il faut souligner cependant que l'effet GABAergique obtenu en gain de fonction d'*Ascl1* est très limité (18% d'augmentation parmi les cellules ganglionnaires), en particulier si l'on compare ce phénotype à celui obtenu en gain de fonction de *Ptf1a*. Il serait intéressant de tester si l'on peut amplifier l'effet GABAergique d'*Ascl1* en utilisant une construction constitutivement active (fusion *Ascl1*-VP16 par exemple). Dans le même ordre d'idées, on peut se demander s'il n'y a pas des problèmes de stabilité de la protéine *Ascl1* exogène. En effet, après injection d'ARNm d'*Ascl1*, je n'ai pas réussi à marquer la protéine Flag-*Ascl1* par immunomarquage chez l'embryon après le stade 15 et j'en ai déduit qu'elle devait avoir une

demi-vie très courte. On peut donc penser que si on arrivait à stabiliser la protéine, il est possible que l'effet GABAergique soit plus important.

Afin de savoir si *Ascl1* est lié à la destinée GABAergique, il faudrait identifier la population de progéniteurs dans laquelle il s'exprime. Son expression a déjà été très bien décrite mais les analyses ne reposent que sur la détection de l'ARNm. Sachant l'importance des régulations post-transcriptionnelles dans le contrôle de l'expression des gènes, il me paraît essentiel de préciser quand et quelle population de cellules progénitrices exprime la protéine *Ascl1*. Il faudrait donc faire des anticorps anti-*Ascl1* et détecter la protéine au cours du développement de la rétine. Dans ce contexte de régulation post-transcriptionnelle, il pourrait être aussi intéressant d'étudier les séquences 3'UTR d'*Ascl1* pour repérer d'éventuels sites de liaison de miRNA ou de domaines riches en AU, cibles préférentielles de nombreuses protéines liant l'ARN.

La régulation post-traductionnelle pourrait également être un angle de recherche intéressant pour mieux comprendre comment *Ascl1* fonctionne dans les progéniteurs rétiniens. En effet, il a été montré que l'activité de protéines à bHLH, telle que NeuroD par exemple, pouvaient être régulées par phosphorylation (Moore et al., 2002).

Notre étude d'un gène de la famille *achaete scute* dans la spécification des neurones rétiniens pourrait également être complétée par l'étude d'autres gènes de la même famille. Par exemple, le gène *Ascl3* (aussi nommé *Xash3* chez le xénope), qui est également un facteur de type *achaete scute*, s'exprime dans les progéniteurs rétiniens (Perron et al., 1998) et donne un effet similaire à celui d'*Ascl1* en lipofection *in vivo* dans la rétine (Wang & Harris, 2006). Il serait donc intéressant d'examiner plus en détail son effet sur les sous-types rétiniens.

***Ascl1* fonctionne en combinaisons avec d'autres facteurs bHLH**

L'effet des combinaisons de facteurs au regard des sous-types cellulaires n'a que très peu été étudié jusqu'à maintenant. En 2008, il a été montré *in vitro* que la fonction d'*Ascl1* est dépendante de la présence d'autres facteurs de transcription incluant les bHLH (Powell and Jarman, 2008). Mes expériences d'induction de la neurogenèse *in vivo* dans l'épiderme de xénope montrent que la capacité d'*Ascl1* à induire des neurones catécholaminergiques est

réduite en présence de *Neurog2*, *NeuroD1* ou *Atoh7*. Par contre, non seulement son activité d'induction de neurones GABAergiques n'est pas affectée, mais il est capable d'inhiber la capacité que possèdent ces facteurs à induire des neurones glutamatergiques. De plus, un des effets inattendus que j'ai observé au cours de ces expériences est une augmentation plus importante de neurones GABAergiques lorsqu'*Ascl1* est co-surexprimé avec *Neurog2*, un facteur glutamatergique. Cette donnée surprenante suggère que ces deux facteurs, qui pourtant jouent des rôles opposés (genèse de neurones inhibiteurs *versus* excitateurs), peuvent coopérer pour la spécification des sous-types GABAergiques. Est ce que cette synergie repose sur la formation d'un hétérodimère *Ascl1/Neurog2* ? Afin de savoir si ces deux protéines interagissent *in vivo*, nous pourrions réaliser des expériences de BiFC (Bimolecular fluorescence complementation, **Figure 57**).

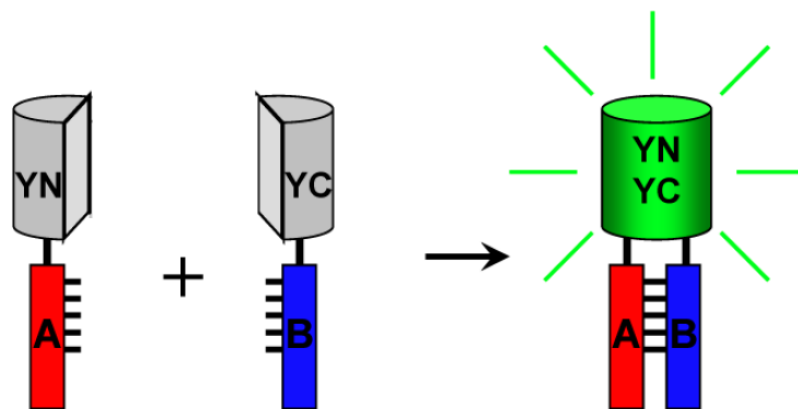


Figure 57 : Représentation schématique du principe du BiFC « Bimolecular fluorescence complementation ». Deux fragments (YN et YC) d'une protéine fluorescente (YFP, yellow fluorescent protein) sont fusionnés à deux facteurs interagissant potentiellement (A et B). Une interaction entre ces deux protéines facilite l'association des fragments YN et YC qui formera un complexe fluorescent (d'après Kerppola, 2006).

L'idée que ces facteurs puissent coopérer dans la rétine était très peu probable au moment où j'ai obtenu ces résultats, étant donné les études montrant qu'ils définissent des populations distinctes de cellules progénitrices (Jasoni and Reh, 1996 ; Jasoni et al., 1994). Cependant, l'année dernière, l'équipe de Tom Reh a mis en évidence qu'ils sont co-exprimés dans une sous-population de progéniteurs rétiniens (Brezinski et al., 2011). J'ai donc cherché à valider cet effet synergique dans la rétine. Mes résultats de co-lipofection *in vivo* confirment que *Neurog2* n'a pas d'effet inhibiteur sur l'activité d'*Ascl1* dans la rétine. L'effet synergique a par contre été plus difficile à valider. En effet, le nombre de neurones GABAergiques dans la

couche des cellules ganglionnaire, en condition de co-lipofection, à tendance à être augmenté par rapport à la lipofection seule d'*Ascl1* mais l'effet n'est pas toujours significatif. La difficulté de mettre en évidence cet effet synergique est certainement dû aux conditions expérimentales qui n'ont pas permises de transfecter un grand nombre de cellules. C'est pourquoi, réitérer ces expériences en essayant d'augmenter l'efficacité de cette technique ou passer par la méthode d'électroporation pourrait permettre d'aboutir à un effet synergique clair. De plus, afin de savoir si *Neurog2* est nécessaire à l'activité GABAergique d'*Ascl1*, il faudrait étudier l'effet de la surexpression d'*Ascl1* en condition de perte de fonction de *Neurog2*. Enfin, des expériences de lignage pourraient aussi permettre d'identifier les sous-populations de progéniteurs *Ascl1*⁺/*Neurog2*⁺ et leur devenir au regard des sous-types cellulaires de la rétine.

Ptfla, cible directe d'Ascl1 dans le réseau transcriptionnel impliqué dans la spécification des neurones GABAergiques

Les expériences que j'ai menées montrent que l'activité GABAergique d'*Ascl1* en condition ectopique requière la présence du facteur de transcription *Ptfla*. J'ai également montré qu'*Ascl1* est capable d'induire l'expression de *Ptfla* de façon directe. Cependant, afin de définitivement confirmer cette donnée, il est nécessaire d'utiliser d'autres techniques permettant de mettre en évidence des interactions directes telle que la technique de ChIP (« chromatin immunoprécipitation »). J'ai, avec l'aide d'Odile Bronchain (Maitre de conférences au laboratoire) commencé une analyse *in silico* pour rechercher des sites de liaison potentiels d'*Ascl1* sur le promoteur de *Ptfla*. Plusieurs motifs consensus ont été identifiés mais ne sont cependant pas clairement conservés du xénope à l'homme.

Que la régulation de *Ptfla* par *Ascl1* soit directe ou non, mes données me permettent de proposer un modèle selon lequel *Ascl1* exerce à la fois un effet proneural, en promouvant des progéniteurs *Ptfla*⁺ et *Ptfla*⁻, et un effet spécifique dans la détermination GABAergique, en activant l'expression de *Ptfla* et donc en biaisant les progéniteurs vers une destinée GABAergique (**Figure 58**).

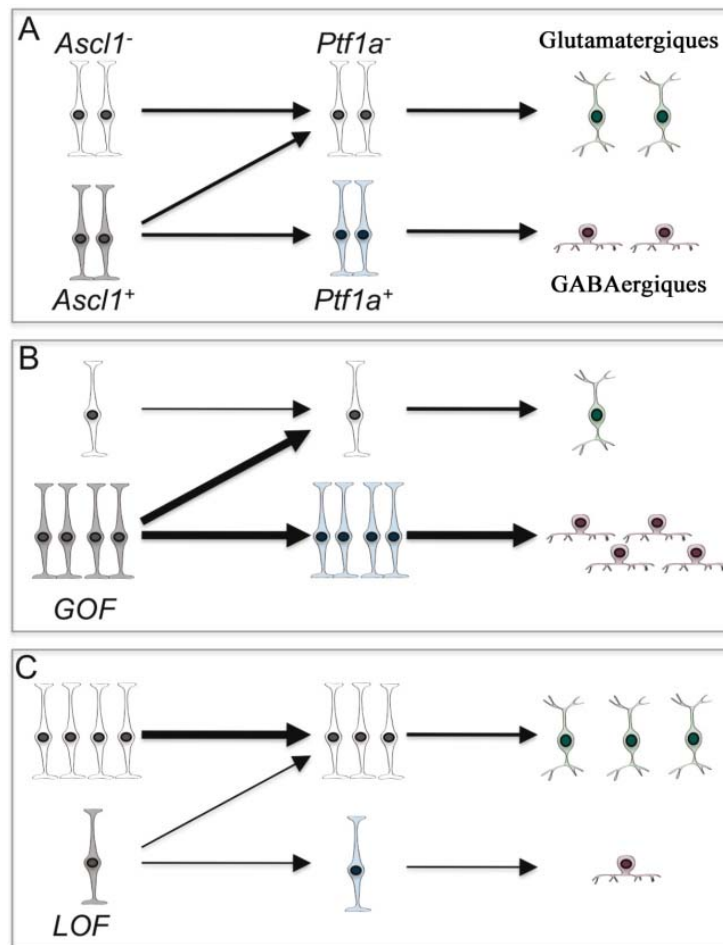


Figure 58 : Rôle d'*Ascl1* au cours de la rétino-genèse. (A) Dans ce modèle *Ascl1* exerce un effet proneural en générant à la fois des progéniteurs *Ptf1a*⁺ et *Ptf1a*⁻ et un effet dans la détermination des cellules GABAergiques par l'activation de l'expression de *Ptf1a*. (B) Le gain de fonction d'*Ascl1* biaise une sous-population de progéniteurs vers un destin GABAergique *via Ptf1a*. (C) La perte de fonction d'*Ascl1* mène à une diminution des neurones GABAergiques.

Dans la rétine, mes données suggèrent qu'*Ascl1* est nécessaire et suffisant pour activer l'expression de *Ptf1a*. Cependant, alors qu'ils semblent agir dans la même cascade de régulation, comment expliquer que les gains de fonction de ces deux facteurs conduisent à des phénotypes très différents ? Quand la surexpression de *Ptf1a* provoque une augmentation des neurones inhibiteurs (cellules amacrine et horizontale) aux dépens de tous les autres neurones excitateurs, celle d'*Ascl1* augmente les cellules glutamatergiques ganglionnaires et seulement les cellules GABAergiques dans la couche des cellules ganglionnaires (les amacrine déplacées). Clairement, l'activation de *Ptf1a* par *Ascl1* ne suffit pas à reproduire le phénotype de *Ptf1a*, probablement car *Ascl1* régule de nombreuses autres cibles. Afin d'identifier l'ensemble des ses cibles dans les progéniteurs rétiniens, il serait intéressant de

réaliser des expériences de « RNAseq » en conditions de perte ou gain de fonction d'Ascl1. Ceci permettrait d'avoir une vision plus large du panel de cibles de ce facteur de transcription et donc de mieux comprendre son implication dans la détermination des progéniteurs rétiniens.

L'un de ces autres acteurs de la cascade transcriptionnelle activée par Ascl1 pourrait être Dlx2. La surexpression dans la rétine du facteur Dlx2 conduit à un phénotype identique à celui d'Ascl1. J'ai mentionné dans les résultats qu'il est sous le contrôle d'Ascl1 dans le cerveau antérieur (Poitras et al., 2007). Bien que l'impact de *Dlx2* sur la genèse des sous-types ne soit pas encore identifié dans la rétine, mais sachant son implication dans ce processus dans d'autres régions du système nerveux, il serait intéressant de voir sa position par rapport à la cascade transcriptionnelle *Ascl1/Ptfla* au cours de la rétino-genèse.

Ascl1 et la régulation du cycle cellulaire

J'ai montré dans l'introduction que la détermination des progéniteurs est étroitement liée au cycle cellulaire. Les facteurs de détermination sont en effet capables d'induire la sortie du cycle (Bertrand et al., 2002 ; Farah et al. 2000; Fode et al. 2000; Nieto et al. 2001; Nakada et al. 2004). Dans une récente étude, les auteurs ont cherché à identifier des cibles transcriptionnelles d'Ascl1 dans le cerveau embryonnaire et des cultures de cellules souches neurales. Couplé à des études fonctionnelles, ils ont pu mettre en évidence qu'il active un grand nombre de régulateurs positifs du cycle cellulaire. De plus, des expériences de perte de fonction ont montré qu'il est requis pour une division normale des progéniteurs (Castro et al., 2011). Ces résultats démontrent qu'Ascl1 joue un rôle majeur dans la coordination du programme neurogénique *via* le contrôle de la progression des progéniteurs neuronaux à travers les phases de prolifération, de sortie du cycle cellulaire et de détermination. C'est pourquoi, il paraît important d'étudier à présent son implication dans le contrôle du cycle cellulaire dans le contexte de la rétino-genèse. Les phénotypes obtenus quant au gain ou la perte de fonction d'Ascl1 pourraient être en partie dû à un effet potentiel sur le cycle cellulaire. Regarder son impact sur la prolifération, la sortie du cycle ou même sur sa cinétique par les techniques que j'ai présentées dans les résultats permettrait potentiellement de mieux comprendre son rôle au cours de la rétino-genèse. De plus, une telle étude pourrait faire le lien entre le contrôle du cycle cellulaire et de la détermination. Enfin, on peut aussi

émettre l'hypothèse que sa fonction proneurale passe par le contrôle du cycle visant à pousser les progéniteurs à en sortir alors que sa fonction de spécification vers les cellules GABAergiques passe par l'activation d'une cascade transcriptionnelle impliquant des facteurs de détermination tels que *Ptfla*.

De nouveaux outils pour étudier plus finement la détermination neuronale

Les avancées technologiques constituent un enjeu majeur pour une meilleure compréhension des processus développementaux. L'arrivée de nouvelles techniques permettant d'identifier le transcriptome de cellules uniques ou bien les techniques d'imagerie 4D permettant de suivre de manière clonale la descendance d'une seule cellule progénitrice, après différentes approches de marquages comme l'électroporation d'une seule cellule (*In Vivo* Single-Cell Electroporation) ou le marquage mosaïque d'un seul progéniteur (*In Vivo* Mosaic Labeling of Single RPCs, **Figure 59**), ont permis ces dernières années des avancées majeures dans le domaine (He et al., 2012) et offre de nombreuses perspectives d'étude des processus de spécification des sous-types rétiens.

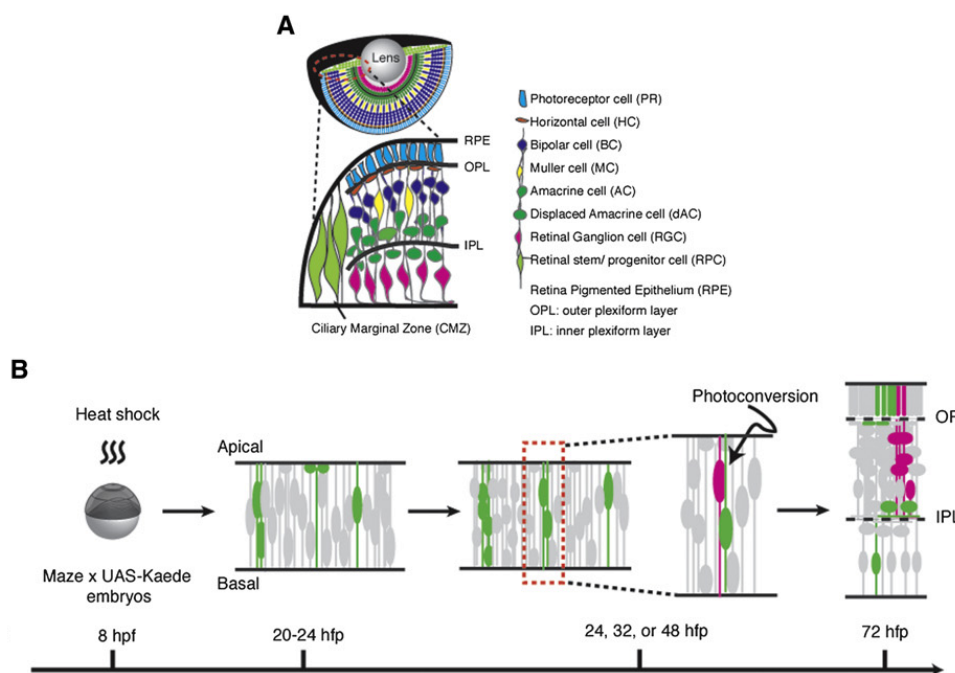


Figure 59 :
***In Vivo* Mosaic Labeling of Single RPCs.**
(A) Schéma de la rétine et de ces types cellulaires majoritaires. (B) Expérience de suivi d'un clone rétinien issu d'un progéniteur unique photo-converti chez le poisson zèbre (violet). Cette technique est basée sur la stratégie de

MAZe (Collins et al., 2010) qui permet d'induire des recombinaisons par choc thermique. Dans cette stratégie, les auteurs utilisent le système MAZe pour conduire l'expression de Kaede, une protéine fluorescente verte dont l'exposition aux UVs, au moment souhaité, provoque un changement de fluorescence en rouge (d'après He et al., 2012).

La modélisation mathématique est également une approche prometteuse pour valider les hypothèses et modèles de détermination cellulaires (stochastiques ou déterministes) déduits de l'expérimentation.

Ces approches pourraient permettre de suivre le lignage de progéniteurs exprimant *Ascl1* et tel ou tel autre facteur et d'en déduire l'impact de ces différentes combinaisons de facteurs dans la spécification des types et sous-types rétiens.

2. Rôle des voies Wnt et Hedgehog dans le contrôle de la balance prolifération/différenciation cellulaire dans la rétine

Les voies Wnt et Hedgehog ont des effets opposés sur la prolifération des précurseurs rétiniens

Un des mécanismes qui pourrait expliquer l'impact des voies de signalisation Wnt et Hedgehog sur le comportement des cellules de la ZMC est le contrôle de la sortie du cycle cellulaire. L'étude que nous avons réalisée à ce sujet suggère en effet que les voies Wnt et Hedgehog ont des effets opposés sur le moment de sortie du cycle. De plus, nos données préliminaires laissent penser que la voie de signalisation Wnt joue un rôle également sur la vitesse du cycle cellulaire des précurseurs rétiniens dans la ZMC. En revanche, les différentes techniques que j'ai utilisées pour calculer la durée du cycle cellulaire en condition de perturbation de la voie Hedgehog ne m'ont pas permis de mettre en évidence un effet clair de cette signalisation sur la cinétique du cycle dans la ZMC. Il est donc nécessaire d'approfondir ce champs de recherche, en améliorant ces techniques délicates d'étude de la cinétique du cycle cellulaire, afin de mieux comprendre le mécanisme d'action des voies Wnt et Hedgehog sur la prolifération des précurseurs de la ZMC.

Une autre question se pose également quant à l'impact des voies Wnt et Hedgehog sur la prolifération des cellules de la ZMC : les cellules souches et les cellules progénitrices répondent-elles de la même façon aux perturbations de ces voies ? En effet, toutes les analyses ont été faites sur l'ensemble des cellules de la ZMC, sans distinguer les cellules souches des progénitrices. Avec les nouveaux marqueurs de cellules souches que nous avons identifiés à l'issue du crible, nous pourrions discriminer ces types cellulaires lors des analyses de la prolifération et ainsi conclure sur la population affectée par les voies Wnt et Hedgehog.

Réseau de signalisation dans la rétine post-embryonnaire : les voies Wnt et Hedgehog s'antagonisent mutuellement

Nous avons mis en évidence une régulation négative de la voie Wnt sur l'activité de la voie Hedgehog et *vice versa*. Ce résultat nous a surpris dans un premier temps compte tenu des données de la littérature suggérant qu'elles ont des effets mitogènes dans un contexte de neurogenèse adulte. Nos effets dans la ZMC seraient-il spécifique de ce modèle rétine particulier aux amphibiens et aux poissons ? Des interactions antagonistes ont cependant été mise en évidence dans d'autres contextes comme la niche des cellules souches de la crypte intestinale (van den Brink et al., 2004 ; van Dop et al., 2009). Il serait donc intéressant à présent de réétudier, à la vue de nos résultats, le rôle des voies Wnt et Hedgehog et plus particulièrement leurs interactions dans le cerveau.

L'objectif du projet qui consistait à étudier les interactions entre deux voies de signalisation devra être poursuivi afin d'élargir nos connaissances du réseau de signalisation à l'œuvre dans la ZMC pour le contrôle de la prolifération des précurseurs rétiens. Plusieurs voies de signalisation constituent des candidats potentiels. Parmi les 18 marqueurs que nous avons découvert dans le crible, *Sprt4* (*sprouty homolog 4-like*) est connu pour exercer un effet inhibiteur sur la signalisation FGF (Mason et al., 2004 ; Rosen and Lemjabbar, 2010). Il a récemment été montré, par des analyses *in silico*, que ce gène constitue une cible de la signalisation Wnt dans les cellules progénitrices (Katoh and Katoh, 2006). Il a aussi été mis en évidence que des mutants de *Sprt4* présente non seulement une augmentation de la signalisation FGF mais aussi une réduction de la voie Hedgehog (Yu et al., 2011). Ces données laissent supposer une éventuelle interaction entre les voies FGF, Wnt et Hedgehog dont l'activité qu'elles exerceraient sur les autres pourrait passer par *Sprt4*. L'expression de FGF8 a été examinée récemment au laboratoire par Caroline Borday (donnée non publiée). Son expression restreinte à la région périphérique de la ZMC où résident les cellules souches, est en accord avec un rôle potentiel de la voie FGF dans la ZMC. Son rôle et ses interactions avec les voies Wnt et Hedgehog restent néanmoins à étudier.

D'autre part, le crible à grande échelle que nous avons réalisé a permis de mettre en évidence que le gène Merlin, un des régulateurs agissant en amont de la voie de signalisation Hippo est spécifiquement exprimé dans la ZMC. D'autres composants de cette voie sont également exprimés dans la ZMC (travail mené au laboratoire par Pauline Cabochette).

Comme de récentes données suggèrent que la voie Hippo pourrait interagir avec les voies Wnt et Hedgehog (Fernandez et al., 2009 ; Varelas et al., 2010 ; Imajo et al., 2011), il serait tout à fait pertinent de rechercher d'éventuels « cross-talks » entre ces voies dans le cadre de la rétino-genèse.

L'expression dans la ZMC des gènes *BMP2*, *BMP7* ou du gène *Smad1* (données non publiées du laboratoire) fait de la voie BMP un autre candidat potentiel. En effet, de très nombreux travaux, menés dans différents contextes cellulaires, montrent qu'il existe des «cross-talks» entre la voie de signalisation BMP et les voies Wnt et Hedgehog (revue dans Guo et Wang, 2009). Cependant, les interactions entre ces cascades sont loin d'être clairement comprises, et dépendent vraisemblablement d'un grand nombre de paramètres comme le tissu considéré ou le degré de différenciation cellulaire. Il paraît par conséquent pertinent d'étudier les interactions qu'établissent ces trois voies de signalisation dans la ZMC afin de caractériser le réseau de signalisation à l'œuvre dans les précurseurs rétinien.

Les acteurs moléculaires de l'interaction entre les voies de signalisation Wnt et Hedgehog

Notre étude suggère que l'inhibition mutuelle entre les voies Wnt et Hedgehog passe par la régulation transcriptionnelle du gène suppresseur de tumeur *Sfrp-1* et du facteur de transcription *Gli3*. Cependant, la coordination entre ces deux voies de signalisation pourrait être plus complexe mettant en jeu des acteurs additionnels. Par exemple, nous nous sommes demandé si d'autres gènes de la famille des *Sfrp* pouvaient être impliqués. En effet, il a été mis en évidence dans des structures mésodermiques, que la réduction de l'activité *Wnt1/4* par la voie Sonic Hedgehog passe par la régulation positive du gène *Sfrp-2* (Lee et al., 1999). En revanche, une équipe propose que de la voie Hedgehog agit en réprimant l'expression de *Sfrp-2* dans des cellules pluripotentes mésenchymateuses (Ingram et al., 2002). Enfin, une étude plus récente montre que l'activité de *Sfrp-2* dans les cellules souches mésenchymateuses passe par l'inhibition de la voie Wnt (Alfaro et al., 2010). Dans la rétine, nous avons montré que le territoire d'expression de *Sfrp-2*, contrairement à *Sfrp-1*, se restreint à la périphérie de la ZMC (**Figure 60**) et ne constitue donc pas une cible potentielle de la voie Hedgehog.

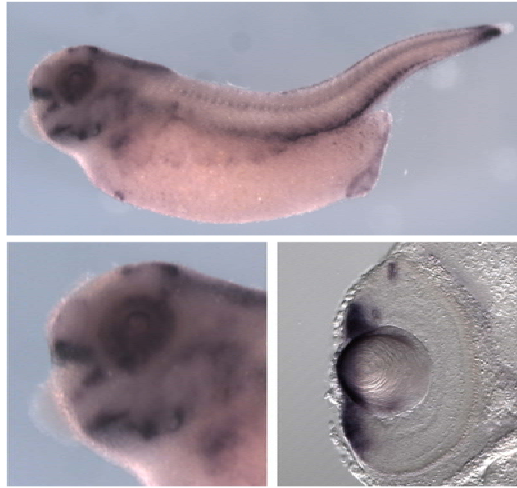


Figure 60 : Le territoire d'expression de *Sfrp-2* est restreint à la ZMC. Hybridation *in situ* sur embryons entiers stade 39. Les embryons ont ensuite été sectionnés au niveau de la tête. La coupe transversale de rétine montre que *Sfrp-2* est fortement exprimé dans l'ensemble de la ZMC.

Un autre facteur pourrait jouer un rôle dans ce processus. En effet, un certain nombre de données suggère que *Sufu* (*suppressor of fused*) est un régulateur clé de la signalisation Hedgehog chez les mammifères (Taylor et al., 2002 ; Cooper et al., 2005 ; Svard et al., 2006 ; Varjosalo et al., 2006). Plus récemment, il a été montré qu'il agit en tant qu'antagoniste de la voie Hedgehog pour le maintien de la multipotence des progéniteurs neuronaux (Cwinn et al., 2011) et impliqué dans les mécanismes d'interactions des voies Wnt et Hedgehog dans la rétine (Min et al., 2011).

3. Recherche de nouveaux marqueurs rétiniens

Identification de nombreux marqueurs des différentes populations cellulaires de la rétine

Lors du crible, nous avons isolé de nombreux marqueurs des neurones rétiniens qui constituent des candidats intéressants pour l'étude des processus de différenciation et de fonctionnement de ces neurones. Par exemple 6 nouveaux marqueurs des photorécepteurs ont été identifiés et sont en cours d'étude au laboratoire.

Cependant, l'objectif principal de ce projet visait à identifier des marqueurs spécifiques des cellules souches et progénitrices. Sur « seulement » 1106 ADNc testés, nous avons découvert 18 nouveaux marqueurs exclusivement exprimés dans les cellules souches et 6 nouveaux marqueurs exclusivement exprimés dans les cellules progénitrices. Ces candidats constituent des gènes tout à fait intéressants à étudier (voir ci-dessous). Cependant, l'objectif initial était de fournir une « signature moléculaire » des cellules souches et progénitrices. Nous pourrions donc continuer ce crible pour compléter la liste des marqueurs spécifiques. Néanmoins, avec le développement des méthodes de séquençage à haut débit, il pourrait être plus pertinent de réaliser des dissections au laser des différentes régions de la ZMC et d'établir le transcriptome de ces populations cellulaires par RNAseq.

Nouveaux marqueurs des cellules progénitrices

La plupart des études menées sur le choix du destin neuronal au cours de la rétino-genèse se sont focalisées sur le rôle de facteurs de transcription. Cependant, les résultats de notre crible à grande échelle posent la question de l'orientation des recherches à ce sujet. Bien que les facteurs de transcription semblent jouer un rôle clé dans le choix du destin neuronal, les acteurs de la régulation génique post-transcriptionnelle, tels que les protéines de liaison à l'ARN et les micro ARN ou de la régulation post-traductionnelle, sont à prendre en considération. Dans cette perspective, les facteurs exprimés dans la région de la ZMC contenant les cellules progénitrices que nous avons isolés dans notre crible constituent des candidats intéressants.

Les analyses fonctionnelles que j'ai menées sur deux de ces gènes candidats, *CD82* et *TK1*, montrent que la distribution des types rétiens est altérée en condition de surexpression de ces facteurs. Ces résultats sont encore très préliminaires et demandent à être confirmés et complétés. Cependant, compte tenu de leurs rôles potentiels dans la régulation du cycle cellulaire (voir la partie 3.2.1 des résultats), ces facteurs constituent des candidats intéressants pour étudier les liens entre la régulation de la prolifération et la détermination cellulaire. En particulier, étant donné que *CD82* est capable d'inhiber la voie canonique Wnt *in vitro* (Chairoungdua et al., 2010), il serait intéressant d'étudier ce facteur dans le contexte du réseau de signalisation Wnt-Hedgehog que nous avons mis en évidence dans la rétine post-embryonnaire.

Nouveaux marqueurs des cellules souches

Parmi les 18 nouveaux marqueurs des cellules souches isolés lors du crible, certains nous paraissent être des candidats de choix pour de futures études fonctionnelles. Le laboratoire s'intéresse depuis longtemps aux protéines liant l'ARN. La découverte d'une telle protéine, *NOP58 (Ribonucleoprotein homolog)*, identifiée suite au crible, constitue un excellent candidat par exemple pour étudier la régulation post-transcriptionnelle dans les cellules souches rétiennes.

En voyant que les 18 gènes sont tous exprimés dans la même région de la ZMC, à savoir au niveau des cellules souches rétiennes, il est raisonnable de penser que leur territoire d'expression puisse être contrôlé par le même complexe transcriptionnel. Sur la base de cette hypothèse, nous avons initié une collaboration avec Amandine Berry, post-doctorante au sein de l'équipe de Sylvie Rétaux, pour effectuer une recherche *in silico* de motifs consensus communs à ces 18 nouveaux marqueurs afin d'identifier de potentiels régulateurs. Cette recherche d'une « cis-regulatory logic » a déjà permis de trouver un enrichissement de sites de la signalisation des récepteurs aux hormones œstrogène. Il serait donc intéressant de tester si cette signalisation joue un rôle dans la maintenance des cellules souches rétiennes. Cette hypothèse repose sur des données de la littérature suggérant que la surexpression d'un récepteur aux œstrogènes (*Esrrb*, Estrogen-related receptor b) maintient l'auto-renouvellement et la pluripotence de cellules souches embryonnaires (Festuccia et al., 2012). De plus, cette équipe a pu mettre en évidence que ce récepteur agit en aval de Nanog. Cependant, bien que

le fruit de cette recherche d'une « cis-regulatory logic » soit encourageant, ces données sont encore très préliminaires et restent à être confirmées.

Nous avons également exploité ces 18 nouveaux marqueurs pour rechercher des cibles potentielles des voies Wnt et Hedgehog. En binôme avec Pauline Maurin, dans le cadre de son stage de deuxième année de BTS Biotechnologie, nous avons donc commencé à tester l'effet de la perturbation de ces voies sur l'expression de ces gènes. Cette étude très préliminaire montre que l'expression d'une partie de ces gènes est affectée par l'activation ou l'inhibition des voies de signalisation Wnt et Hedgehog. En effet, parmi les cinq gènes testés (une protéine de liaison à l'ARN, *Nop58 Ribonucleoprotein homolog* ; un ARN non codant, *Partial miscRNA*, *Alkaline phosphatase*, *Fibronectin type III* et l'enzyme *Glucoside xylosyltransferase I*), trois ce sont avérés être régulés par ces voies de signalisation. En revanche, aucun n'est contrôlé de façon simultanée et opposé par ces voies (**Figure 61**). Afin de compléter cette étude, il reste à tester la pertinence de ces interactions et à examiner l'effet de la perturbation des voies Wnt et Hedgehog sur l'ensemble des autres marqueurs identifiés. Ce travail pourrait permettre de compléter le réseau génique impliquant les voies Wnt et Hedgehog dans la rétine

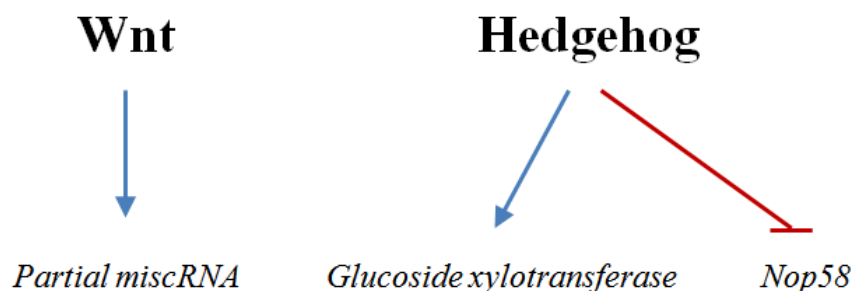


Figure 61 : De nouvelles cibles des voies Wnt et Hedgehog. La voie Wnt contrôle positivement l'expression du gène *Partial miscRNA*. La voie Hedgehog régule positivement le gène *Glucoside xylotranferase* et négativement le gène *Nop58*.

IV. Conclusion générale

Bien que ces travaux soient le fruit d'une recherche très fondamentale, je me permets dans cette conclusion d'imaginer l'intérêt qu'ils pourraient apporter pour la recherche de traitements thérapeutiques dans le cadre de pathologies rétinienne ou de cancers.

Les maladies neuro-dégénératives sont une cause importante de perte de la vision à travers le monde. Le glaucome, la rétinite pigmentaire, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) ou la rétinopathie diabétique par exemple restent aujourd'hui incurables et conduisent souvent à la cécité. En France, plus de 40 000 personnes sont atteintes de rétinopathies pigmentaires et de dystrophies rétiniennes et près de 1,3 million sont touchées par une dégénérescence maculaire liée à l'âge. Comme pour d'autres maladies neuro-dégénératives, ces pathologies rétiniennes résultent de la mort programmée de certains types de neurones tels que les cellules ganglionnaires chez les patients atteints de glaucome, les photorécepteurs dans les cas de rétinopathies pigmentaires et de DMLA ou d'une multitude de types neuronaux pour les rétinopathies diabétiques.

La thérapie cellulaire constitue une possibilité de traitement pour ces maladies humaines. Un grand nombre d'essais de greffes de cellules souches embryonnaires (ES « Embryonic Stem cells) ont été réalisés mais les résultats obtenus sont peu encourageants. Ces cellules sont en effet incapables de se différencier et de générer correctement des types cellulaires rétiniens (MacLaren and Pearson, 2007; Pellegrini et al. 2007; Djojoseburoto and Arsenijevic, 2008; Lamba et al. 2008). La découverte de cellules souches neurales dans la rétine des mammifères, y compris chez l'Homme, a apporté un nouvel espoir pour une thérapie cellulaire efficace. En effet, la transplantation de cellules souches rétiniennes adultes au sein de rétines malades de rongeurs ont montré qu'elles sont capables de se différencier correctement et de générer des types cellulaires rétiniens (Coles et al. 2004). L'ensemble de ces études suggèrent que la multipotence des cellules souches rétiniennes contrairement à la pluripotence des cellules ES leur permet de mieux s'engager vers un destin cellulaire. L'utilisation des cellules souches rétiniennes est cependant restreinte à leur disponibilité très limitée et leur potentiel prolifératif réduit. En revanche, les cellules ES sont une source inépuisable. L'idée aujourd'hui est donc de programmer ces cellules *in vitro* vers un destin rétinien ou un type cellulaire rétinien particulier pour ensuite les réimplanter dans des rétines malades. C'est pourquoi l'exploration du potentiel d'application de ces cellules souches passe par la caractérisation de leurs propriétés biologiques en particulier par la compréhension du réseau de régulation qui dirige leur destin vers un type cellulaire particulier. L'étude que j'ai

menée sur le facteur de transcription Ascl1 fait je pense partie de cette problématique. L'équipe du docteur Steven D Schwartz a très récemment utilisé cette stratégie pour restaurer la vision de patients atteints de dystrophie rétinienne et de DMLA. Ces patients ont reçu une greffe de cellules ES humaines préalablement différenciées *in vitro* en épithélium pigmenté rétinien. De plus, la transplantation de cellules déjà engagées vers un destin particulier permet de prévenir l'apparition d'une prolifération anormale ou de formation de tératome (Schwartz et al., 2012). Bien qu'il y ait encore très peu de recul, cette avancée majeure prouve la pertinence d'une telle approche thérapeutique.

Une autre piste thérapeutique que pourrait apporter l'existence de cellules souches rétiniennes adultes serait d'exploiter leur potentiel endogène de régénération. Bien que les cellules souches rétiniennes soient inactives ou quiescentes chez l'homme, elles participent à la régénération du tissu chez le xénope par exemple. C'est pourquoi, étudier les mécanismes moléculaires, tels que l'activité des voies de signalisation Wnt, Hh et d'autres, qui régulent l'activité de ces cellules chez des espèces où elles sont actives *in vivo* est primordial pour un jour pouvoir déclencher un processus de réparation endogène chez l'homme.

La compréhension de l'activité des cellules souches est également devenue primordiale dans le domaine de la cancérologie. En effet, il a été décrit qu'il existe au sein de certaines tumeurs des cellules présentant des similitudes avec les cellules souches. Aujourd'hui, le concept de « cellules souches cancéreuses » est proposé par de nombreux chercheurs (revue dans Shigdar et al., 2012). Elles seraient capables de s'auto-renouveler et de générer les différents types cellulaires d'une tumeur et pourraient dériver de cellules souches dysfonctionnelles. Certaines cellules tumorales pourraient également acquérir des caractéristiques de cellules souches. Leur comportement est médié par plusieurs voies de signalisation dont la voie Hedgehog qui se trouve être anormalement active dans une large variété de cancer. Depuis plusieurs années, cette voie fait donc l'objet de criblages thérapeutiques dans le cadre de traitements anti-cancéreux. En effet, beaucoup de données suggèrent que la sur-activation de la voie Hedgehog serait à l'origine d'un auto-renouvellement accéléré des cellules souches cancéreuses. Cependant, l'effet des traitements visant à bloquer cette voie de signalisation n'est que transitoire. D'après les résultats que l'on a obtenus quant à l'effet de cette voie de signalisation, il est possible que son inhibition provoque une mise en quiescence des cellules souches cancéreuses. Bien que les tumeurs régressent, ceci pourrait expliquer l'absence de rémission à long terme.

La recherche fondamentale est précieuse pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la maintenance, la prolifération et la spécification des cellules souches neurales et progénitrices et ainsi pouvoir améliorer ou trouver de nouveaux traitements thérapeutiques.

Bibliographie

- Abdough, M., Bernier, G., 2006. In vivo reactivation of a quiescent cell population located in the ocular ciliary body of adult mammals. *Exp Eye Res* 83, 153-64, doi:10.1016/j.exer.2005.11.016.
- Adler, R., Canto-Soler, M. V., 2007. Molecular mechanisms of optic vesicle development: complexities, ambiguities and controversies. *Dev Biol* 305, 1-13, doi:10.1016/j.ydbio.2007.01.045.
- Agathocleous, M., Harris, W. A., 2009. From progenitors to differentiated cells in the vertebrate retina. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25, 45-69, doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113259.
- Agathocleous, M., Locker, M., Harris, W. A., Perron, M., 2007. A general role of hedgehog in the regulation of proliferation. *Cell Cycle* 6, 156-9.
- Ahmad, I., Tang, L., Pham, H., 2000. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 517-21, doi:10.1006/bbrc.2000.2473.
- Ahmad, I., Das, A. V., James, J., Bhattacharya, S., Zhao, X., 2004. Neural stem cells in the mammalian eye: types and regulation. *Semin Cell Dev Biol* 15, 53-62, doi:10.1016/j.semcdb.2003.09.003.
- Ahn, Y., Sanderson, B. W., Klein, O. D., Krumlauf, R., 2010. Inhibition of Wnt signaling by Wise (Sostdc1) and negative feedback from Shh controls tooth number and patterning. *Development* 137, 3221-31, doi:10.1242/dev.054668.
- Akagi, T., Inoue, T., Miyoshi, G., Bessho, Y., Takahashi, M., Lee, J. E., Guillemot, F., Kageyama, R., 2004a. Requirement of multiple basic helix-loop-helix genes for retinal neuronal subtype specification. *J Biol Chem* 279, 28492-8, doi:10.1074/jbc.M400871200.
- Akagi, T., Mandai, M., Ooto, S., Hirami, Y., Osakada, F., Kageyama, R., Yoshimura, N., Takahashi, M., 2004b. Otx2 homeobox gene induces photoreceptor-specific phenotypes in cells derived from adult iris and ciliary tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 4570-5, doi:10.1167/iovs.04-0697.
- Aldiri, I., Vetter, M. L., 2012. PRC2 during vertebrate organogenesis: a complex in transition. *Dev Biol* 367, 91-9, doi:10.1016/j.ydbio.2012.04.030.
- Alexiades, M. R., Cepko, C. L., 1997. Subsets of retinal progenitors display temporally regulated and distinct biases in the fates of their progeny. *Development* 124, 1119-31.
- Alexson, T. O., Hitoshi, S., Coles, B. L., Bernstein, A., van der Kooy, D., 2006. Notch signaling is required to maintain all neural stem cell populations--irrespective of spatial or temporal niche. *Dev Neurosci* 28, 34-48, doi:10.1159/000090751.
- Alfaro, M. P., Vincent, A., Saraswati, S., Thorne, C. A., Hong, C. C., Lee, E., Young, P. P., 2010. sFRP2 suppression of bone morphogenic protein (BMP) and Wnt signaling mediates mesenchymal stem cell (MSC) self-renewal promoting engraftment and myocardial repair. *J Biol Chem* 285, 35645-53, doi:10.1074/jbc.M110.135335.
- Ali, F., Hindley, C., McDowell, G., Deibler, R., Jones, A., Kirschner, M., Guillemot, F., Philpott, A., 2011. Cell cycle-regulated multi-site phosphorylation of Neurogenin 2 coordinates cell cycling with differentiation during neurogenesis. *Development* 138, 4267-77, doi:10.1242/dev.067900.
- Ali, R. R., Sowden, J. C., 2011. Regenerative medicine: DIY eye. *Nature* 472, 42-3, doi:10.1038/472042a.
- Alvarez-Delfin, K., Morris, A. C., Snelson, C. D., Gamse, J. T., Gupta, T., Marlow, F. L., Mullins, M. C., Burgess, H. A., Granato, M., Fadool, J. M., 2009. Tbx2b is required for ultraviolet photoreceptor cell specification during zebrafish retinal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2023-8, doi:10.1073/pnas.0809439106.

- Alvarez-Medina, R., Le Dreau, G., Ros, M., Marti, E., 2009. Hedgehog activation is required upstream of Wnt signalling to control neural progenitor proliferation. *Development* 136, 3301-9, doi:10.1242/dev.041772.
- Ammermuller, J., Mockel, W., Perlman, I., Rohrenbeck, J., 1996. Effects of horizontal cell network architecture on signal spread in the turtle outer retina. *Experiments and simulations. Vision Res* 36, 4089-103.
- Andreazzoli, M., Gestri, G., Angeloni, D., Menna, E., Barsacchi, G., 1999. Role of *Xrx1* in *Xenopus* eye and anterior brain development. *Development* 126, 2451-60.
- Andreazzoli, M., Gestri, G., Cremisi, F., Casarosa, S., Dawid, I. B., Barsacchi, G., 2003. *Xrx1* controls proliferation and neurogenesis in *Xenopus* anterior neural plate. *Development* 130, 5143-54, doi:10.1242/dev.00665.
- Asami, M., Sun, G., Yamaguchi, M., Kosaka, M., 2007. Multipotent cells from mammalian iris pigment epithelium. *Dev Biol* 304, 433-46, doi:10.1016/j.ydbio.2006.12.047.
- Ashery-Padan, R., Gruss, P., 2001. Pax6 lights-up the way for eye development. *Curr Opin Cell Biol* 13, 706-14.
- Aufderklamm, S., Todenhofer, T., Gakis, G., Kruck, S., Hennenlotter, J., Stenzl, A., Schwentner, C., 2012. Thymidine kinase and cancer monitoring. *Cancer Lett* 316, 6-10, doi:10.1016/j.canlet.2011.10.025.
- Austin, C. P., Feldman, D. E., Ida, J. A., Jr., Cepko, C. L., 1995. Vertebrate retinal ganglion cells are selected from competent progenitors by the action of Notch. *Development* 121, 3637-50.
- Bassett, E. A., Wallace, V. A., 2012. Cell fate determination in the vertebrate retina. *Trends Neurosci* 35, 565-73, doi:10.1016/j.tins.2012.05.004.
- Baye, L. M., Link, B. A., 2008. Nuclear migration during retinal development. *Brain Res* 1192, 29-36, doi:10.1016/j.brainres.2007.05.021.
- Belliveau, M. J., Cepko, C. L., 1999. Extrinsic and intrinsic factors control the genesis of amacrine and cone cells in the rat retina. *Development* 126, 555-66.
- Belliveau, M. J., Young, T. L., Cepko, C. L., 2000. Late retinal progenitor cells show intrinsic limitations in the production of cell types and the kinetics of opsin synthesis. *J Neurosci* 20, 2247-54.
- Bernier, G., Panitz, F., Zhou, X., Hollemann, T., Gruss, P., Pieler, T., 2000. Expanded retina territory by midbrain transformation upon overexpression of *Six6* (*Optx2*) in *Xenopus* embryos. *Mech Dev* 93, 59-69.
- Bertrand, N., Castro, D. S., Guillemot, F., 2002. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* 3, 517-30, doi:10.1038/nrn874.
- Bharti, K., Nguyen, M. T., Skuntz, S., Bertuzzi, S., Arnheiter, H., 2006. The other pigment cell: specification and development of the pigmented epithelium of the vertebrate eye. *Pigment Cell Res* 19, 380-94, doi:10.1111/j.1600-0749.2006.00318.x.
- Bhattacharya, S., Dooley, C., Soto, F., Madson, J., Das, A. V., Ahmad, I., 2004. Involvement of *Ath3* in CNTF-mediated differentiation of the late retinal progenitors. *Mol Cell Neurosci* 27, 32-43, doi:10.1016/j.mcn.2004.05.004.
- Bilitou, A., Ohnuma, S., 2010. The role of cell cycle in retinal development: cyclin-dependent kinase inhibitors co-ordinate cell-cycle inhibition, cell-fate determination and differentiation in the developing retina. *Dev Dyn* 239, 727-36, doi:10.1002/dvdy.22223.
- Blackshaw, S., Harpavat, S., Trimarchi, J., Cai, L., Huang, H., Kuo, W. P., Weber, G., Lee, K., Fraioli, R. E., Cho, S. H., Yung, R., Asch, E., Ohno-Machado, L., Wong, W. H., Cepko, C. L., 2004. Genomic analysis of mouse retinal development. *PLoS Biol* 2, E247, doi:10.1371/journal.pbio.0020247.

- Boije, H., Edqvist, P. H., Hallbook, F., 2008. Temporal and spatial expression of transcription factors FoxN4, Ptf1a, Prox1, Isl1 and Lim1 mRNA in the developing chick retina. *Gene Expr Patterns* 8, 117-23, doi:10.1016/j.modgep.2007.09.004.
- Borday, C., Cabochette, P., Parain, K., Mazurier, N., Janssens, S., Tran, H. T., Sekkali, B., Bronchain, O., Vleminckx, K., Locker, M., Perron, M., 2012. Antagonistic cross-regulation between Wnt and Hedgehog signalling pathways controls post-embryonic retinal proliferation. *Development* 139, 3499-509, doi:10.1242/dev.079582.
- Boucher, S. E., Hitchcock, P. F., 1998. Insulin-related growth factors stimulate proliferation of retinal progenitors in the goldfish. *J Comp Neurol* 394, 386-94.
- Boy, S., Souopgui, J., Amato, M. A., Wegnez, M., Pieler, T., Perron, M., 2004. XSEB4R, a novel RNA-binding protein involved in retinal cell differentiation downstream of bHLH proneural genes. *Development* 131, 851-62, doi:10.1242/dev.00983.
- Bracken, A. P., Helin, K., 2009. Polycomb group proteins: navigators of lineage pathways led astray in cancer. *Nat Rev Cancer* 9, 773-84, doi:10.1038/nrc2736.
- Bramblett, D. E., Pennesi, M. E., Wu, S. M., Tsai, M. J., 2004. The transcription factor Bhlhb4 is required for rod bipolar cell maturation. *Neuron* 43, 779-93, doi:10.1016/j.neuron.2004.08.032.
- Brody, T., Odenwald, W. F., 2005. Regulation of temporal identities during *Drosophila* neuroblast lineage development. *Curr Opin Cell Biol* 17, 672-5, doi:10.1016/j.ceb.2005.09.013.
- Brown, N. L., Patel, S., Brzezinski, J., Glaser, T., 2001. Math5 is required for retinal ganglion cell and optic nerve formation. *Development* 128, 2497-508.
- Brown, N. L., Kanekar, S., Vetter, M. L., Tucker, P. K., Gemza, D. L., Glaser, T., 1998. Math5 encodes a murine basic helix-loop-helix transcription factor expressed during early stages of retinal neurogenesis. *Development* 125, 4821-33.
- Brzezinski, J. A. t., Lamba, D. A., Reh, T. A., 2010. Blimp1 controls photoreceptor versus bipolar cell fate choice during retinal development. *Development* 137, 619-29, doi:10.1242/dev.043968.
- Brzezinski, J. A. t., Kim, E. J., Johnson, J. E., Reh, T. A., 2011. Ascl1 expression defines a subpopulation of lineage-restricted progenitors in the mammalian retina. *Development* 138, 3519-31, doi:10.1242/dev.064006.
- Buchman, J. J., Tsai, L. H., 2008. Putting a notch in our understanding of nuclear migration. *Cell* 134, 912-4, doi:10.1016/j.cell.2008.09.007.
- Burmeister, M., Novak, J., Liang, M. Y., Basu, S., Ploder, L., Hawes, N. L., Vidgen, D., Hoover, F., Goldman, D., Kalnins, V. I., Roderick, T. H., Taylor, B. A., Hankin, M. H., McInnes, R. R., 1996. Ocular retardation mouse caused by Chx10 homeobox null allele: impaired retinal progenitor proliferation and bipolar cell differentiation. *Nat Genet* 12, 376-84, doi:10.1038/ng0496-376.
- Canto-Soler, M. V., Adler, R., 2006. Optic cup and lens development requires Pax6 expression in the early optic vesicle during a narrow time window. *Dev Biol* 294, 119-32, doi:10.1016/j.ydbio.2006.02.033.
- Carl, M., Loosli, F., Wittbrodt, J., 2002. Six3 inactivation reveals its essential role for the formation and patterning of the vertebrate eye. *Development* 129, 4057-63.
- Carruthers, S., Mason, J., Papalopulu, N., 2003. Depletion of the cell-cycle inhibitor p27(Xic1) impairs neuronal differentiation and increases the number of ElrC(+) progenitor cells in *Xenopus tropicalis*. *Mech Dev* 120, 607-16.
- Casarosa, S., Fode, C., Guillemot, F., 1999. Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* 126, 525-34.
- Castro, D. S., Martynoga, B., Parras, C., Ramesh, V., Pacary, E., Johnston, C., Drechsel, D., Lebel-Potter, M., Garcia, L. G., Hunt, C., Dolle, D., Bithell, A., Ettwiller, L., Buckley,

- N., Guillemot, F., 2011. A novel function of the proneural factor *Ascl1* in progenitor proliferation identified by genome-wide characterization of its targets. *Genes Dev* 25, 930-45, doi:10.1101/gad.627811.
- Cau, E., Casarosa, S., Guillemot, F., 2002. *Mash1* and *Ngn1* control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage. *Development* 129, 1871-80.
- Cavodeassi, F., Carreira-Barbosa, F., Young, R. M., Concha, M. L., Allende, M. L., Houart, C., Tada, M., Wilson, S. W., 2005. Early stages of zebrafish eye formation require the coordinated activity of *Wnt11*, *Fz5*, and the Wnt/beta-catenin pathway. *Neuron* 47, 43-56, doi:10.1016/j.neuron.2005.05.026.
- Centanin, L., Hoeckendorf, B., Wittbrodt, J., 2011. Fate restriction and multipotency in retinal stem cells. *Cell Stem Cell* 9, 553-62, doi:10.1016/j.stem.2011.11.004.
- Cepko, C. L., 1999. The roles of intrinsic and extrinsic cues and bHLH genes in the determination of retinal cell fates. *Curr Opin Neurobiol* 9, 37-46.
- Cepko, C. L., Austin, C. P., Yang, X., Alexiades, M., Ezzeddine, D., 1996. Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 589-95.
- Chairoungdua, A., Smith, D. L., Pochard, P., Hull, M., Caplan, M. J., 2010. Exosome release of beta-catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J Cell Biol* 190, 1079-91, doi:10.1083/jcb.201002049.
- Chapouton, P., Skupien, P., Hesl, B., Coolen, M., Moore, J. C., Madelaine, R., Kremmer, E., Faus-Kessler, T., Blader, P., Lawson, N. D., Bally-Cuif, L., 2010. Notch activity levels control the balance between quiescence and recruitment of adult neural stem cells. *J Neurosci* 30, 7961-74, doi:10.1523/JNEUROSCI.6170-09.2010.
- Chen, B., Cepko, C. L., 2007. Requirement of histone deacetylase activity for the expression of critical photoreceptor genes. *BMC Dev Biol* 7, 78, doi:10.1186/1471-213X-7-78.
- Cherry, T. J., Trimarchi, J. M., Stadler, M. B., Cepko, C. L., 2009. Development and diversification of retinal amacrine interneurons at single cell resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9495-500, doi:10.1073/pnas.0903264106.
- Chiang, C., Litington, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H., Beachy, P. A., 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407-13, doi:10.1038/383407a0.
- Chien, C. H., Shann, Y. J., Sheu, S. Y., 1996. Site-directed mutations of the catalytic and conserved amino acids of the neuraminidase gene, *nanH*, of *Clostridium perfringens* ATCC 10543. *Enzyme Microb Technol* 19, 267-76.
- Chow, R. L., Lang, R. A., 2001. Early eye development in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 255-96, doi:10.1146/annurev.cellbio.17.1.255.
- Chow, R. L., Altmann, C. R., Lang, R. A., Hemmati-Brivanlou, A., 1999. *Pax6* induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development* 126, 4213-22.
- Chow, R. L., Volgyi, B., Szilard, R. K., Ng, D., McKerlie, C., Bloomfield, S. A., Birch, D. G., McInnes, R. R., 2004. Control of late off-center cone bipolar cell differentiation and visual signaling by the homeobox gene *Vsx1*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1754-9, doi:10.1073/pnas.0306520101.
- Chuang, J. C., Raymond, P. A., 2001. Zebrafish genes *rx1* and *rx2* help define the region of forebrain that gives rise to retina. *Dev Biol* 231, 13-30, doi:10.1006/dbio.2000.0125.
- Cicero, S. A., Johnson, D., Reyntjens, S., Frase, S., Connell, S., Chow, L. M., Baker, S. J., Sorrentino, B. P., Dyer, M. A., 2009. Cells previously identified as retinal stem cells are pigmented ciliary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6685-90, doi:10.1073/pnas.0901596106.

- Clarke, L., Ballios, B. G., van der Kooy, D., 2012. Generation and clonal isolation of retinal stem cells from human embryonic stem cells. *Eur J Neurosci* 36, 1951-9, doi:10.1111/j.1460-9568.2012.08123.x.
- Close, J. L., Gumuscu, B., Reh, T. A., 2005. Retinal neurons regulate proliferation of postnatal progenitors and Muller glia in the rat retina via TGF beta signaling. *Development* 132, 3015-26, doi:10.1242/dev.01882.
- Close, J. L., Liu, J., Gumuscu, B., Reh, T. A., 2006. Epidermal growth factor receptor expression regulates proliferation in the postnatal rat retina. *Glia* 54, 94-104, doi:10.1002/glia.20361.
- Coles, B. L., Angenieux, B., Inoue, T., Del Rio-Tsonis, K., Spence, J. R., McInnes, R. R., Arsenijevic, Y., van der Kooy, D., 2004. Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15772-7, doi:10.1073/pnas.0401596101.
- Cooper, A. F., Yu, K. P., Brueckner, M., Brailey, L. L., Johnson, L., McGrath, J. M., Bale, A. E., 2005. Cardiac and CNS defects in a mouse with targeted disruption of suppressor of fused. *Development* 132, 4407-17, doi:10.1242/dev.02021.
- Crooks, J., Kolb, H., 1992. Localization of GABA, glycine, glutamate and tyrosine hydroxylase in the human retina. *J Comp Neurol* 315, 287-302, doi:10.1002/cne.903150305.
- Cueva, J. G., Haverkamp, S., Reimer, R. J., Edwards, R., Wassle, H., Brecha, N. C., 2002. Vesicular gamma-aminobutyric acid transporter expression in amacrine and horizontal cells. *J Comp Neurol* 445, 227-37.
- Cvekl, A., Wang, W. L., 2009. Retinoic acid signaling in mammalian eye development. *Exp Eye Res* 89, 280-91, doi:10.1016/j.exer.2009.04.012.
- Cwinn, M. A., Mazerolle, C., McNeill, B., Ringuette, R., Thurig, S., Hui, C. C., Wallace, V. A., 2011. Suppressor of fused is required to maintain the multipotency of neural progenitor cells in the retina. *J Neurosci* 31, 5169-80, doi:10.1523/JNEUROSCI.5495-10.2011.
- Dacey, D. M., 1994. Physiology, morphology and spatial densities of identified ganglion cell types in primate retina. *Ciba Found Symp* 184, 12-28; discussion 28-34, 63-70.
- Danesin, C., Peres, J. N., Johansson, M., Snowden, V., Cording, A., Papalopulu, N., Houart, C., 2009. Integration of telencephalic Wnt and hedgehog signaling center activities by Foxg1. *Dev Cell* 16, 576-87, doi:10.1016/j.devcel.2009.03.007.
- Daniels, M., Dhokia, V., Richard-Parpaillon, L., Ohnuma, S., 2004. Identification of Xenopus cyclin-dependent kinase inhibitors, p16Xic2 and p17Xic3. *Gene* 342, 41-7, doi:10.1016/j.gene.2004.07.038.
- Das, A. V., James, J., Zhao, X., Rahnenfuhrer, J., Ahmad, I., 2004. Identification of c-Kit receptor as a regulator of adult neural stem cells in the mammalian eye: interactions with Notch signaling. *Dev Biol* 273, 87-105, doi:10.1016/j.ydbio.2004.05.023.
- Das, A. V., James, J., Rahnenfuhrer, J., Thoreson, W. B., Bhattacharya, S., Zhao, X., Ahmad, I., 2005. Retinal properties and potential of the adult mammalian ciliary epithelium stem cells. *Vision Res* 45, 1653-66, doi:10.1016/j.visres.2004.12.017.
- Das, A. V., Mallya, K. B., Zhao, X., Ahmad, F., Bhattacharya, S., Thoreson, W. B., Hegde, G. V., Ahmad, I., 2006. Neural stem cell properties of Muller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling. *Dev Biol* 299, 283-302, doi:10.1016/j.ydbio.2006.07.029.
- Das, T., Payer, B., Cayouette, M., Harris, W. A., 2003. In vivo time-lapse imaging of cell divisions during neurogenesis in the developing zebrafish retina. *Neuron* 37, 597-609.
- de Melo, J., Qiu, X., Du, G., Cristante, L., Eisenstat, D. D., 2003. Dlx1, Dlx2, Pax6, Brn3b, and Chx10 homeobox gene expression defines the retinal ganglion and inner nuclear

- layers of the developing and adult mouse retina. *J Comp Neurol* 461, 187-204, doi:10.1002/cne.10674.
- de Melo, J., Du, G., Fonseca, M., Gillespie, L. A., Turk, W. J., Rubenstein, J. L., Eisenstat, D. D., 2005. *Dlx1* and *Dlx2* function is necessary for terminal differentiation and survival of late-born retinal ganglion cells in the developing mouse retina. *Development* 132, 311-22, doi:10.1242/dev.01560.
- Decembrini, S., Andreazzoli, M., Barsacchi, G., Cremisi, F., 2008. Dicer inactivation causes heterochronic retinogenesis in *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol* 52, 1099-103, doi:10.1387/ijdb.082646sd.
- Decembrini, S., Andreazzoli, M., Vignali, R., Barsacchi, G., Cremisi, F., 2006. Timing the generation of distinct retinal cells by homeobox proteins. *PLoS Biol* 4, e272, doi:10.1371/journal.pbio.0040272.
- Decembrini, S., Bressan, D., Vignali, R., Pitto, L., Mariotti, S., Rainaldi, G., Wang, X., Evangelista, M., Barsacchi, G., Cremisi, F., 2009. MicroRNAs couple cell fate and developmental timing in retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 21179-84, doi:10.1073/pnas.0909167106.
- Del Bene, F., 2011. Interkinetic nuclear migration: cell cycle on the move. *EMBO J* 30, 1676-7, doi:10.1038/emboj.2011.114.
- Del Bene, F., Wehman, A. M., Link, B. A., Baier, H., 2008. Regulation of neurogenesis by interkinetic nuclear migration through an apical-basal notch gradient. *Cell* 134, 1055-65, doi:10.1016/j.cell.2008.07.017.
- Del Debbio, C. B., Balasubramanian, S., Parameswaran, S., Chaudhuri, A., Qiu, F., Ahmad, I., 2010. Notch and Wnt signaling mediated rod photoreceptor regeneration by Muller cells in adult mammalian retina. *PLoS One* 5, e12425, doi:10.1371/journal.pone.0012425.
- Denayer, T., Locker, M., Borday, C., Deroo, T., Janssens, S., Hecht, A., van Roy, F., Perron, M., Vleminckx, K., 2008. Canonical Wnt signaling controls proliferation of retinal stem/progenitor cells in postembryonic *Xenopus* eyes. *Stem Cells* 26, 2063-74, doi:10.1634/stemcells.2007-0900.
- Ding, Q., Chen, H., Xie, X., Libby, R. T., Tian, N., Gan, L., 2009. *BARHL2* differentially regulates the development of retinal amacrine and ganglion neurons. *J Neurosci* 29, 3992-4003, doi:10.1523/JNEUROSCI.5237-08.2009.
- Djojoseburoto, M. W., Arsenijevic, Y., 2008. Retinal stem cells: promising candidates for retina transplantation. *Cell Tissue Res* 331, 347-57, doi:10.1007/s00441-007-0501-8.
- Dorsky, R. I., Rapaport, D. H., Harris, W. A., 1995. Xotch inhibits cell differentiation in the *Xenopus* retina. *Neuron* 14, 487-96.
- Dorsky, R. I., Chang, W. S., Rapaport, D. H., Harris, W. A., 1997. Regulation of neuronal diversity in the *Xenopus* retina by Delta signalling. *Nature* 385, 67-70, doi:10.1038/385067a0.
- Duester, G., 2009. Keeping an eye on retinoic acid signaling during eye development. *Chem Biol Interact* 178, 178-81, doi:10.1016/j.cbi.2008.09.004.
- Dullin, J. P., Locker, M., Robach, M., Henningfeld, K. A., Parain, K., Afelik, S., Pieler, T., Perron, M., 2007. *Ptf1a* triggers GABAergic neuronal cell fates in the retina. *BMC Dev Biol* 7, 110, doi:10.1186/1471-213X-7-110.
- Dyer, M. A., Cepko, C. L., 2001. The p57Kip2 cyclin kinase inhibitor is expressed by a restricted set of amacrine cells in the rodent retina. *J Comp Neurol* 429, 601-14.
- Dyer, M. A., Livesey, F. J., Cepko, C. L., Oliver, G., 2003. *Prox1* function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina. *Nat Genet* 34, 53-8, doi:10.1038/ng1144.

- Edqvist, P. H., Hallbook, F., 2004. Newborn horizontal cells migrate bi-directionally across the neuroepithelium during retinal development. *Development* 131, 1343-51, doi:10.1242/dev.01018.
- Eiraku, M., Adachi, T., Sasai, Y., 2012. Relaxation-expansion model for self-driven retinal morphogenesis: a hypothesis from the perspective of biosystems dynamics at the multi-cellular level. *Bioessays* 34, 17-25, doi:10.1002/bies.201100070.
- Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., Okuda, S., Sekiguchi, K., Adachi, T., Sasai, Y., 2011. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* 472, 51-6, doi:10.1038/nature09941.
- Eisenmann, D. M., 2005. Wnt signaling. *WormBook*, 1-17, doi:10.1895/wormbook.1.7.1.
- El Yakoubi, W., Borday, C., Hamdache, J., Parain, K., Tran, H. T., Vleminckx, K., Perron, M., Locker, M., 2012. Hes4 Controls Proliferative Properties of Neural Stem Cells During Retinal Ontogenesis. *Stem Cells*, doi:10.1002/stem.1231.
- Elliott, J., Jolicoeur, C., Ramamurthy, V., Cayouette, M., 2008. Ikaros confers early temporal competence to mouse retinal progenitor cells. *Neuron* 60, 26-39, doi:10.1016/j.neuron.2008.08.008.
- Elshatory, Y., Everhart, D., Deng, M., Xie, X., Barlow, R. B., Gan, L., 2007. Islet-1 controls the differentiation of retinal bipolar and cholinergic amacrine cells. *J Neurosci* 27, 12707-20, doi:10.1523/JNEUROSCI.3951-07.2007.
- Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R. A., Bulfone, A., Kowalczyk, T., Hevner, R. F., 2005. Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci* 25, 247-51, doi:10.1523/JNEUROSCI.2899-04.2005.
- Ezzeddine, Z. D., Yang, X., DeChiara, T., Yancopoulos, G., Cepko, C. L., 1997. Postmitotic cells fated to become rod photoreceptors can be respecified by CNTF treatment of the retina. *Development* 124, 1055-67.
- Farah, M. H., Olson, J. M., Sucic, H. B., Hume, R. I., Tapscott, S. J., Turner, D. L., 2000. Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development* 127, 693-702.
- Fausett, B. V., Goldman, D., 2006. A role for alpha1 tubulin-expressing Muller glia in regeneration of the injured zebrafish retina. *J Neurosci* 26, 6303-13, doi:10.1523/JNEUROSCI.0332-06.2006.
- Feldman, B., Gates, M. A., Egan, E. S., Dougan, S. T., Rennebeck, G., Sirotkin, H. I., Schier, A. F., Talbot, W. S., 1998. Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals. *Nature* 395, 181-5, doi:10.1038/26013.
- Feng, L., Eisenstat, D. D., Chiba, S., Ishizaki, Y., Gan, L., Shibasaki, K., 2011. Brn-3b inhibits generation of amacrine cells by binding to and negatively regulating DLX1/2 in developing retina. *Neuroscience* 195, 9-20, doi:10.1016/j.neuroscience.2011.08.015.
- Feng, L., Xie, X., Joshi, P. S., Yang, Z., Shibasaki, K., Chow, R. L., Gan, L., 2006. Requirement for Bhlhb5 in the specification of amacrine and cone bipolar subtypes in mouse retina. *Development* 133, 4815-25, doi:10.1242/dev.02664.
- Ferreiro, B., Skoglund, P., Bailey, A., Dorsky, R., Harris, W. A., 1993. XASH1, a Xenopus homolog of achaete-scute: a proneural gene in anterior regions of the vertebrate CNS. *Mech Dev* 40, 25-36.
- Festuccia, N., Osorno, R., Halbritter, F., Karwacki-Neisius, V., Navarro, P., Colby, D., Wong, F., Yates, A., Tomlinson, S. R., Chambers, I., 2012. Esrrb Is a Direct Nanog Target Gene that Can Substitute for Nanog Function in Pluripotent Cells. *Cell Stem Cell* 11, 477-90, doi:10.1016/j.stem.2012.08.002.

- Fischer, A. J., Reh, T. A., 2000. Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev Biol* 220, 197-210, doi:10.1006/dbio.2000.9640.
- Fischer, A. J., Reh, T. A., 2003. Growth factors induce neurogenesis in the ciliary body. *Dev Biol* 259, 225-40.
- Fischer, A. J., Stanke, J. J., Aloisio, G., Hoy, H., Stell, W. K., 2007. Heterogeneity of horizontal cells in the chicken retina. *J Comp Neurol* 500, 1154-71, doi:10.1002/cne.21236.
- Fode, C., Ma, Q., Casarosa, S., Ang, S. L., Anderson, D. J., Guillemot, F., 2000. A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev* 14, 67-80.
- Fuhrmann, S., 2010. Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle. *Curr Top Dev Biol* 93, 61-84, doi:10.1016/B978-0-12-385044-7.00003-5.
- Fuhrmann, S., Kirsch, M., Hofmann, H. D., 1995. Ciliary neurotrophic factor promotes chick photoreceptor development in vitro. *Development* 121, 2695-706.
- Fujitani, Y., Fujitani, S., Luo, H., Qiu, F., Burlison, J., Long, Q., Kawaguchi, Y., Edlund, H., MacDonald, R. J., Furukawa, T., Fujikado, T., Magnuson, M. A., Xiang, M., Wright, C. V., 2006. Ptf1a determines horizontal and amacrine cell fates during mouse retinal development. *Development* 133, 4439-50, doi:10.1242/dev.02598.
- Furuta, Y., Hogan, B. L., 1998. BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo. *Genes Dev* 12, 3764-75.
- Garcia-Bellido, A., 1979. Genetic Analysis of the Achaete-Scute System of DROSOPHILA MELANOGASTER. *Genetics* 91, 491-520.
- Genis-Galvez, J. M., Garcia-Lomas, V., Prada, F., Armengol, J. A., 1981. Developmental study of axon formation in the horizontal neurons of the retina of the chick embryo. *Anat Embryol (Berl)* 161, 319-27.
- Gestri, G., Carl, M., Appolloni, I., Wilson, S. W., Barsacchi, G., Andreazzoli, M., 2005. Six3 functions in anterior neural plate specification by promoting cell proliferation and inhibiting Bmp4 expression. *Development* 132, 2401-13, doi:10.1242/dev.01814.
- Ghysen, A., Dambly-Chaudiere, C., 1988. From DNA to form: the achaete-scute complex. *Genes Dev* 2, 495-501.
- Glise, B., Jones, D. L., Ingham, P. W., 2002. Notch and Wingless modulate the response of cells to Hedgehog signalling in the Drosophila wing. *Dev Biol* 248, 93-106.
- Godinho, L., Williams, P. R., Claassen, Y., Provost, E., Leach, S. D., Kamermans, M., Wong, R. O., 2007. Nonapical symmetric divisions underlie horizontal cell layer formation in the developing retina in vivo. *Neuron* 56, 597-603, doi:10.1016/j.neuron.2007.09.036.
- Gomes, F. L., Zhang, G., Carbonell, F., Correa, J. A., Harris, W. A., Simons, B. D., Cayouette, M., 2011. Reconstruction of rat retinal progenitor cell lineages in vitro reveals a surprising degree of stochasticity in cell fate decisions. *Development* 138, 227-35, doi:10.1242/dev.059683.
- Gonzalez-Hoyuela, M., Barbas, J. A., Rodriguez-Tebar, A., 2001. The autoregulation of retinal ganglion cell number. *Development* 128, 117-24.
- Goridis, C., Rohrer, H., 2002. Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nat Rev Neurosci* 3, 531-41, doi:10.1038/nrn871.
- Gowan, K., Helms, A. W., Hunsaker, T. L., Collisson, T., Ebert, P. J., Odom, R., Johnson, J. E., 2001. Crossinhibitory activities of Ngn1 and Math1 allow specification of distinct dorsal interneurons. *Neuron* 31, 219-32.
- Gritsman, K., Zhang, J., Cheng, S., Heckscher, E., Talbot, W. S., Schier, A. F., 1999. The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling. *Cell* 97, 121-32.

- Gu, P., Harwood, L. J., Zhang, X., Wylie, M., Curry, W. J., Cogliati, T., 2007. Isolation of retinal progenitor and stem cells from the porcine eye. *Mol Vis* 13, 1045-57.
- Gualdoni, S., Baron, M., Lakowski, J., Decembrini, S., Pearson, R. A., Ali, R. R., Sowden, J. C., 2011. Isolation and culture of adult ciliary epithelial cells, previously identified as retinal stem cells, and retinal progenitor cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* Chapter 1, Unit 1H 4, doi:10.1002/9780470151808.sc01h04s19.
- Guillemot, F., Joyner, A. L., 1993. Dynamic expression of the murine Achaete-Scute homologue Mash-1 in the developing nervous system. *Mech Dev* 42, 171-85.
- Guo, X., Wang, X. F., 2009. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res* 19, 71-88, doi:10.1038/cr.2008.302.
- Gurdon, J. B., Dyson, S., St Johnston, D., 1998. Cells' perception of position in a concentration gradient. *Cell* 95, 159-62.
- Hackler, L., Jr., Wan, J., Swaroop, A., Qian, J., Zack, D. J., 2010. MicroRNA profile of the developing mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 1823-31, doi:10.1167/iovs.09-4657.
- Harris, W. A., Messersmith, S. L., 1992. Two cellular inductions involved in photoreceptor determination in the *Xenopus* retina. *Neuron* 9, 357-72.
- Haruta, M., Kosaka, M., Kanegae, Y., Saito, I., Inoue, T., Kageyama, R., Nishida, A., Honda, Y., Takahashi, M., 2001. Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue. *Nat Neurosci* 4, 1163-4, doi:10.1038/nn762.
- Hatakeyama, J., Kageyama, R., 2004. Retinal cell fate determination and bHLH factors. *Semin Cell Dev Biol* 15, 83-9, doi:10.1016/j.semcdb.2003.09.005.
- Hatakeyama, J., Tomita, K., Inoue, T., Kageyama, R., 2001. Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type. *Development* 128, 1313-22.
- Hatakeyama, J., Bessho, Y., Katoh, K., Ookawara, S., Fujioka, M., Guillemot, F., Kageyama, R., 2004. Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development* 131, 5539-50, doi:10.1242/dev.01436.
- Hatta, K., Kimmel, C. B., Ho, R. K., Walker, C., 1991. The cyclops mutation blocks specification of the floor plate of the zebrafish central nervous system. *Nature* 350, 339-41, doi:10.1038/350339a0.
- Haverkamp, S., Wässle, H., 2000. Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol* 424, 1-23.
- He, J., Zhang, G., Almeida, A. D., Cayouette, M., Simons, B. D., Harris, W. A., 2012. How variable clones build an invariant retina. *Neuron* 75, 786-98, doi:10.1016/j.neuron.2012.06.033.
- Heinrich, C., Gascon, S., Masserdotti, G., Lepier, A., Sanchez, R., Simon-Ebert, T., Schroeder, T., Gotz, M., Berninger, B., 2011. Generation of subtype-specific neurons from postnatal astroglia of the mouse cerebral cortex. *Nat Protoc* 6, 214-28, doi:10.1038/nprot.2010.188.
- Helms, A. W., Johnson, J. E., 1998. Progenitors of dorsal commissural interneurons are defined by MATH1 expression. *Development* 125, 919-28.
- Helms, A. W., Battiste, J., Henke, R. M., Nakada, Y., Simplicio, N., Guillemot, F., Johnson, J. E., 2005. Sequential roles for Mash1 and Ngn2 in the generation of dorsal spinal cord interneurons. *Development* 132, 2709-19, doi:10.1242/dev.01859.
- Henrique, D., Hirsinger, E., Adam, J., Le Roux, I., Pourquie, O., Ish-Horowicz, D., Lewis, J., 1997. Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina. *Curr Biol* 7, 661-70.
- Henry, J. J., Grainger, R. M., 1990. Early tissue interactions leading to embryonic lens formation in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 141, 149-63.

- Hill, R. E., Favor, J., Hogan, B. L., Ton, C. C., Saunders, G. F., Hanson, I. M., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N. D., van Heyningen, V., 1991. Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* 354, 522-5, doi:10.1038/354522a0.
- Hirsch, M. R., Tiveron, M. C., Guillemot, F., Brunet, J. F., Goridis, C., 1998. Control of noradrenergic differentiation and Phox2a expression by MASH1 in the central and peripheral nervous system. *Development* 125, 599-608.
- Hollemann, T., Bellefroid, E., Pieler, T., 1998. The *Xenopus* homologue of the *Drosophila* gene *tailless* has a function in early eye development. *Development* 125, 2425-32.
- Holt, C. E., Bertsch, T. W., Ellis, H. M., Harris, W. A., 1988. Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth date. *Neuron* 1, 15-26.
- Howard, M. J., 2005. Mechanisms and perspectives on differentiation of autonomic neurons. *Dev Biol* 277, 271-86, doi:10.1016/j.ydbio.2004.09.034.
- Huang, S., Moody, S. A., 1993. The retinal fate of *Xenopus* cleavage stage progenitors is dependent upon blastomere position and competence: studies of normal and regulated clones. *J Neurosci* 13, 3193-210.
- Huff, V., 2011. Wilms' tumours: about tumour suppressor genes, an oncogene and a chameleon gene. *Nat Rev Cancer* 11, 111-21, doi:10.1038/nrc3002.
- Hufnagel, R. B., Le, T. T., Riesenberger, A. L., Brown, N. L., 2010. Neurog2 controls the leading edge of neurogenesis in the mammalian retina. *Dev Biol* 340, 490-503, doi:10.1016/j.ydbio.2010.02.002.
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K., Kageyama, R., 2010. Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J Neurosci* 30, 3489-98, doi:10.1523/JNEUROSCI.4987-09.2010.
- Ingram, W. J., Wicking, C. A., Grimmond, S. M., Forrest, A. R., Wainwright, B. J., 2002. Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells. *Oncogene* 21, 8196-205, doi:10.1038/sj.onc.1205975.
- Inoue, T., Hojo, M., Bessho, Y., Tano, Y., Lee, J. E., Kageyama, R., 2002. Math3 and NeuroD regulate amacrine cell fate specification in the retina. *Development* 129, 831-42.
- Inoue, T., Kagawa, T., Fukushima, M., Shimizu, T., Yoshinaga, Y., Takada, S., Tanihara, H., Taga, T., 2006. Activation of canonical Wnt pathway promotes proliferation of retinal stem cells derived from adult mouse ciliary margin. *Stem Cells* 24, 95-104, doi:10.1634/stemcells.2005-0124.
- Jacobson, M., 1968. Development of neuronal specificity in retinal ganglion cells of *Xenopus*. *Dev Biol* 17, 202-18.
- Jadhav, A. P., Cho, S. H., Cepko, C. L., 2006. Notch activity permits retinal cells to progress through multiple progenitor states and acquire a stem cell property. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18998-9003, doi:10.1073/pnas.0608155103.
- Jarman, A. P., Grau, Y., Jan, L. Y., Jan, Y. N., 1993. *atonal* is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Cell* 73, 1307-21.
- Jarman, A. P., Sun, Y., Jan, L. Y., Jan, Y. N., 1995. Role of the proneural gene, *atonal*, in formation of *Drosophila* chordotonal organs and photoreceptors. *Development* 121, 2019-30.
- Jasoni, C. L., Reh, T. A., 1996. Temporal and spatial pattern of MASH-1 expression in the developing rat retina demonstrates progenitor cell heterogeneity. *J Comp Neurol* 369, 319-27, doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19960527)369:2<319::AID-CNE11>3.0.CO;2-C.

- Jasoni, C. L., Walker, M. B., Morris, M. D., Reh, T. A., 1994. A chicken achaete-scute homolog (CASH-1) is expressed in a temporally and spatially discrete manner in the developing nervous system. *Development* 120, 769-83.
- Jellali, A., Stussi-Garaud, C., Gasnier, B., Rendon, A., Sahel, J. A., Dreyfus, H., Picaud, S., 2002. Cellular localization of the vesicular inhibitory amino acid transporter in the mouse and human retina. *J Comp Neurol* 449, 76-87, doi:10.1002/cne.10272.
- Jiang, H., Xiang, M., 2009. Subtype specification of GABAergic amacrine cells by the orphan nuclear receptor Nr4a2/Nurr1. *J Neurosci* 29, 10449-59, doi:10.1523/JNEUROSCI.3048-09.2009.
- Jo, A. Y., Park, C. H., Aizawa, S., Lee, S. H., 2007. Contrasting and brain region-specific roles of neurogenin2 and mash1 in GABAergic neuron differentiation in vitro. *Exp Cell Res* 313, 4066-81, doi:10.1016/j.yexcr.2007.08.026.
- Johnson, J. E., Birren, S. J., Saito, T., Anderson, D. J., 1992. DNA binding and transcriptional regulatory activity of mammalian achaete-scute homologous (MASH) proteins revealed by interaction with a muscle-specific enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3596-600.
- Joksimovic, M., Yun, B. A., Kittappa, R., Anderegg, A. M., Chang, W. W., Taketo, M. M., McKay, R. D., Awatramani, R. B., 2009. Wnt antagonism of Shh facilitates midbrain floor plate neurogenesis. *Nat Neurosci* 12, 125-31, doi:10.1038/nn.2243.
- Jusuf, P. R., Harris, W. A., 2009. Ptf1a is expressed transiently in all types of amacrine cells in the embryonic zebrafish retina. *Neural Dev* 4, 34, doi:10.1186/1749-8104-4-34.
- Jusuf, P. R., Almeida, A. D., Randlett, O., Joubin, K., Poggi, L., Harris, W. A., 2011. Origin and determination of inhibitory cell lineages in the vertebrate retina. *J Neurosci* 31, 2549-62, doi:10.1523/JNEUROSCI.4713-10.2011.
- Jusuf, P. R., Albadri, S., Paolini, A., Currie, P. D., Argenton, F., Higashijima, S., Harris, W. A., Poggi, L., 2012. Biasing Amacrine Subtypes in the Atoh7 Lineage through Expression of Barhl2. *J Neurosci* 32, 13929-44, doi:10.1523/JNEUROSCI.2073-12.2012.
- Kanekar, S., Perron, M., Dorsky, R., Harris, W. A., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Vetter, M. L., 1997. Xath5 participates in a network of bHLH genes in the developing *Xenopus* retina. *Neuron* 19, 981-94.
- Kaplan, E., Shapley, R. M., Purpura, K., 1988. Color and luminance contrast as tools for probing the primate retina. *Neurosci Res Suppl* 8, S151-65.
- Karali, M., Peluso, I., Gennarino, V. A., Bilio, M., Verde, R., Lago, G., Dolle, P., Banfi, S., 2010. miRNeye: a microRNA expression atlas of the mouse eye. *BMC Genomics* 11, 715, doi:10.1186/1471-2164-11-715.
- Karl, M. O., Reh, T. A., 2010. Regenerative medicine for retinal diseases: activating endogenous repair mechanisms. *Trends Mol Med* 16, 193-202, doi:10.1016/j.molmed.2010.02.003.
- Karl, M. O., Valtink, M., Bednarz, J., Engelmann, K., 2007. Cell culture conditions affect RPE phagocytic function. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245, 981-91, doi:10.1007/s00417-006-0451-y.
- Katoh, K., Omori, Y., Onishi, A., Sato, S., Kondo, M., Furukawa, T., 2010. Blimp1 suppresses Chx10 expression in differentiating retinal photoreceptor precursors to ensure proper photoreceptor development. *J Neurosci* 30, 6515-26, doi:10.1523/JNEUROSCI.0771-10.2010.
- Kay, J. N., Finger-Baier, K. C., Roeser, T., Staub, W., Baier, H., 2001. Retinal ganglion cell genesis requires lakritz, a Zebrafish atonal Homolog. *Neuron* 30, 725-36.
- Kelber, A., Balkenius, A., Warrant, E. J., 2003. Colour vision in diurnal and nocturnal hawkmoths. *Integr Comp Biol* 43, 571-9, doi:10.1093/icb/43.4.571.

- Kerppola, T. K., 2006. Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat Protoc* 1, 1278-86, doi:10.1038/nprot.2006.201.
- Kim, W. J., Rivera, M. N., Coffman, E. J., Haber, D. A., 2012. The WTX tumor suppressor enhances p53 acetylation by CBP/p300. *Mol Cell* 45, 587-97, doi:10.1016/j.molcel.2011.12.025.
- Klassen, H. J., Ng, T. F., Kurimoto, Y., Kirov, I., Shatos, M., Coffey, P., Young, M. J., 2004. Multipotent retinal progenitors express developmental markers, differentiate into retinal neurons, and preserve light-mediated behavior. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 4167-73, doi:10.1167/iovs.04-0511.
- Kobayashi, T., Yasuda, K., Araki, M., 2010. Coordinated regulation of dorsal bone morphogenetic protein 4 and ventral Sonic hedgehog signaling specifies the dorso-ventral polarity in the optic vesicle and governs ocular morphogenesis through fibroblast growth factor 8 upregulation. *Dev Growth Differ* 52, 351-63, doi:10.1111/j.1440-169X.2010.01170.x.
- Kolb, H., 1997. Amacrine cells of the mammalian retina: neurocircuitry and functional roles. *Eye (Lond)* 11 (Pt 6), 904-23, doi:10.1038/eye.1997.230.
- Kolb, H., Dekorver, L., 1991. Midget ganglion cells of the parafovea of the human retina: a study by electron microscopy and serial section reconstructions. *J Comp Neurol* 303, 617-36, doi:10.1002/cne.903030408.
- Kolb, H., Zhang, L., Dekorver, L., Cuenca, N., 2002. A new look at calretinin-immunoreactive amacrine cell types in the monkey retina. *J Comp Neurol* 453, 168-84, doi:10.1002/cne.10405.
- Kubo, F., Nakagawa, S., 2008. Wnt signaling in retinal stem cells and regeneration. *Dev Growth Differ* 50, 245-51, doi:10.1111/j.1440-169X.2008.01033.x.
- Kubo, F., Takeichi, M., Nakagawa, S., 2003. Wnt2b controls retinal cell differentiation at the ciliary marginal zone. *Development* 130, 587-98.
- Kubota, R., Hokoc, J. N., Moshiri, A., McGuire, C., Reh, T. A., 2002. A comparative study of neurogenesis in the retinal ciliary marginal zone of homeothermic vertebrates. *Brain Res Dev Brain Res* 134, 31-41.
- Lagutin, O. V., Zhu, C. C., Kobayashi, D., Topczewski, J., Shimamura, K., Puellas, L., Russell, H. R., McKinnon, P. J., Solnica-Krezel, L., Oliver, G., 2003. Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. *Genes Dev* 17, 368-79, doi:10.1101/gad.1059403.
- Lai, E. C., 2004. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* 131, 965-73, doi:10.1242/dev.01074.
- Lamba, D., Karl, M., Reh, T., 2008. Neural regeneration and cell replacement: a view from the eye. *Cell Stem Cell* 2, 538-49, doi:10.1016/j.stem.2008.05.002.
- Lang, B., Zhao, L., Cai, L., McKie, L., Forrester, J. V., McCaig, C. D., Jackson, I. J., Shen, S., 2010. GABAergic amacrine cells and visual function are reduced in PAC1 transgenic mice. *Neuropharmacology* 58, 215-25, doi:10.1016/j.neuropharm.2009.07.003.
- Lawrence, P. A., Struhl, G., 1996. Morphogens, compartments, and pattern: lessons from drosophila? *Cell* 85, 951-61.
- Le, T. T., Wroblewski, E., Patel, S., Riesenber, A. N., Brown, N. L., 2006. Math5 is required for both early retinal neuron differentiation and cell cycle progression. *Dev Biol* 295, 764-78, doi:10.1016/j.ydbio.2006.03.055.
- Lee, J. S., Ishimoto, A., Yanagawa, S., 1999. Characterization of mouse dishevelled (Dvl) proteins in Wnt/Wingless signaling pathway. *J Biol Chem* 274, 21464-70.

- Lee, M., Vasioukhin, V., 2008. Cell polarity and cancer--cell and tissue polarity as a non-canonical tumor suppressor. *J Cell Sci* 121, 1141-50, doi:10.1242/jcs.016634.
- Lelievre, E. C., Lek, M., Boije, H., Houille-Vernes, L., Brajeul, V., Slembrouck, A., Roger, J. E., Sahel, J. A., Matter, J. M., Sennlaub, F., Hallbook, F., Goureau, O., Guillonnet, X., 2011. Ptf1a/Rbpj complex inhibits ganglion cell fate and drives the specification of all horizontal cell subtypes in the chick retina. *Dev Biol* 358, 296-308, doi:10.1016/j.ydbio.2011.07.033.
- Li, C. M., Yan, R. T., Wang, S. Z., 2002. Chick homeobox gene cbx and its role in retinal development. *Mech Dev* 116, 85-94.
- Li, H., Tierney, C., Wen, L., Wu, J. Y., Rao, Y., 1997. A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the prechordal plate. *Development* 124, 603-15.
- Li, S., Mo, Z., Yang, X., Price, S. M., Shen, M. M., Xiang, M., 2004. Foxn4 controls the genesis of amacrine and horizontal cells by retinal progenitors. *Neuron* 43, 795-807, doi:10.1016/j.neuron.2004.08.041.
- Livesey, F. J., Cepko, C. L., 2001. Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nat Rev Neurosci* 2, 109-18, doi:10.1038/35053522.
- Lo, L. C., Johnson, J. E., Wuenschell, C. W., Saito, T., Anderson, D. J., 1991. Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells. *Genes Dev* 5, 1524-37.
- Locker, M., Borday, C., Perron, M., 2009. Stemness or not stemness? Current status and perspectives of adult retinal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 4, 118-30.
- Locker, M., Agathocleous, M., Amato, M. A., Parain, K., Harris, W. A., Perron, M., 2006. Hedgehog signaling and the retina: insights into the mechanisms controlling the proliferative properties of neural precursors. *Genes Dev* 20, 3036-48, doi:10.1101/gad.391106.
- Logan, C. Y., Nusse, R., 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 781-810, doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126.
- Loosli, F., Winkler, S., Wittbrodt, J., 1999. Six3 overexpression initiates the formation of ectopic retina. *Genes Dev* 13, 649-54.
- Loosli, F., Staub, W., Finger-Baier, K. C., Ober, E. A., Verkade, H., Wittbrodt, J., Baier, H., 2003. Loss of eyes in zebrafish caused by mutation of chokh/rx3. *EMBO Rep* 4, 894-9, doi:10.1038/sj.embor.embor919.
- Loosli, F., Winkler, S., Burgtorf, C., Wurnbach, E., Ansorge, W., Henrich, T., Grabher, C., Arendt, D., Carl, M., Krone, A., Grzebisz, E., Wittbrodt, J., 2001. Medaka eyeless is the key factor linking retinal determination and eye growth. *Development* 128, 4035-44.
- Lopez-Aranda, M. F., Acevedo, M. J., Carballo, F. J., Gutierrez, A., Khan, Z. U., 2006. Localization of the GoLoco motif carrier regulator of G-protein signalling 12 and 14 proteins in monkey and rat brain. *Eur J Neurosci* 23, 2971-82, doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04838.x.
- Lu, A., Ng, L., Ma, M., Kefas, B., Davies, T. F., Hernandez, A., Chan, C. C., Forrest, D., 2009. Retarded developmental expression and patterning of retinal cone opsins in hypothyroid mice. *Endocrinology* 150, 1536-44, doi:10.1210/en.2008-1092.
- Luo, H., Jin, K., Xie, Z., Qiu, F., Li, S., Zou, M., Cai, L., Hozumi, K., Shima, D. T., Xiang, M., 2012. Forkhead box N4 (Foxn4) activates Dll4-Notch signaling to suppress photoreceptor cell fates of early retinal progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E553-62, doi:10.1073/pnas.1115767109.
- M., H. K. A. L. M. P., 2007. xenopus primary neurogenesis and retinogenesis. *Functional development and embryology* 1, 26-36.

- Ma, Q., Kintner, C., Anderson, D. J., 1996. Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87, 43-52.
- Ma, Q., Sommer, L., Cserjesi, P., Anderson, D. J., 1997. Mash1 and neurogenin1 expression patterns define complementary domains of neuroepithelium in the developing CNS and are correlated with regions expressing notch ligands. *J Neurosci* 17, 3644-52.
- MacLaren, R. E., Pearson, R. A., 2007. Stem cell therapy and the retina. *Eye (Lond)* 21, 1352-9, doi:10.1038/sj.eye.6702842.
- MacNeil, A., Pearson, R. A., MacLaren, R. E., Smith, A. J., Sowden, J. C., Ali, R. R., 2007. Comparative analysis of progenitor cells isolated from the iris, pars plana, and ciliary body of the adult porcine eye. *Stem Cells* 25, 2430-8, doi:10.1634/stemcells.2007-0035.
- Mao, W., Yan, R. T., Wang, S. Z., 2009. Proneural gene *ash1* promotes amacrine cell production in the chick retina. *Dev Neurobiol* 69, 88-104, doi:10.1002/dneu.20693.
- Margueron, R., Reinberg, D., 2011. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469, 343-9, doi:10.1038/nature09784.
- Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F., Gruss, P., 2001. Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* 105, 43-55.
- Masland, R. H., 2001. Neuronal diversity in the retina. *Curr Opin Neurobiol* 11, 431-6.
- Masland, R. H., 2011. Cell populations of the retina: the Proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 4581-91, doi:10.1167/iovs.10-7083.
- Mason, J. M., Morrison, D. J., Bassit, B., Dimri, M., Band, H., Licht, J. D., Gross, I., 2004. Tyrosine phosphorylation of Sprouty proteins regulates their ability to inhibit growth factor signaling: a dual feedback loop. *Mol Biol Cell* 15, 2176-88, doi:10.1091/mbc.E03-07-0503.
- Massari, M. E., Murre, C., 2000. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* 20, 429-40.
- Mathers, P. H., Grinberg, A., Mahon, K. A., Jamrich, M., 1997. The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development. *Nature* 387, 603-7, doi:10.1038/42475.
- Mayer, E. J., Carter, D. A., Ren, Y., Hughes, E. H., Rice, C. M., Halfpenny, C. A., Scolding, N. J., Dick, A. D., 2005. Neural progenitor cells from postmortem adult human retina. *Br J Ophthalmol* 89, 102-6, doi:10.1136/bjo.2004.057687.
- Merbs, S. L., Khan, M. A., Hackler, L., Jr., Oliver, V. F., Wan, J., Qian, J., Zack, D. J., 2012. Cell-specific DNA methylation patterns of retina-specific genes. *PLoS One* 7, e32602, doi:10.1371/journal.pone.0032602.
- Mic, F. A., Molotkov, A., Molotkova, N., Duester, G., 2004. Raldh2 expression in optic vesicle generates a retinoic acid signal needed for invagination of retina during optic cup formation. *Dev Dyn* 231, 270-7, doi:10.1002/dvdy.20128.
- Mikkola, I., Bruun, J. A., Holm, T., Johansen, T., 2001. Superactivation of Pax6-mediated transactivation from paired domain-binding sites by dna-independent recruitment of different homeodomain proteins. *J Biol Chem* 276, 4109-18, doi:10.1074/jbc.M008882200.
- Min, T. H., Kriebel, M., Hou, S., Pera, E. M., 2011. The dual regulator Sufu integrates Hedgehog and Wnt signals in the early *Xenopus* embryo. *Dev Biol* 358, 262-76, doi:10.1016/j.ydbio.2011.07.035.
- Mizuguchi, R., Kriks, S., Cordes, R., Gossler, A., Ma, Q., Goulding, M., 2006. *Ascl1* and *Gsh1/2* control inhibitory and excitatory cell fate in spinal sensory interneurons. *Nat Neurosci* 9, 770-8, doi:10.1038/nn1706.

- Mo, Z., Li, S., Yang, X., Xiang, M., 2004. Role of the Barhl2 homeobox gene in the specification of glycinergic amacrine cells. *Development* 131, 1607-18, doi:10.1242/dev.01071.
- Moe, M. C., Kolberg, R. S., Sandberg, C., Vik-Mo, E., Olstorn, H., Varghese, M., Langmoen, I. A., Nicolaissen, B., 2009. A comparison of epithelial and neural properties in progenitor cells derived from the adult human ciliary body and brain. *Exp Eye Res* 88, 30-8, doi:10.1016/j.exer.2008.09.020.
- Monnin, J., Morand-Villeneuve, N., Michel, G., Hicks, D., Versaux-Botteri, C., 2007. Production of neurospheres from mammalian Muller cells in culture. *Neurosci Lett* 421, 22-6, doi:10.1016/j.neulet.2007.04.073.
- Moore, K. B., Schneider, M. L., Vetter, M. L., 2002. Posttranslational mechanisms control the timing of bHLH function and regulate retinal cell fate. *Neuron* 34, 183-95.
- Morrow, E. M., Belliveau, M. J., Cepko, C. L., 1998. Two phases of rod photoreceptor differentiation during rat retinal development. *J Neurosci* 18, 3738-48.
- Morrow, E. M., Furukawa, T., Lee, J. E., Cepko, C. L., 1999. NeuroD regulates multiple functions in the developing neural retina in rodent. *Development* 126, 23-36.
- Moshiri, A., Reh, T. A., 2004. Persistent progenitors at the retinal margin of ptc^{+/-} mice. *J Neurosci* 24, 229-37, doi:10.1523/JNEUROSCI.2980-03.2004.
- Moshiri, A., McGuire, C. R., Reh, T. A., 2005. Sonic hedgehog regulates proliferation of the retinal ciliary marginal zone in posthatch chicks. *Dev Dyn* 233, 66-75, doi:10.1002/dvdy.20299.
- Mu, Y., Lee, S. W., Gage, F. H., 2010. Signaling in adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 20, 416-23, doi:10.1016/j.conb.2010.04.010.
- Muller, F., Albert, S., Blader, P., Fischer, N., Hallonet, M., Strahle, U., 2000. Direct action of the nodal-related signal cyclops in induction of sonic hedgehog in the ventral midline of the CNS. *Development* 127, 3889-97.
- Murciano, A., Zamora, J., Lopez-Sanchez, J., Frade, J. M., 2002. Interkinetic nuclear movement may provide spatial clues to the regulation of neurogenesis. *Mol Cell Neurosci* 21, 285-300.
- Murre, C., McCaw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Cabrera, C. V., Buskin, J. N., Hauschka, S. D., Lassar, A. B., et al., 1989. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-44.
- Nakada, Y., Hunsaker, T. L., Henke, R. M., Johnson, J. E., 2004. Distinct domains within Mash1 and Math1 are required for function in neuronal differentiation versus neuronal cell-type specification. *Development* 131, 1319-30, doi:10.1242/dev.01008.
- Nakano, T., Ando, S., Takata, N., Kawada, M., Muguruma, K., Sekiguchi, K., Saito, K., Yonemura, S., Eiraku, M., Sasai, Y., 2012. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell* 10, 771-85, doi:10.1016/j.stem.2012.05.009.
- Nakhai, H., Sel, S., Favor, J., Mendoza-Torres, L., Paulsen, F., Duncker, G. I., Schmid, R. M., 2007. Ptfla is essential for the differentiation of GABAergic and glycinergic amacrine cells and horizontal cells in the mouse retina. *Development* 134, 1151-60, doi:10.1242/dev.02781.
- Nasevicius, A., Ekker, S. C., 2000. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet* 26, 216-20, doi:10.1038/79951.
- Nelson, B. R., Hartman, B. H., Georgi, S. A., Lan, M. S., Reh, T. A., 2007. Transient inactivation of Notch signaling synchronizes differentiation of neural progenitor cells. *Dev Biol* 304, 479-98, doi:10.1016/j.ydbio.2007.01.001.

- Nelson, B. R., Hartman, B. H., Ray, C. A., Hayashi, T., Bermingham-McDonogh, O., Reh, T. A., 2009. Acheate-scute like 1 (Ascl1) is required for normal delta-like (Dll) gene expression and notch signaling during retinal development. *Dev Dyn* 238, 2163-78, doi:10.1002/dvdy.21848.
- Neophytou, C., Vernallis, A. B., Smith, A., Raff, M. C., 1997. Muller-cell-derived leukaemia inhibitory factor arrests rod photoreceptor differentiation at a postmitotic pre-rod stage of development. *Development* 124, 2345-54.
- Ng, L., Hurley, J. B., Dierks, B., Srinivas, M., Salto, C., Vennstrom, B., Reh, T. A., Forrest, D., 2001. A thyroid hormone receptor that is required for the development of green cone photoreceptors. *Nat Genet* 27, 94-8, doi:10.1038/83829.
- Nieto, M., Schuurmans, C., Britz, O., Guillemot, F., 2001. Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* 29, 401-13.
- Nishida, A., Furukawa, A., Koike, C., Tano, Y., Aizawa, S., Matsuo, I., Furukawa, T., 2003. Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat Neurosci* 6, 1255-63, doi:10.1038/nn1155.
- Nomura, M., Li, E., 1998. Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development. *Nature* 393, 786-90, doi:10.1038/31693.
- Ochocinska, M. J., Hitchcock, P. F., 2009. NeuroD regulates proliferation of photoreceptor progenitors in the retina of the zebrafish. *Mech Dev* 126, 128-41, doi:10.1016/j.mod.2008.11.009.
- Ohnuma, S., Harris, W. A., 2003. Neurogenesis and the cell cycle. *Neuron* 40, 199-208.
- Ohnuma, S., Philpott, A., Wang, K., Holt, C. E., Harris, W. A., 1999. p27Xic1, a Cdk inhibitor, promotes the determination of glial cells in *Xenopus* retina. *Cell* 99, 499-510.
- Ohnuma, S., Hopper, S., Wang, K. C., Philpott, A., Harris, W. A., 2002. Co-ordinating retinal histogenesis: early cell cycle exit enhances early cell fate determination in the *Xenopus* retina. *Development* 129, 2435-46.
- Ohsawa, R., Kageyama, R., 2008. Regulation of retinal cell fate specification by multiple transcription factors. *Brain Res* 1192, 90-8, doi:10.1016/j.brainres.2007.04.014.
- Okada, Y., Ichikawa, M., Ishii, K., Hara, H., 2004. Effects of topically instilled bunazosin hydrochloride and other ocular hypotensive drugs on endothelin-1-induced constriction in rabbit retinal arteries. *Jpn J Ophthalmol* 48, 465-9, doi:10.1007/s10384-004-0108-5.
- Oliver, G., Gruss, P., 1997. Current views on eye development. *Trends Neurosci* 20, 415-21.
- Oliver, G., Loosli, F., Koster, R., Wittbrodt, J., Gruss, P., 1996. Ectopic lens induction in fish in response to the murine homeobox gene Six3. *Mech Dev* 60, 233-9.
- Ooto, S., Akagi, T., Kageyama, R., Akita, J., Mandai, M., Honda, Y., Takahashi, M., 2004. Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13654-9, doi:10.1073/pnas.0402129101.
- Osakada, F., Takahashi, M., 2007. [Stem cell therapy for the central nervous system]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 52, 470-7.
- Osakada, F., Ikeda, H., Sasai, Y., Takahashi, M., 2009. Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into retinal cells. *Nat Protoc* 4, 811-24, doi:10.1038/nprot.2009.51.
- Park, C. H., Kang, J. S., Kim, J. S., Chung, S., Koh, J. Y., Yoon, E. H., Jo, A. Y., Chang, M. Y., Koh, H. C., Hwang, S., Suh-Kim, H., Lee, Y. S., Kim, K. S., Lee, S. H., 2006. Differential actions of the proneural genes encoding Mash1 and neurogenins in Nurr1-induced dopamine neuron differentiation. *J Cell Sci* 119, 2310-20, doi:10.1242/jcs.02955.
- Parlier, D., Ariza, A., Christulia, F., Genco, F., Vanhomwegen, J., Kricha, S., Souopgui, J., Bellefroid, E. J., 2008. *Xenopus* zinc finger transcription factor IA1 (Insm1)

- expression marks anteroventral noradrenergic neuron progenitors in *Xenopus* embryos. *Dev Dyn* 237, 2147-57, doi:10.1002/dvdy.21621.
- Parras, C. M., Schuurmans, C., Scardigli, R., Kim, J., Anderson, D. J., Guillemot, F., 2002. Divergent functions of the proneural genes *Mash1* and *Ngn2* in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Dev* 16, 324-38, doi:10.1101/gad.940902.
- Patel, A., McFarlane, S., 2000. Overexpression of FGF-2 alters cell fate specification in the developing retina of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 222, 170-80, doi:10.1006/dbio.2000.9695.
- Pattyn, A., Simplicio, N., van Doorninck, J. H., Goridis, C., Guillemot, F., Brunet, J. F., 2004. *Ascl1/Mash1* is required for the development of central serotonergic neurons. *Nat Neurosci* 7, 589-95, doi:10.1038/nn1247.
- Pellegrini, G., De Luca, M., Arsenijevic, Y., 2007. Towards therapeutic application of ocular stem cells. *Semin Cell Dev Biol* 18, 805-18, doi:10.1016/j.semcdb.2007.09.011.
- Peltopuro, P., Kala, K., Partanen, J., 2010. Distinct requirements for *Ascl1* in subpopulations of midbrain GABAergic neurons. *Dev Biol* 343, 63-70, doi:10.1016/j.ydbio.2010.04.015.
- Perron, M., 2011. [3D revolution of stem cells: building a retina in vitro]. *Med Sci (Paris)* 27, 709-12, doi:10.1051/medsci/2011278012.
- Perron, M., Harris, W. A., 2000a. Determination of vertebrate retinal progenitor cell fate by the Notch pathway and basic helix-loop-helix transcription factors. *Cell Mol Life Sci* 57, 215-23.
- Perron, M., Harris, W. A., 2000b. Retinal stem cells in vertebrates. *Bioessays* 22, 685-8, doi:10.1002/1521-1878(200008)22:8<685::AID-BIES1>3.0.CO;2-C.
- Perron, M., Kanekar, S., Vetter, M. L., Harris, W. A., 1998. The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the *Xenopus* eye. *Dev Biol* 199, 185-200, doi:10.1006/dbio.1998.8939.
- Perron, M., Opdecamp, K., Butler, K., Harris, W. A., Bellefroid, E. J., 1999. *X-ngnr-1* and *Xath3* promote ectopic expression of sensory neuron markers in the neurula ectoderm and have distinct inducing properties in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14996-5001.
- Perron, M., Boy, S., Amato, M. A., Viczian, A., Koebernick, K., Pieler, T., Harris, W. A., 2003. A novel function for Hedgehog signalling in retinal pigment epithelium differentiation. *Development* 130, 1565-77.
- Perry, V. H., 1979. The ganglion cell layer of the retina of the rat: a Golgi study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 204, 363-75.
- Pessoa, C. N., Santiago, L. A., Santiago, D. A., Machado, D. S., Rocha, F. A., Ventura, D. F., Hokoc, J. N., Pazos-Moura, C. C., Wondisford, F. E., Gardino, P. F., Ortega-Carvalho, T. M., 2008. Thyroid hormone action is required for normal cone opsin expression during mouse retinal development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 2039-45, doi:10.1167/iovs.07-0908.
- Petryniak, M. A., Potter, G. B., Rowitch, D. H., Rubenstein, J. L., 2007. *Dlx1* and *Dlx2* control neuronal versus oligodendroglial cell fate acquisition in the developing forebrain. *Neuron* 55, 417-33, doi:10.1016/j.neuron.2007.06.036.
- Pezeron, G., Lambert, G., Dickmeis, T., Strahle, U., Rosa, F. M., Mourrain, P., 2008. *Rasl11b* knock down in zebrafish suppresses one-eyed-pinhead mutant phenotype. *PLoS One* 3, e1434, doi:10.1371/journal.pone.0001434.
- Poche, R. A., Reese, B. E., 2009. Retinal horizontal cells: challenging paradigms of neural development and cancer biology. *Development* 136, 2141-51, doi:10.1242/dev.033175.

- Poggi, L., Zolessi, F. R., Harris, W. A., 2005. Time-lapse analysis of retinal differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 17, 676-81, doi:10.1016/j.ceb.2005.09.004.
- Poggi, L., Vottari, T., Barsacchi, G., Wittbrodt, J., Vignali, R., 2004. The homeobox gene *Xbh1* cooperates with proneural genes to specify ganglion cell fate within the *Xenopus* neural retina. *Development* 131, 2305-15, doi:10.1242/dev.01099.
- Poitras, L., Ghanem, N., Hatch, G., Ekker, M., 2007. The proneural determinant *MASH1* regulates forebrain *Dlx1/2* expression through the *I12b* intergenic enhancer. *Development* 134, 1755-65, doi:10.1242/dev.02845.
- Porter, F. D., Drago, J., Xu, Y., Cheema, S. S., Wassif, C., Huang, S. P., Lee, E., Grinberg, A., Massalas, J. S., Bodine, D., Alt, F., Westphal, H., 1997. *Lhx2*, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development. *Development* 124, 2935-44.
- Powell, L. M., Jarman, A. P., 2008. Context dependence of proneural bHLH proteins. *Curr Opin Genet Dev* 18, 411-7, doi:10.1016/j.gde.2008.07.012.
- Prasov, L., Glaser, T., 2012. Dynamic expression of ganglion cell markers in retinal progenitors during the terminal cell cycle. *Mol Cell Neurosci* 50, 160-8, doi:10.1016/j.mcn.2012.05.002.
- Qiu, F., Jiang, H., Xiang, M., 2008. A comprehensive negative regulatory program controlled by *Brn3b* to ensure ganglion cell specification from multipotential retinal precursors. *J Neurosci* 28, 3392-403, doi:10.1523/JNEUROSCI.0043-08.2008.
- Ramachandran, I., Thavathiru, E., Ramalingam, S., Natarajan, G., Mills, W. K., Benbrook, D. M., Zuna, R., Lightfoot, S., Reis, A., Anant, S., Queimado, L., 2012. Wnt inhibitory factor 1 induces apoptosis and inhibits cervical cancer growth, invasion and angiogenesis in vivo. *Oncogene* 31, 2725-37, doi:10.1038/onc.2011.455.
- Rapicavoli, N. A., Poth, E. M., Zhu, H., Blackshaw, S., 2011. The long noncoding RNA *Six3OS* acts in trans to regulate retinal development by modulating *Six3* activity. *Neural Dev* 6, 32, doi:10.1186/1749-8104-6-32.
- Raymond, P. A., Barthel, L. K., Bernardos, R. L., Perkowski, J. J., 2006. Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC Dev Biol* 6, 36, doi:10.1186/1471-213X-6-36.
- Reh, T. A., Kljavin, I. J., 1989. Age of differentiation determines rat retinal germinal cell phenotype: induction of differentiation by dissociation. *J Neurosci* 9, 4179-89.
- Reh, T. A., Levine, E. M., 1998. Multipotential stem cells and progenitors in the vertebrate retina. *J Neurobiol* 36, 206-20.
- Riesenberg, A. N., Le, T. T., Willardsen, M. I., Blackburn, D. C., Vetter, M. L., Brown, N. L., 2009. *Pax6* regulation of *Math5* during mouse retinal neurogenesis. *Genesis* 47, 175-87, doi:10.1002/dvg.20479.
- Roberts, M. R., Srinivas, M., Forrest, D., Morreale de Escobar, G., Reh, T. A., 2006. Making the gradient: thyroid hormone regulates cone opsin expression in the developing mouse retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6218-23, doi:10.1073/pnas.0509981103.
- Rompani, S. B., Cepko, C. L., 2008. Retinal progenitor cells can produce restricted subsets of horizontal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 192-7, doi:10.1073/pnas.0709979104.
- Rosen, L. S., Ashurst, H. L., Chap, L., 2010. Targeting signal transduction pathways in metastatic breast cancer: a comprehensive review. *Oncologist* 15, 216-35, doi:10.1634/theoncologist.2009-0145.
- Roybon, L., Mastracci, T. L., Ribeiro, D., Sussel, L., Brundin, P., Li, J. Y., 2010. GABAergic differentiation induced by *Mash1* is compromised by the bHLH proteins *Neurogenin2*, *NeuroD1*, and *NeuroD2*. *Cereb Cortex* 20, 1234-44, doi:10.1093/cercor/bhp187.

- Schulz-Key, S., Hofmann, H. D., Beisenherz-Huss, C., Barbisch, C., Kirsch, M., 2002. Ciliary neurotrophic factor as a transient negative regulator of rod development in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 3099-108.
- Schuermans, C., Armant, O., Nieto, M., Stenman, J. M., Britz, O., Klenin, N., Brown, C., Langevin, L. M., Seibt, J., Tang, H., Cunningham, J. M., Dyck, R., Walsh, C., Campbell, K., Polleux, F., Guillemot, F., 2004. Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways. *EMBO J* 23, 2892-902, doi:10.1038/sj.emboj.7600278.
- Schwartz, S. D., Hubschman, J. P., Heilwell, G., Franco-Cardenas, V., Pan, C. K., Ostrick, R. M., Mickunas, E., Gay, R., Klimanskaya, I., Lanza, R., 2012. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet* 379, 713-20, doi:10.1016/S0140-6736(12)60028-2.
- Schwarz, M., Cecconi, F., Bernier, G., Andrejewski, N., Kammandel, B., Wagner, M., Gruss, P., 2000. Spatial specification of mammalian eye territories by reciprocal transcriptional repression of Pax2 and Pax6. *Development* 127, 4325-34.
- Seaberg, R. M., van der Kooy, D., 2003. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci* 26, 125-31, doi:10.1016/S0166-2236(03)00031-6.
- Shigdar, S., Lin, J., Li, Y., Yang, C. J., Wei, M., Zhush, Y., Liu, H., Duan, W., 2012. Cancer stem cell targeting: the next generation of cancer therapy and molecular imaging. *Ther Deliv* 3, 227-44.
- Smallwood, S. A., Kelsey, G., 2012. Genome-wide analysis of DNA methylation in low cell numbers by reduced representation bisulfite sequencing. *Methods Mol Biol* 925, 187-97, doi:10.1007/978-1-62703-011-3_12.
- Sommer, L., Ma, Q., Anderson, D. J., 1996. neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Mol Cell Neurosci* 8, 221-41, doi:10.1006/mcne.1996.0060.
- Stenman, J., Yu, R. T., Evans, R. M., Campbell, K., 2003. Tlx and Pax6 co-operate genetically to establish the pallio-subpallial boundary in the embryonic mouse telencephalon. *Development* 130, 1113-22.
- Strauss, O., 1995. The Retinal Pigment Epithelium. In: Kolb, H., et al., (Eds.), *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, Salt Lake City (UT).
- Stuhmer, T., Anderson, S. A., Ekker, M., Rubenstein, J. L., 2002. Ectopic expression of the Dlx genes induces glutamic acid decarboxylase and Dlx expression. *Development* 129, 245-52.
- Suga, A., Taira, M., Nakagawa, S., 2009. LIM family transcription factors regulate the subtype-specific morphogenesis of retinal horizontal cells at post-migratory stages. *Dev Biol* 330, 318-28, doi:10.1016/j.ydbio.2009.04.002.
- Svard, J., Heby-Henricson, K., Persson-Lek, M., Rozell, B., Lauth, M., Bergstrom, A., Ericson, J., Toftgard, R., Teglund, S., 2006. Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway. *Dev Cell* 10, 187-97, doi:10.1016/j.devcel.2005.12.013.
- Swaroop, A., Kim, D., Forrest, D., 2010. Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci* 11, 563-76, doi:10.1038/nrn2880.
- Tang, M., Villaescusa, J. C., Luo, S. X., Guitarte, C., Lei, S., Miyamoto, Y., Taketo, M. M., Arenas, E., Huang, E. J., 2010. Interactions of Wnt/beta-catenin signaling and sonic hedgehog regulate the neurogenesis of ventral midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 30, 9280-91, doi:10.1523/JNEUROSCI.0860-10.2010.

- Tarui, T., Takahashi, T., Nowakowski, R. S., Hayes, N. L., Bhide, P. G., Caviness, V. S., 2005. Overexpression of p27 Kip 1, probability of cell cycle exit, and laminar destination of neocortical neurons. *Cereb Cortex* 15, 1343-55, doi:10.1093/cercor/bhi017.
- Taylor, M. D., Liu, L., Raffel, C., Hui, C. C., Mainprize, T. G., Zhang, X., Agatep, R., Chiappa, S., Gao, L., Lowrance, A., Hao, A., Goldstein, A. M., Stavrou, T., Scherer, S. W., Dura, W. T., Wainwright, B., Squire, J. A., Rutka, J. T., Hogg, D., 2002. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat Genet* 31, 306-10, doi:10.1038/ng916.
- Tessman, P. A., Suarez, J. I., 2002. Influence of early printmaking on the development of neuroanatomy and neurology. *Arch Neurol* 59, 1964-9.
- Tomita, K., Nakanishi, S., Guillemot, F., Kageyama, R., 1996. Mash1 promotes neuronal differentiation in the retina. *Genes Cells* 1, 765-74.
- Tomita, K., Moriyoshi, K., Nakanishi, S., Guillemot, F., Kageyama, R., 2000. Mammalian achaete-scute and atonal homologs regulate neuronal versus glial fate determination in the central nervous system. *EMBO J* 19, 5460-72, doi:10.1093/emboj/19.20.5460.
- Tonoli, H., Barrett, J. C., 2005. CD82 metastasis suppressor gene: a potential target for new therapeutics? *Trends Mol Med* 11, 563-70, doi:10.1016/j.molmed.2005.10.002.
- Tornqvist, K., Yang, X. L., Dowling, J. E., 1988. Modulation of cone horizontal cell activity in the teleost fish retina. III. Effects of prolonged darkness and dopamine on electrical coupling between horizontal cells. *J Neurosci* 8, 2279-88.
- Trimarchi, J. M., Stadler, M. B., Cepko, C. L., 2008. Individual retinal progenitor cells display extensive heterogeneity of gene expression. *PLoS One* 3, e1588, doi:10.1371/journal.pone.0001588.
- Tropepe, V., Coles, B. L., Chiasson, B. J., Horsford, D. J., Elia, A. J., McInnes, R. R., van der Kooy, D., 2000. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 287, 2032-6.
- Tucker, P., Laemle, L., Munson, A., Kanekar, S., Oliver, E. R., Brown, N., Schlecht, H., Vetter, M., Glaser, T., 2001. The eyeless mouse mutation (ey1) removes an alternative start codon from the Rx/rax homeobox gene. *Genesis* 31, 43-53.
- Turner, D. L., Cepko, C. L., 1987. A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 328, 131-6, doi:10.1038/328131a0.
- Turner, D. L., Snyder, E. Y., Cepko, C. L., 1990. Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron* 4, 833-45.
- Ulloa, F., Marti, E., 2010. Wnt won the war: antagonistic role of Wnt over Shh controls dorso-ventral patterning of the vertebrate neural tube. *Dev Dyn* 239, 69-76, doi:10.1002/dvdy.22058.
- van Amerongen, R., Nusse, R., 2009. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 136, 3205-14, doi:10.1242/dev.033910.
- van den Brink, G. R., Bleuming, S. A., Hardwick, J. C., Schepman, B. L., Offerhaus, G. J., Keller, J. J., Nielsen, C., Gaffield, W., van Deventer, S. J., Roberts, D. J., Peppelenbosch, M. P., 2004. Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. *Nat Genet* 36, 277-82, doi:10.1038/ng1304.
- van Dop, W. A., Uhmman, A., Wijgerde, M., Sleddens-Linkels, E., Heijmans, J., Offerhaus, G. J., van den Bergh Weerman, M. A., Boeckxstaens, G. E., Hommes, D. W., Hardwick, J. C., Hahn, H., van den Brink, G. R., 2009. Depletion of the colonic epithelial precursor cell compartment upon conditional activation of the hedgehog pathway. *Gastroenterology* 136, 2195-2203 e1-7, doi:10.1053/j.gastro.2009.02.068.
- Varelas, X., Miller, B. W., Sopko, R., Song, S., Gregorieff, A., Fellouse, F. A., Sakuma, R., Pawson, T., Hunziker, W., McNeill, H., Wrana, J. L., Attisano, L., 2010. The Hippo

- pathway regulates Wnt/beta-catenin signaling. *Dev Cell* 18, 579-91, doi:10.1016/j.devcel.2010.03.007.
- Varjosalo, M., Li, S. P., Taipale, J., 2006. Divergence of hedgehog signal transduction mechanism between *Drosophila* and mammals. *Dev Cell* 10, 177-86, doi:10.1016/j.devcel.2005.12.014.
- Vazquez-Chona, F., Song, B. K., Geisert, E. E., Jr., 2004. Temporal changes in gene expression after injury in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 2737-46, doi:10.1167/iovs.03-1047.
- Vernon, A. E., Devine, C., Philpott, A., 2003. The cdk inhibitor p27Xic1 is required for differentiation of primary neurones in *Xenopus*. *Development* 130, 85-92.
- Vetter, M. L., Brown, N. L., 2001. The role of basic helix-loop-helix genes in vertebrate retinogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 12, 491-8, doi:10.1006/scdb.2001.0273.
- Viczian, A. S., Solessio, E. C., Lyou, Y., Zuber, M. E., 2009. Generation of functional eyes from pluripotent cells. *PLoS Biol* 7, e1000174, doi:10.1371/journal.pbio.1000174.
- Vitorino, M., Jusuf, P. R., Maurus, D., Kimura, Y., Higashijima, S., Harris, W. A., 2009. *Vsx2* in the zebrafish retina: restricted lineages through derepression. *Neural Dev* 4, 14, doi:10.1186/1749-8104-4-14.
- Wagner, H. J., Wagner, E., 1988. Amacrine cells in the retina of a teleost fish, the roach (*Rutilus rutilus*): a Golgi study on differentiation and layering. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 321, 263-324.
- Waid, D. K., McLoon, S. C., 1998. Ganglion cells influence the fate of dividing retinal cells in culture. *Development* 125, 1059-66.
- Wan, J., Zheng, H., Xiao, H. L., She, Z. J., Zhou, G. M., 2007. Sonic hedgehog promotes stem-cell potential of Muller glia in the mammalian retina. *Biochem Biophys Res Commun* 363, 347-54, doi:10.1016/j.bbrc.2007.08.178.
- Wang, J. C., Harris, W. A., 2005. The role of combinational coding by homeodomain and bHLH transcription factors in retinal cell fate specification. *Dev Biol* 285, 101-15, doi:10.1016/j.ydbio.2005.05.041.
- Wang, L., Tsai, C. C., 2008. Atrophin proteins: an overview of a new class of nuclear receptor corepressors. *Nucl Recept Signal* 6, e009, doi:10.1621/nrs.06009.
- Wang, S. W., Kim, B. S., Ding, K., Wang, H., Sun, D., Johnson, R. L., Klein, W. H., Gan, L., 2001. Requirement for *math5* in the development of retinal ganglion cells. *Genes Dev* 15, 24-9.
- Wang, Y., Dakubo, G. D., Thurig, S., Mazerolle, C. J., Wallace, V. A., 2005. Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog locally controls proliferation and the timing of RGC development in the embryonic mouse retina. *Development* 132, 5103-13, doi:10.1242/dev.02096.
- Wassle, H., 2004. Parallel processing in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci* 5, 747-57, doi:10.1038/nrn1497.
- Watanabe, M., Rodieck, R. W., 1989. Parasol and midget ganglion cells of the primate retina. *J Comp Neurol* 289, 434-54, doi:10.1002/cne.902890308.
- Wawersik, S., Maas, R. L., 2000. Vertebrate eye development as modeled in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 9, 917-25.
- Wetts, R., Fraser, S. E., 1988. Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina. *Science* 239, 1142-5.
- Willard, M. D., Willard, F. S., Li, X., Cappell, S. D., Snider, W. D., Siderovski, D. P., 2007. Selective role for RGS12 as a Ras/Raf/MEK scaffold in nerve growth factor-mediated differentiation. *EMBO J* 26, 2029-40, doi:10.1038/sj.emboj.7601659.
- Wilson, S. W., Rubenstein, J. L., 2000. Induction and dorsoventral patterning of the telencephalon. *Neuron* 28, 641-51.

- Witkovsky, P., 2000. Photoreceptor classes and transmission at the photoreceptor synapse in the retina of the clawed frog, *Xenopus laevis*. *Microsc Res Tech* 50, 338-46, doi:10.1002/1097-0029(20000901)50:5<338::AID-JEMT3>3.0.CO;2-I.
- Xie, H. Q., Adler, R., 2000. Green cone opsin and rhodopsin regulation by CNTF and staurosporine in cultured chick photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 4317-23.
- Xu, S., Sunderland, M. E., Coles, B. L., Kam, A., Holowacz, T., Ashery-Padan, R., Marquardt, T., McInnes, R. R., van der Kooy, D., 2007. The proliferation and expansion of retinal stem cells require functional Pax6. *Dev Biol* 304, 713-21, doi:10.1016/j.ydbio.2007.01.021.
- Yamaguchi, M., Tonou-Fujimori, N., Komori, A., Maeda, R., Nojima, Y., Li, H., Okamoto, H., Masai, I., 2005. Histone deacetylase 1 regulates retinal neurogenesis in zebrafish by suppressing Wnt and Notch signaling pathways. *Development* 132, 3027-43, doi:10.1242/dev.01881.
- Yang, X. L., Wu, S. M., 2004. Signal transmission from cones to amacrine cells in dark- and light-adapted tiger salamander retina. *Brain Res* 1029, 155-61, doi:10.1016/j.brainres.2004.09.032.
- Yang, Z., Ding, K., Pan, L., Deng, M., Gan, L., 2003. Math5 determines the competence state of retinal ganglion cell progenitors. *Dev Biol* 264, 240-54.
- Yokota, Y., Mori, S., Narumi, O., Kitajima, K., 2001. In vivo function of a differentiation inhibitor, Id2. *IUBMB Life* 51, 207-14, doi:10.1080/152165401753311744.
- Young, R. W., 1985. Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat Rec* 212, 199-205, doi:10.1002/ar.1092120215.
- Yu, R. T., Chiang, M. Y., Tanabe, T., Kobayashi, M., Yasuda, K., Evans, R. M., Umesono, K., 2000. The orphan nuclear receptor Tlx regulates Pax2 and is essential for vision. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2621-5, doi:10.1073/pnas.050566897.
- Yu, T., Yaguchi, Y., Echevarria, D., Martinez, S., Basson, M. A., 2011. Sprouty genes prevent excessive FGF signalling in multiple cell types throughout development of the cerebellum. *Development* 138, 2957-68, doi:10.1242/dev.063784.
- Yuan, K., Li, N., Huo, Y., Yan, F., Yang, Y., Ward, T., Jin, C., Yao, X., 2009. Recruitment of separase to mitotic chromosomes is regulated by Aurora B. *Cell Cycle* 8, 1433-43.
- Yun, S., Saijoh, Y., Hirokawa, K. E., Kopinke, D., Murtaugh, L. C., Monuki, E. S., Levine, E. M., 2009. Lhx2 links the intrinsic and extrinsic factors that control optic cup formation. *Development* 136, 3895-906, doi:10.1242/dev.041202.
- Zhang, J., Talbot, W. S., Schier, A. F., 1998. Positional cloning identifies zebrafish one-eyed pinhead as a permissive EGF-related ligand required during gastrulation. *Cell* 92, 241-51.
- Zhang, L., El-Hodiri, H. M., Ma, H. F., Zhang, X., Servetnick, M., Wensel, T. G., Jamrich, M., 2003. Targeted expression of the dominant-negative FGFR4a in the eye using Xrx1A regulatory sequences interferes with normal retinal development. *Development* 130, 4177-86.
- Zhang, X. M., Yang, X. J., 2001. Regulation of retinal ganglion cell production by Sonic hedgehog. *Development* 128, 943-57.
- Zhao, S., Hung, F. C., Colvin, J. S., White, A., Dai, W., Lovicu, F. J., Ornitz, D. M., Overbeek, P. A., 2001. Patterning the optic neuroepithelium by FGF signaling and Ras activation. *Development* 128, 5051-60.
- Zhou, X. Z., Lu, K. P., 2001. The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell* 107, 347-59.

- Zordan, P., Croci, L., Hawkes, R., Consalez, G. G., 2008. Comparative analysis of proneural gene expression in the embryonic cerebellum. *Dev Dyn* 237, 1726-35, doi:10.1002/dvdy.21571.
- Zuber, M. E., 2010. Eye field specification in *Xenopus laevis*. *Curr Top Dev Biol* 93, 29-60, doi:10.1016/B978-0-12-385044-7.00002-3.
- Zuber, M. E., Perron, M., Philpott, A., Bang, A., Harris, W. A., 1999. Giant eyes in *Xenopus laevis* by overexpression of *XOptx2*. *Cell* 98, 341-52.
- Zuber, M. E., Gestri, G., Viczian, A. S., Barsacchi, G., Harris, W. A., 2003. Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development* 130, 5155-67, doi:10.1242/dev.00723.

Annexes

Annexe 1

*A decade of mammalian retinal stem cell
research*

A decade of mammalian retinal stem cell research

M. LOCKER, W. EL YAKOUBI, N. MAZURIER, J.-P. DULLIN, M. PERRON

CNRS UPR 3294 Neurobiology and Development, Institut de Neurobiologie "A. Fessard",
Université Paris Sud, ORSAY Cedex, France

ABSTRACT

Ten years have now passed since the discovery of quiescent neural stem cells within the mammalian retina. Beside the fascinating aspect of stem cell biology in basic science, these cells have also offered hope for the treatment of incurable retinal diseases. The field has thus rapidly evolved, fluctuating between major advances and recurring doubts. In this review, we will retrace the efforts of scientists during this last decade to characterize these cells and to use them in regenerative medicine. We will also highlight advances made in animal models capable of stem cell-mediated retinal regeneration.

Key words

Retina • Adult retinal stem cells • Ciliary body • Ciliary marginal zone

Discovery of quiescent retinal stem cells in mammals

In mammals, the two functional components of the retina, the inner neural retina and the outer retinal-pigmented epithelium (RPE) achieve their development by the early postnatal period and no additional retinal cells are produced thereafter. Based on this feature and the absence of tissular repair following damage, the adult mammalian eye was thus considered to be devoid of retinal stem cells (RSCs). In contrast, the retina of many fish and amphibians continues to grow throughout the animal life and is able to regenerate (Reh and Constantine-Paton, 1983). New cells are indeed produced from a pool of multipotent and self-renewing stem cells, located in a circumferential region, known as the ciliary marginal zone (CMZ; Wetts and Fraser, 1988; Wetts et al., 1989). Comparative studies in different vertebrates have led to the idea that the CMZ became progressively reduced as species evolved from fish

to mammals (Perron and Harris, 2000). Hatched chicken retinas still contain a zone of proliferating cells at the peripheral margin but its activity is only transient and its neurogenic potential more limited compared to that of fish and amphibians (Fischer and Reh, 2000). A few mitotically active cells resembling the CMZ were also identified in postnatal marsupials but never to date in other mammals. In 2000, however, a hypothesis was raised that the mammalian ciliary body (CB) might nevertheless harbor retinal stem cells. The CB is located between the neural retina and the iris (Fig. 1). It contains the ciliary muscles, which are involved in the eye accommodation process by changing the shape of the lens. Additionally, it is composed of a ciliary epithelium (CE) responsible for the production of the aqueous humor and consisting of two cell layers, an inner non-pigmented epithelium, and an outer-pigmented epithelium (Fig. 1). Although this CE does not contain any neurons, it shares a common embryonic origin with the optic cup. Indeed, the non-pigmented

layer of the CE derives, like the neural retina, from the inner layer of the optic cup, and the pigmented epithelium is ontologically related to the RPE. In lower vertebrates, the CE is adjacent to the CMZ, which separates it from the neural retina (Fig. 1). Two independent teams demonstrated in 2000 that single pigmented cells from the CE of mouse retina could clonally proliferate *in vitro* to form sphere colonies (Tropepe et al., 2000; Ahmad et al., 2000). A small number of pigmented cells from these primary colonies repeatedly generated new secondary spheres indicating that the initial colony-forming cell had the capacity to self-renew. In addition, exposed to differentiation conditions, the colony forming cells were shown to express genes found in rod photoreceptors, bipolar neurons, and Müller glia, suggesting their multipotentiality. The idea was thus born that the CB of the adult mammalian eye harbors a population of retinal stem cells, yet in a mitotically quiescent state *in vivo*. A few years later, these cells were identified in the CB of other mammalian species, including human (Coles et al., 2004; Mayer et al., 2005; MacNeil et al., 2007; Xu et al., 2007a; Gu et al., 2007).

A second unexpected source of potential retinal stem cells was subsequently discovered within the iris. Similarly to the CE, the iris epithelium does not normally generate neurons but derives from the optic cup. Haruta and colleagues in 2001 revealed its ability to express neuronal markers *in vitro* uncovering a remarkable plasticity (Haruta et al., 2001). Additionally, a recent work proposed that the iris epithelium might harbor discrete heterogeneous populations of cells endowed with innate neural stem/progenitor properties, including the ability to differentiate into retinal specific neurons (Asami et al., 2007; MacNeil et al., 2007). Müller glial cells might also represent a source of potential stem cells within the neural retina of the mammalian eye, although their case will not be reviewed here (see for reviews Lamba et al., 2008; Locker et al., 2009; Karl and Reh, 2010).

The discovery of CB-derived stem cells generated much excitement and paved the way towards several research directions aimed at characterizing their *in vitro* properties, molecular signature, *in vivo* ability for tissue repair and potential for cell-transplantation medicine. We thus provide below an overview of the main advances made in the field during these past ten years.

***In vitro* proliferative properties of adult retinal stem cells**

In contrast to diverse other neural stem cells (NSCs), iris- and CB-derived cells display the unusual property to proliferate as neurospheres in serum free media without exogenous growth factor addition (Tropepe et al., 2000). However, supplementation with EGF and/or FGF2 or bFGF (the most widely used growth factors in current RSC culture methods) significantly increases the number of neurospheres formed from dissociated cells (Tropepe et al., 2000; Coles et al., 2004; Asami et al., 2007; Gu et al., 2007). Although significant, the proliferation potential of CB-derived cells appears somehow limited, especially when compared with brain-derived stem cells (Yanagi et al., 2006; Moe et al., 2009) or retinal progenitor cells from neonatal retinas (Klassen et al., 2004b; Merhi-Soussi et al., 2006). First, no more than 0.2% to 2% of CB-derived cells seem to be endowed with proliferative capacities (Tropepe et al., 2000; Das et al., 2004; Xu et al., 2007a). Second, their self-renewal and proliferation rates appear to gradually decrease with subsequent passages (Coles et al., 2004; Xu et al., 2007a). Whether this corresponds to an intrinsic limitation or yet undetermined experimental causes remains to be established. Notably, the proliferative capacity of porcine, rodent and human RSCs maintained in monolayer was significantly increased compared to suspension sphere culture conditions (Klassen et al., 2004a; Coles et al., 2004; Gu et al., 2007; MacNeil et al., 2007). Besides, self renewal, monitored through the extent of secondary sphere formation, could be significantly enhanced following stimulation with exogenous molecules such as Wnt3a (Inoue et al., 2006), SCF (Stem Cell Factor; Das et al., 2004) and more recently, PEDF (Pigment Epithelium Derived Factor; De Marzo et al., 2010). An important issue in stem cell expansion is to ensure that cells exposed to mitogens for several generations do not undergo genetic changes. In a recent study, Djojotubroto et al. pointed out that CB-derived cell lines rapidly accumulated severe chromosomal aberrations upon prolonged cultivation and demonstrated tumorigenicity (Djojotubroto et al., 2009). Similar analyses are now needed to define whether such a genetic instability is also inherent in adult human cells, which would limit their clinical use.

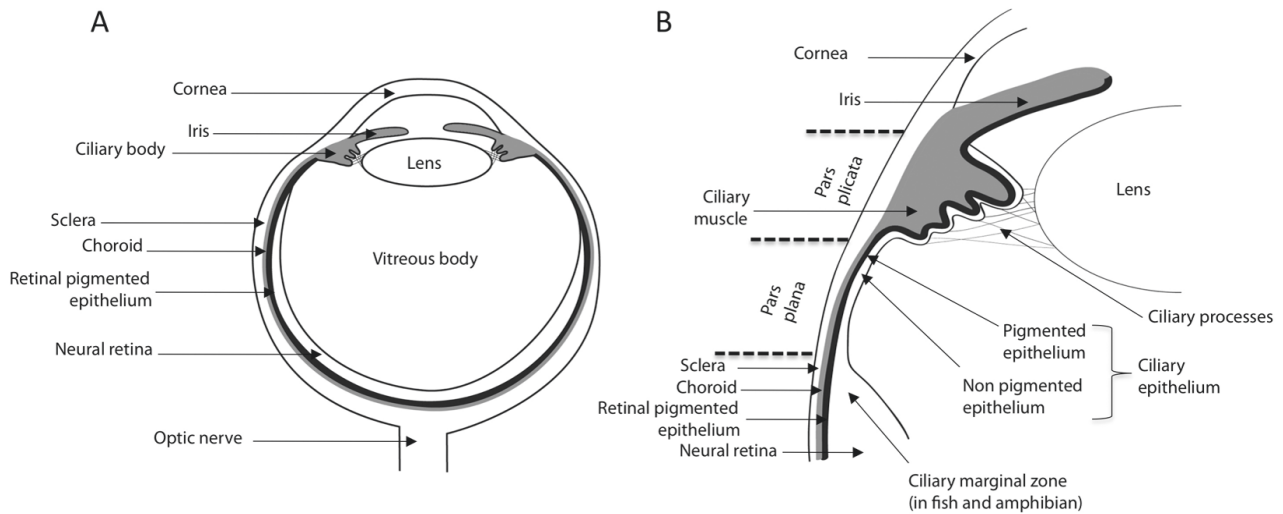


Fig. 1. - A. Schematic diagram of an adult vertebrate eye transverse section. B. Magnification of the region containing the ciliary body (CB). The CB can be subdivided in two zones: a flat region called *pars plana* and a folded one called *pars plicata*. The ciliary epithelium (CE) includes an outer layer which is pigmented and continuous with the retinal pigmented epithelium, and an inner layer, which is non pigmented and continuous with the neural retina. Quiescent retinal stem cells are located in the pigmented layer of the ciliary epithelium. In fish and amphibians continuous neurogenesis in the adulthood occurs in the ciliary marginal zone (CMZ).

Molecular signature of adult retinal stem cells

Numerous studies supported the presence of cells with retinal progenitor identity within CB spheres, based on the expression of several eye field transcription factors that have been shown to be critical for retinal development (Zuber et al., 2003; Viczian et al., 2009). Among them are the paired-class transcription factors, *Rx*, *Chx10* and *Pax6*, the homeodomain-containing transcription factors, *Six6* and *Six3* or the LIM homeodomain factor, *Lhx2* (Tropepe et al., 2000; Ahmad et al., 2004; Das et al., 2005; Lord-Grignon et al., 2006; Xu et al., 2007a; Gu et al., 2007). Moreover, comparative transcriptional profiling revealed that CB-derived cells and embryonic retinal progenitors share 80% identity of their expressed genes (Ahmad et al., 2004; Das et al., 2005). In addition, *Pax6*, *Rx*, *Chx10* and *Six3* were found to be expressed within the CE of adult rodents, monkeys and humans consistent with the presence of retinal stem/progenitor cells *in vivo* (Das et al., 2005; Lord-Grignon et al., 2006; Xu et al., 2007b; Martinez-Navarrete et al., 2008). It was recently shown that *Pax6* expression level in the murine CE was significantly higher in the pigmented

outer layer, where putative retinal stem cells might reside, than in the non pigmented inner layer (Xu et al., 2007b). Additionally, Xu et al. demonstrated that only cells with the highest expression level of this gene could generate neurospheres, suggesting that *Pax6* represents a hallmark for RSCs within the CB. Besides, *Pax6* might be functionally required for the maintenance of these cells *in vivo*, since its conditional knockout results in impaired neurosphere formation from the adult CB (Xu et al., 2007b).

In vitro photoreceptor differentiation from retinal stem cells

A challenge in RSC biology is to direct undifferentiated cells towards the desired neuronal fate. Most efforts during the last decade have been made in setting up protocols driving *in vitro* photoreceptor differentiation. Spontaneous and consistent differentiation of CB- or iris-derived cells towards the photoreceptor lineage might be limited or at least infrequent. Indeed, although some groups reported rhodopsin expression (Asami et al., 2007; Tropepe et al., 2000; Coles et al., 2004), other failed to find photoreceptor markers (MacNeil et al., 2007; Cicero et al., 2009;

Gualdoni et al., 2010). Noticeably, Gualdoni et al. recently re-assessed the potential of RSCs for generating photoreceptors. By using the *Nrl.gfp* transgenic line that expresses GFP in developing and mature rod photoreceptors, they demonstrated that the rod differentiation program was not activated in CB-derived cells upon culture conditions previously reported to promote a photoreceptor fate Gualdoni et al., 2010). The authors thus concluded that these cells would require reprogramming to be useful as a source of new photoreceptors. In line with this, genetic manipulation of factors involved in photoreceptor fate and survival proved to be an efficient strategy to enhance *in vitro* photoreceptor differentiation. Overexpression of *Crx* or *Otx2* by retroviral infection of CB- or iris-derived cells, yielded high percentages of cells expressing rhodopsin as well as additional components of the phototransduction cascade (Haruta et al., 2001; Akagi et al., 2004; Akagi et al., 2005). In a recent study, Inoue et al. further improved photoreceptor differentiation from human RSCs by coexpressing OTX2 and CRX while blocking the function of CHX10 (Inoue et al., 2010). Promisingly, both murine and primate photoreceptor-like cells obtained from iris tissue were shown to respond to light stimulation and to integrate into explanted developing retinas in co-culture experiments (Akagi et al., 2005). The *in vitro* functionality of photoreceptors induced from mouse and human RSCs was recently demonstrated as well (Jomary and Jones, 2008; Jomary et al., 2010). Interestingly, attempts to induce photoreceptor differentiation through similar strategies of gene delivery in either mesencephalic or hippocampal NSCs (Haruta et al., 2001; Akagi et al., 2004), or corneal cells (Jomary et al., 2010) failed or resulted in incomplete acquisition of photoreceptor characteristics. These results strongly suggest the permissive action of intrinsic factors expressed in eye-derived stem cells.

Controversial stemness of retinal stem cells

The fact that pigmented cells from the CE can clonally generate spheres and express retinal neuron markers was considered as a strong argument for the existence of *in vivo* latent retinal stem cells in the CB (Tropepe et al., 2000). However, it was

recently proposed that pigmented CE cells have the unexpected ability to form spheres made up of proliferating differentiated pigmented cells. Moe et al. found that neurospheres formed clonally from dissociated CE cells retain epithelial features (Moe et al., 2009). This was further demonstrated by the group of Dyer who reported that all cells in the CB-derived spheres, including those proliferating or expressing neural markers, were pigmented and displayed morphological characteristics of normal pigmented CE cells (Cicero et al., 2009). These data led the authors to claim that none of these cells are, nor become stem cells. The mammalian CE would thus not contain actual RSCs, but would instead harbor a population of differentiated cells that can proliferate, clonally expand, self-renew and express some neuronal markers, while retaining features of pigmented epithelial cells.

Do these experiments definitely rule out the existence of rare latent stem cells within the CB? It might be premature to state on that point because some data, such as the fact that sphere-initiating cells can be prospectively enriched from a cellular subpopulation expressing high *Pax6* levels, rather favor the stem cell hypothesis (Xu et al., 2007b; Inoue et al., 2010).

In addition, Kohno et al. proposed that sphere formation and neural differentiation of CB-derived cells can arise through distinct pathways according to the culture method (Kohno et al., 2006). In clonal assays, spheres would be formed by the expansion of rare neural stem-like cells. In contrast, when CB-derived cells are propagated in high-density culture, they also form spheres but in a proliferation-independent manner, by aggregating to each other and/or incorporating adjacent adherent cells. In these conditions, cells within spheres progressively lose their epithelial markers and gain the expression of neural ones. The authors thus proposed that such CB sphere formation constitute a reprogramming system allowing neural differentiation from epithelia-like cells. This might not be surprising as several studies highlighted the ability of CE, neural retina and RPE to transdifferentiate into each other (Fischer and Reh, 2001; Lee et al., 2001; Del Rio-Tsonis and Tsonis, 2003; Rowan et al., 2004; Liu et al., 2007). In addition, it has been known for more than half a century that the eye pigmented cells are capable of acting as a source of retinal regeneration in embryonic chicks and

adult amphibians (Moshiri et al., 2004; Araki, 2007; Yoshii et al., 2007; Vergara and Del Rio-Tsonis, 2009). Thus, although the adult mammalian RPE has lost the property to transdifferentiate, some cells within the ciliary body may have retained this plasticity and the consecutive ability to generate neuronal cells in response to growth factors.

In any case, whether these cells should be called “stem cells” might only be a semantic issue, or even not, if we consider that the stemness concept has to evolve along with recent discoveries of the plasticity and unexpected potential of more and more cell populations (reviewed in Seaberg and van der Kooy, 2003). Some investigators indeed suggest that the term “stem cell” should be used to refer to a biological function that can be inherent to or induced in many distinct cell types, even differentiated cells. For now, the existence of a cell population able to display some retinal stem cell properties *in vitro* may be nonetheless valuable in the context of cellular transplantation trials or for alternative therapeutic strategies that would consist in mobilizing them *in vivo* for retinal repair.

Transplantation trials using retinal stem cells

Retinal degenerative diseases, including age-related macular degeneration and retinitis pigmentosa, are the major causes of human blindness in the world. In these neurodegenerative diseases, photoreceptor cells are damaged or lost, which leads to subsequent visual impairment. Given the social and economic impact of vision loss, tremendous efforts have been put in trying to replace photoreceptors by cellular therapy. Researchers have put great expectations in stem cells as a source for cell transplantation, since they may have the migratory capacity and cellular plasticity needed to integrate and differentiate in the diseased retina. Attempts to replace photoreceptor loss have been made using embryonic, fetal or post-natal retinal stem/progenitor cells. These studies have generated variable data but as a whole demonstrated rather limited levels of integration and/or photoreceptor differentiation (reviewed in MacLaren and Pearson, 2007; Pellegrini et al., 2007; Djojosubroto and Arsenijevic, 2008; Lamba et al., 2008). An alternative strategy has been to examine

the potential of adult neural stem cells. Transplanted rat hippocampal stem cells exhibited widespread incorporation into the host retina, but failed to properly differentiate into retinal cell types (Takahashi et al., 1998; Young et al., 2000).

The discovery in 2000 of adult retinal stem cells in the mammalian CB has thus prompted many researchers to investigate their therapeutic relevance, given their potential higher ability to differentiate into retinal neurons. Such cells could also offer the possibility of autologous transplantation, thereby avoiding immune rejection issues. Murine adult RSCs were shown to adopt retinal phenotypes when transplanted into diseased retinas, but not in healthy ones (Chacko et al., 2003). This work thus highlighted the beneficence of injury-induced factors for the differentiation of stem cells into recipient eyes (Chacko et al., 2003). Regarding human adult RSCs, the group of Van der Kooy reported that their vitreous injection into neonatal animal eyes (which provides a more appropriate host environment compared to adult retinas) resulted in cell migration, integration, and differentiation towards retinal cell fates (Coles et al., 2004).

It has previously been shown that cells already engaged towards a photoreceptor fate have significantly better integration rates than immature stem cells (MacLaren et al., 2006). Along this line, a recent report from Inoue and colleagues indicated that human RSCs, genetically modified to promote their photoreceptor differentiation, exhibited higher level of retinal integration compared with unmodified RSC progeny following their transplantation into murine eyes. Importantly, these transplanted cells significantly improved visual function in transducin mutant mice, which lack functional rod photoreceptors (Inoue et al., 2010).

Obviously, such genetically modified cells are not suitable for clinical trials and the next challenge will be to generate photoreceptor precursors with procedures that do not alter the genomic integrity of donor cells. Another major difficulty in translating such strategies into clinical applications relies on the limited availability of adult RSCs and their reduced proliferative potential. This problem could be alleviated with the use of human embryonic stem (ES) cells. Indeed, because these pluripotent cells can proliferate indefinitely, they represent a potential inexhaustible source for human photoreceptor production (reviewed in Haruta, 2005 and in

Lamba et al., 2009b). Recent data demonstrated that human ES cells can be directed towards a retinal fate and that transplanted ES derived photoreceptors can restore some light response in visually deficient mice (Lamba et al., 2009a). The discovery of induced pluripotent stem (iPS) cells in 2006 in mouse (Takahashi and Yamanaka, 2006), and in 2007 in humans (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007), also offers new opportunities for autologous cell based therapies. Tremendous advancements in the field have been made in just a few years, widening the prospects of regenerative medicine (reviewed in Jin et al., 2009 and in Comyn et al., 2010). However, several issues such as their oncogenic potential, have yet to be addressed before ES or iPS cells could be considered as an option in human trials for the treatment of retinal neurodegenerative diseases.

Awakening dormant retinal stem cells *in vivo*

Another angle of research, that could lead in the future to alternative therapeutical strategies to treat retinal dystrophies, relates to endogenous retinal stem cell mobilization (reviewed in Karl and Reh, 2010). Indeed, accumulating evidences suggest that, although quiescent or barely active, these cells may be amenable to drive regeneration following appropriate stimulation.

It has been proposed that *in vivo* activity of CB stem/progenitor cells is hampered by intrinsic limitations and/or lack of permissive factors in their microenvironment. Nonetheless, these cells retain the ability to respond to growth factor stimulation *in vivo*. Intraocular injection of FGF2 and Insulin was indeed reported to induce proliferation of quiescent ciliary body epithelial cells *in vivo* (Das et al., 2004; Zhao et al., 2005; Abdouh and Bernier, 2006). Abdouh and Bernier showed that these reactivated cells exhibited neuroepithelial characteristics (expression of *Chx10*, *Pax6*, *nestin*) but did not differentiate into neurons (Abdouh and Bernier, 2006). In contrast, Zhao et al. described the expression of several differentiated retinal cell markers in chased BrdU labeled cells. In addition, they found that these progenitors were able to migrate centrally towards the neural retina (Zhao et al., 2005), highlighting both their neurogenic

potential and their ability to move away from their production site. Whether mitogenic, differentiation and migration signals are physiologically present in limiting quantities or counteracted by local inhibitory cues within the CB remains to be determined. Close et al. investigated the nature of extrinsic factors that might account for the postnatal decline in proliferation within the postnatal retina. They found that exogenous transforming growth factor β 1 or β 2 (TGF β 1/2) inhibited proliferation in rat retinal explants. Conversely, postnatal inhibition of TGF β signaling *in vivo* extended the period of proliferation (Close et al., 2005). Based on these data, they proposed that a cytostatic TGF β signal produced by retinal neurons is involved in the maintenance of mitotic quiescence in the postnatal retina. Postembryonic downregulation of Hedgehog (Hh) signalling might also contribute to silence the proliferative and neurogenic potential of adult retinal stem cells. Indeed, mice with a single functional allele of the Hh receptor Patched, in which Hh signaling is constitutively activated, exhibit persistent progenitor cells in the retinal margin, reminiscent of the CMZ of fish and amphibians. Importantly, those *Patched*^{+/-} proliferative cells were shown to trigger limited but observable neuronal regeneration in mice with a retinal degeneration background (Moshiri and Reh, 2004). In line with this, upregulation of Hh signalling components have recently been correlated with increased proliferation in the CB of Royal College of Surgeons rats, an animal model for retinitis pigmentosa (Jian et al., 2009). Such data raise the possibility that a pathological context may favor reactivation of key embryonic signalling pathways and the consecutive initiation of repair processes. Accordingly, two distinct lesional paradigms, intraocular injection of *N*-methyl-*N*-nitrosourea and retinal ganglion cell injury induced by optic nerve axotomy, were shown to trigger proliferation of progenitors and upregulate the expression of the photoreceptor and bipolar marker recoverin in the adult mouse ciliary body (Nickerson et al., 2007; Nishiguchi et al., 2008; Wohl et al., 2009).

Finally, recent findings unexpectedly suggested that in physiological conditions, CB stem cells might contribute to retinal cell turnover of adult primates, by producing retinal neurons (Martinez-Navarrete et al., 2008). The authors indeed observed in the non laminated retinal margin of human and simian

retinas, a variety of cell types progressively adopting a mature neuronal morphology as moving away from the CB (Martinez-Navarrete et al., 2008). These cells express markers for virtually all retinal cell types, suggesting the possibility of spontaneous neurogenesis occurring in the peripheral margin of adult primates. To support this hypothesis, single cell labeling experiments allowing to chase CB cells over long periods of time are now required.

Learning from the ciliary marginal zone of lower vertebrate species

Our fundamental knowledge on RSCs must be improved to set up rational cell based therapy procedures aiming at efficiently stimulating their neurogenic potential *in vivo*. Among the critical issues that undoubtedly need to be addressed are their precise molecular signature, the differences that may distinguish them from their embryonic counterparts, the nature of their niche and the molecular cues that regulate their maintenance and activity. Investigating these issues is an arduous task in mammals. Most data thus come from *in vitro* or *ex vivo* studies and consequently reflect situations where stem cells have been removed from their natural microenvironment. In contrast to the mammalian situation, retinal stem cells in the CMZ of fish and amphibians are active throughout life in physiological as well as regenerative conditions. This gives credit to the use of cold-blooded vertebrates as animal models to study retinal stem cells. Although caution should be taken before extrapolating to humans, such models already proved useful in understanding several aspects of post-embryonic retinogenesis. The CMZ of hatched chick, despite its transient and more limited activity, also revealed to be a prime model notably for dissecting signalling interactions at work during retinal regeneration.

Fish and amphibians as animal models to characterize specific stem cell markers

Retinal stem cell biology is presently limited by the lack of reliable markers that could allow formal identification and segregation of these immature cells within heterogeneous proliferating cell populations. The CMZ of fish and amphibians offers an exceptional model to screen for such markers, as

stem cells are confined in an identified area (Fig. 2). The spatial organization of the amphibian CMZ have indeed been shown to mirror the temporal sequence of retinal development, with stem cells residing in the most peripheral margin, successively followed by actively dividing progenitors and their post-mitotic progeny more centrally (Perron et al., 1998; Casarosa et al., 2005; reviewed in Harris and Perron, 1998; Henningfeld et al., 2007; Locker et al., 2009). Few genes have been described as specifically expressed in the stem cell zone and absent in the surrounding progenitors. Among them are components of the Hh signaling pathway, *Gli2*, *Gli3* and *X-Smoothed* (Perron et al., 2003), as well as the collagen encoding gene *DrCol15a1b* (Gonzalez-Nunez et al., 2010). Additionally, we recently identified a dozen specific novel retinal stem cell markers through an ongoing large-scale hybridization screen (our unpublished data).

The zebrafish allows forward genetic screens that already proved useful in identifying mutants that likely affect stem cell maintenance (Wehman et al., 2005). In their study, Wehman et al. isolated 18 mutant strains, some of them exhibiting phenotypes consistent with an absence of stem cell activity. Strikingly, these mutations disrupt larval growth of the retina, while leaving embryonic development of the eye largely unaffected. Moreover, gene linkage analyses revealed no match with candidate genes known to regulate retinogenesis, stem cell biology or growth. Altogether, their results suggest that many genes controlling adult stem cell activity remain to be identified and might not necessarily be found within the pool of genes previously described in embryonic stem/progenitor cells.

Signalling pathways controlling CMZ retinal stem cell behavior in physiological and regenerative conditions

Several lines of evidence suggest that key signalling pathways such as Wnt, Hh, Notch and BMP, known to control NSCs in the adult brain, might be involved as well in the regulation of RSC ontogenesis, maintenance and/or activity (Zhao et al., 2002; Alexson et al., 2006; Inoue et al., 2006; Das et al., 2006b; Bhattacharya et al., 2007). However, whether they act on stem or progenitor cells, which cellular parameters they control *in vivo* (cell division modality, impact on cell cycle progression, regula-

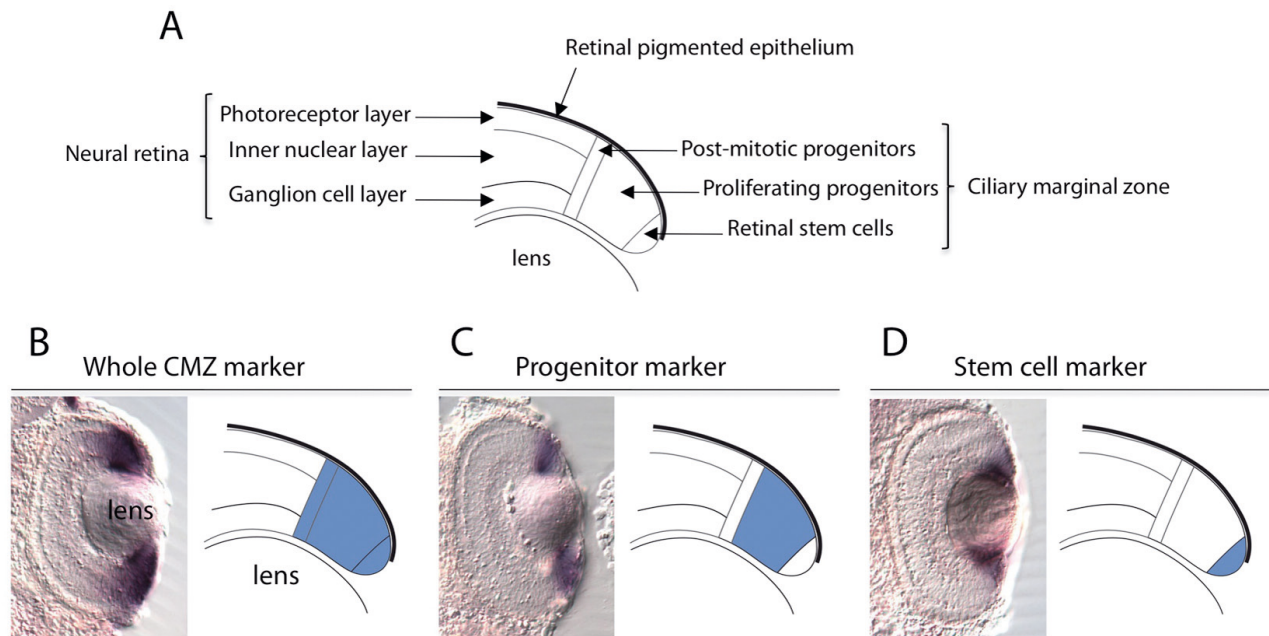


Fig. 2. - A. Schematic of a ciliary marginal zone (CMZ) in the periphery of a *Xenopus* tadpole retina at stage 41. The spatial organisation in this region mirrors the temporal sequence of retinal development, with stem cells residing in the most peripheral margin. Noticeably, the CB is not represented here since it will form at later tadpole stages. B-D. Retinal sections following *in situ* hybridization labelling and schematic diagrams illustrating three types of gene expression profiles within the CMZ of *Xenopus tropicalis* tadpoles. B. Illustration of an expression pattern in the whole CMZ. C. Illustration of an expression pattern, such as that of bHLH factors *Xath5* or *Hes2* (Kanekar et al., 1997; Solter et al., 2006), restricted to progenitor cells and excluded from the stem cell region. D. Illustration of an expression pattern, such as that of *Gli2*, *Gli3* or *Smo* (modified from Perron et al., 2003), restricted to the stem cell region.

tion of cell exit) and what is the nature of their target genes are still poorly documented.

As mentioned above, constitutive activation of Hh signalling results in persistent proliferative cells in the murine ciliary margin (Moshiri and Reh, 2004). In line with this, Sonic Hh protein has been found to promote proliferation within the CMZ of post-hatched chicken eyes (Moshiri et al., 2005). Our group demonstrated that Hh signalling exerts ambivalent effects on both cell cycle kinetics and cell cycle exit of retinal precursors, thereby simultaneously promoting proliferation and differentiation (Locker et al., 2006). We proposed that Hh signalling may regulate the transition from slow cycling retinal stem cells to fast cycling neuronal progenitors, bringing them closer to cell cycle exit (Locker et al., 2006; Agathocleous et al., 2007). Besides, in retinotomized embryonic chicks, Hh signalling was found to act as a prominent regulator of stem cell dependent regeneration, in close interdependency with the FGF pathway (Spence et al., 2004; Spence et al., 2007). A third player in the process was found to be the BMP pathway, which also interacts

with FGF signalling although in a stage dependent manner, first activating FGF-receptor expression and then downregulating it (Haynes et al., 2007).

Both Wnt and BMP signalings participate during embryogenesis to the determination and patterning of anterior eye structures including the iris and CB (Zhao et al., 2002; Cho and Cepko, 2006; Liu et al., 2007; Kubo and Nakagawa, 2009). The Wnt pathway might also be critical for the formation of the CMZ by keeping cells of this region in a proliferative and undifferentiated state (Kubo et al., 2003; Stephens et al., 2010). Recently, it was found that this function is mediated by *c-hairy1*, a member of the *Hairy and Enhancer of split* gene family (Kubo and Nakagawa, 2009). A role for the Wnt pathway in adult retinal stem cell maintenance has been suggested as well. Both Wnt3a treatment or overexpression of a stabilized form of β -catenin enhanced proliferation of murine CB-derived cells *in vitro* (Inoue et al., 2006; Das et al., 2006a). In addition, canonical Wnt activity has been observed in the CMZ of diverse vertebrates suggesting that Wnt responsiveness might be a fea-

ture of adult retinal stem/progenitor cells (Denayer et al., 2008; reviewed in Kubo and Nakagawa, 2008). We recently directly addressed this question *in vivo* by using hormone inducible constructs allowing perturbations of the canonical Wnt pathway in a temporally controlled manner. Activation of Wnt signaling in transgenic tadpole retinas increased the number of CMZ proliferative cells, while blocking the pathway almost completely abolished proliferation (Denayer et al., 2008). These results substantiate the hypothesis that, in lower vertebrates, the Wnt pathway plays a crucial role in adult retinal stem cell maintenance. Altogether, it appears that a growing number of studies have addressed the influence of diverse growth factors and signaling pathways on retinal stem cells behaviour. The major challenge is now to unravel the interactions and cross-talks between these pathways to elucidate how they work together to orchestrate the maintenance and proliferation potential of retinal stem cells.

Final Summary

The remarkable discovery, in the 90s, of NSC dependent neurogenesis in the adult brain, ended a central dogma in neurobiology. Since then, surprises kept on occurring, with a variety of NSCs being identified in many places of the nervous system, including the retina. As summarized in the present review, *in vitro* and *in vivo* studies of RSCs already produced a rich understanding of their proliferation and differentiation potential, and thereby allowed to foresee the possible design of new therapies for retinal degeneration diseases. Endogenous stimulation of photoreceptor production in the mammalian eye was completely unanticipated only ten years ago and might now constitute a future therapeutical option. However, RSC applications in cell based therapy and regenerative medicine still rely on necessary progresses of basic research regarding the molecular basis of their self-renewal, fate determination, survival, integration potential and plasticity. Importantly, future work in the field may also provide knowledge relevant to target cancer stem cells in various brain tumors. Significant advances are expected from relatively recent aspects of RSC biology such as epigenetic or miRNA gene regulation. The study of the molecular and cellular composition

of RSC niche is also of utmost importance. Although it has been initiated (Raymond et al., 2006), it clearly remains to be further explored to better evaluate how environmental cues are integrated by retinal stem and progenitor cells. Besides, novel insights in the field of RSCs should rapidly emerge from recent technical breakthroughs. Complex 3D-culture systems (Dutt and Cao, 2009) and biomaterials (Ballios et al., 2010), as carriers or substrate matrices, should for instance allow to improve conditions for *in vitro* RSC differentiation and implantation of cellular progeny into injured or degenerating retinas. Rapid advances in the identification of factors impacting on RSC identity and behavior can also be anticipated thanks to the development of high-throughput technologies. As a whole, we can hope that the next decade will provide as much excitement as the previous one, and that future work will unravel other unexpected aspects of RSC biology, that will be relevant to set up therapies for retinal dystrophies.

Abbreviation list

BMP: Bone Morphogenetic Protein; CB: Ciliary Body; CE: Ciliary Epithelium; CMZ: Ciliary Marginal Zone; ES cells: Embryonic Stem cells; iPS cells: Induced Pluripotent Stem cells; FGF: Fibroblast Growth Factor; Hh: Hedgehog; NSC: Neural Stem Cell; RPE: Retinal Pigmented Epithelium; RSC: Retinal Stem Cell; TGF β : Transforming Growth Factor β .

Acknowledgements

This work is supported by grants from the CNRS, University Paris Sud, ARC, Retina France and ANR. An ARC and a Neuropole fellowships support J-P. D. and N. M. respectively.

References

- Abdough M. and Bernier G. *In vivo* reactivation of a quiescent cell population located in the ocular ciliary body of adult mammals. *Exp. Eye Res.*, **83**: 153-164, 2006.
- Agathocleous M., Locker M., Harris W.A., Perron M. A general role of hedgehog in the regulation of proliferation. *Cell Cycle*, **6**: 156-159, 2007.
- Ahmad I., Tang L., Pham H. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **270**: 517-521, 2000.

- Ahmad I., Das A.V., James J., Bhattacharya S., Zhao X. Neural stem cells in the mammalian eye: types and regulation. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, **15**: 53-62, 2004.
- Akagi T., Mandai M., Ooto S., Hirami Y., Osakada F., Kageyama R., Yoshimura N., Takahashi M. Otx2 homeobox gene induces photoreceptor-specific phenotypes in cells derived from adult iris and ciliary tissue. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **45**: 4570-4575, 2004.
- Akagi T., Akita J., Haruta M., Suzuki T., Honda Y., Inoue T., Yoshiura S., Kageyama R., Yatsu T., Yamada M., Takahashi M. Iris-derived cells from adult rodents and primates adopt photoreceptor-specific phenotypes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **46**: 3411-3419, 2005.
- Alexson T.O., Hitoshi S., Coles B.L., Bernstein A., van der Kooy D. Notch signaling is required to maintain all neural stem cell populations - irrespective of spatial or temporal niche. *Dev. Neurosci.*, **28**: 34-48, 2006.
- Araki M. Regeneration of the amphibian retina: role of tissue interaction and related signaling molecules on RPE transdifferentiation. *Dev. Growth Differ.*, **49**: 109-120, 2007.
- Asami M., Sun G., Yamaguchi M., Kosaka M. Multipotent cells from mammalian iris pigment epithelium. *Dev. Biol.*, **304**: 433-446, 2007.
- Ballios B.G., Cooke M.J., van der Kooy D., Shoichet M.S. A hydrogel-based stem cell delivery system to treat retinal degenerative diseases. *Biomaterials*, **31**: 2555-2564, 2010.
- Bhattacharya S., Das A., Mallya K., Ahmad I. Maintenance of retinal stem cells by Abcg2 is regulated by notch signaling. *J. Cell. Sci.*, **120**: 2652-2662, 2007.
- Casarosa S., Leone P., Cannata S., Santini F., Pinchera A., Barsacchi G., Andreazzoli M. Genetic analysis of metamorphic and premetamorphic *Xenopus* ciliary marginal zone. *Dev. Dyn.*, **233**: 646-651, 2005.
- Chacko D.M., Das A.V., Zhao X., James J., Bhattacharya S., Ahmad I. Transplantation of ocular stem cells: the role of injury in incorporation and differentiation of grafted cells in the retina. *Vision Res.*, **43**: 937-946, 2003.
- Cho S.H. and Cepko C.L. Wnt2b/beta-catenin-mediated canonical Wnt signaling determines the peripheral fates of the chick eye. *Development*, **133**: 3167-3177, 2006.
- Cicero S.A., Johnson D., Reyntjens S., Frase S., Connell S., Chow L.M., Baker S.J., Sorrentino B.P., Dyer M.A. Cells previously identified as retinal stem cells are pigmented ciliary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**: 6685-6690, 2009.
- Close J.L., Gumuscu B., Reh T.A. Retinal neurons regulate proliferation of postnatal progenitors and Muller glia in the rat retina via TGF beta signaling. *Development*, **132**: 3015-3026, 2005.
- Coles B.L., Angenieux B., Inoue T., Del Rio-Tsonis K., Spence J.R., McInnes R.R., Arsenijevic Y., van der Kooy D. Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**: 15772-15777, 2004.
- Comyn O., Lee E., MacLaren R.E. Induced pluripotent stem cell therapies for retinal disease. *Curr. Opin. Neurol.*, **23**: 4-9, 2010.
- Das A.V., James J., Zhao X., Rahnenfuhrer J., Ahmad I. Identification of c-Kit receptor as a regulator of adult neural stem cells in the mammalian eye: interactions with Notch signaling. *Dev. Biol.*, **273**: 87-105, 2004.
- Das A.V., James J., Rahnenfuhrer J., Thoreson W.B., Bhattacharya S., Zhao X., Ahmad I. Retinal properties and potential of the adult mammalian ciliary epithelium stem cells. *Vision Res.*, **45**: 1653-1666, 2005.
- Das A.V., Mallya K.B., Zhao X., Ahmad F., Bhattacharya S., Thoreson W.B., Hegde G.V., Ahmad I. Neural stem cell properties of Muller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling. *Dev. Biol.*, **299**: 283-302, 2006a.
- Das A.V., Zhao X., James J., Kim M., Cowan K.H., Ahmad I. Neural stem cells in the adult ciliary epithelium express GFAP and are regulated by Wnt signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **339**: 708-716, 2006b.
- De Marzo A., Aruta C., Marigo V. PEDF promotes retinal neurosphere formation and expansion in vitro. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **664**: 621-630, 2010.
- Del Rio-Tsonis K. and Tsonis P.A. Eye regeneration at the molecular age. *Dev. Dyn.*, **226**: 211-224, 2003.
- Denayer T., Locker M., Borday C., Deroo T., Janssens S., Hecht A., van Roy F., Perron M., Vleminckx K. Canonical Wnt signaling controls proliferation of retinal stem/progenitor cells in postembryonic *Xenopus* eyes. *Stem Cells*, **26**: 2063-2074, 2008.
- Djojosebroto M.W. and Arsenijevic Y. Retinal stem cells: promising candidates for retina transplantation. *Cell Tissue Res.*, **331**: 347-357, 2008.
- Djojosebroto M., Bollotte F., Wirapati P., Radtke F., Stamenkovic I., Arsenijevic Y. Chromosomal num-

- ber aberrations and transformation in adult mouse retinal stem cells in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **50**: 5975-5987, 2009.
- Dutt K. and Cao Y. Engineering retina from human retinal progenitors (cell lines). *Tissue Eng. Part A*, **15**: 1401-1413, 2009.
- Fischer A.J. and Reh T.A. Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev. Biol.*, **220**: 197-210, 2000.
- Fischer A.J. and Reh T.A. Transdifferentiation of pigmented epithelial cells: a source of retinal stem cells? *Dev. Neurosci.*, **23**: 268-276, 2001.
- Gonzalez-Nunez V., Nocco V., Budd A. Characterization of DrCol15a1b, a novel component of the stem-cell niche in the zebrafish retina. *Stem Cells*, 2010 [Epub ahead of print].
- Gu P., Harwood L.J., Zhang X., Wylie M., Curry W.J., Cogliati T. Isolation of retinal progenitor and stem cells from the porcine eye. *Mol. Vis.*, **13**: 1045-1057, 2007.
- Gualdoni S., Baron M., Lakowski J., Decembrini S., Smith A.J., Pearson R.A., Ali R.R., Sowden J.C. Adult ciliary epithelial cells, previously identified as retinal stem cells with potential for retinal repair, fail to differentiate into new rod photoreceptors. *Stem Cells*, **28**: 1048-1059, 2010.
- Harris W.A. and Perron M. Molecular recapitulation: the growth of the vertebrate retina. *Int. J. Dev. Biol.*, **42**: 299-304, 1998.
- Haruta M., Kosaka M., Kanegae Y., Saito I., Inoue T., Kageyama R., Nishida A., Honda Y., Takahashi M. Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue. *Nat. Neurosci.*, **4**: 1163-1164, 2001.
- Haruta M. Embryonic stem cells: potential source for ocular repair. *Semin. Ophthalmol.*, **20**: 17-23, 2005.
- Haynes T., Gutierrez C., Aycinena J.C., Tsonis P.A., Del Rio-Tsonis K. BMP signaling mediates stem/progenitor cell-induced retina regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**: 20380-20385, 2007.
- Henningfeld K.A., Locker M., Perron M. Xenopus primary neurogenesis and retinogenesis. *Functional Development and Embryology*, **1**: 26-36, 2007.
- Inoue T., Kagawa T., Fukushima M., Shimizu T., Yoshinaga Y., Takada S., Tanihara H., Taga T. Activation of canonical Wnt pathway promotes proliferation of retinal stem cells derived from adult mouse ciliary margin. *Stem Cells*, **24**: 95-104, 2006.
- Inoue T., Coles B.L., Dorval K., Bremner R., Bessho Y., Kageyama R., Hino S., Matsuoka M., Craft C.M., McInnes R.R., Tremblay F., Prusky G.T., van der Kooy D. Maximizing functional photoreceptor differentiation from adult human retinal stem cells. *Stem Cells*, **28**: 489-500, 2010.
- Jian Q., Xu H., Xie H., Tian C., Zhao T., Yin Z. Activation of retinal stem cells in the proliferating marginal region of RCS rats during development of retinitis pigmentosa. *Neurosci. Lett.*, **465**: 41-44, 2009.
- Jin Z.B., Okamoto S., Mandai M., Takahashi M. Induced pluripotent stem cells for retinal degenerative diseases: a new perspective on the challenges. *J. Genet.*, **88**: 417-424, 2009.
- Jomary C. and Jones S.E. Induction of functional photoreceptor phenotype by exogenous Crx expression in mouse retinal stem cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **49**: 429-437, 2008.
- Jomary C., Jones S.E., Lotery A.J. Generation of light-sensitive photoreceptor phenotypes by genetic modification of human adult ocular stem cells with Crx. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **51**: 1181-1189, 2010.
- Kanekar S., Perron M., Dorsky R., Harris W.A., Jan L.Y., Jan Y.N., Vetter M.L. Xath5 participates in a network of bHLH genes in the developing Xenopus retina. *Neuron*, **19**: 981-994, 1997.
- Karl M.O. and Reh T.A. Regenerative medicine for retinal diseases: activating endogenous repair mechanisms. *Trends. Mol. Med.*, **16**: 193-202, 2010.
- Klassen H., Ziaeeian B., Kirov, II, Young M.J., Schwartz P.H. Isolation of retinal progenitor cells from post-mortem human tissue and comparison with autologous brain progenitors. *J. Neurosci. Res.*, **77**: 334-343, 2004a.
- Klassen H.J., Ng T.F., Kurimoto Y., Kirov I., Shatos M., Coffey P., Young M.J. Multipotent retinal progenitors express developmental markers, differentiate into retinal neurons, and preserve light-mediated behavior. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **45**: 4167-4173, 2004b.
- Kohn R., Ikeda Y., Yonemitsu Y., Hisatomi T., Yamaguchi M., Miyazaki M., Takeshita H., Ishibashi T., Sueishi K. Sphere formation of ocular epithelial cells in the ciliary body is a reprogramming system for neural differentiation. *Brain Res.*, **1093**: 54-70, 2006.
- Kubo F., Takeichi M., Nakagawa S. Wnt2b controls retinal cell differentiation at the ciliary marginal zone. *Development*, **130**: 587-598, 2003.
- Kubo F. and Nakagawa S. Wnt signaling in retinal stem cells and regeneration. *Dev. Growth Differ.*, **50**: 245-251, 2008.

- Kubo F. and Nakagawa S. Hairy1 acts as a node downstream of Wnt signaling to maintain retinal stem cell-like progenitor cells in the chick ciliary marginal zone. *Development*, **136**: 1823-1833, 2009.
- Lamba D., Karl M., Reh T. Neural regeneration and cell replacement: a view from the eye. *Cell Stem Cell*, **2**: 538-549, 2008.
- Lamba D.A., Gust J., Reh T.A. Transplantation of human embryonic stem cell-derived photoreceptors restores some visual function in Crx-deficient mice. *Cell Stem Cell*, **4**: 73-79, 2009a.
- Lamba D.A., Karl M.O., Reh T.A. Strategies for retinal repair: cell replacement and regeneration. *Prog. Brain Res.*, **175**: 23-31, 2009b.
- Lee C.S., May N.R., Fan C.M. Transdifferentiation of the ventral retinal pigmented epithelium to neural retina in the growth arrest specific gene 1 mutant. *Dev. Biol.*, **236**: 17-29, 2001.
- Liu H., Xu S., Wang Y., Mazerolle C., Thurig S., Coles B.L., Ren J.C., Taketo M.M., van der Kooy D., Wallace V.A. Ciliary margin transdifferentiation from neural retina is controlled by canonical Wnt signaling. *Dev. Biol.*, **308**: 54-67, 2007.
- Locker M., Agathocleous M., Amato M.A., Parain K., Harris W.A., Perron M. Hedgehog signaling and the retina: insights into the mechanisms controlling the proliferative properties of neural precursors. *Genes. Dev.*, **20**: 3036-3048, 2006.
- Locker M., Borday C., Perron M. Stemness or not stemness? Current status and perspectives of adult retinal stem cells. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, **4**: 118-130, 2009.
- Lord-Grignon J., Abdouh M., Bernier G. Identification of genes expressed in retinal progenitor/stem cell colonies isolated from the ocular ciliary body of adult mice. *Gene Expr. Patterns*, **6**: 992-999, 2006.
- MacLaren R.E., Pearson R.A., MacNeil A., Douglas R.H., Salt T.E., Akimoto M., Swaroop A., Sowden J.C., Ali R.R. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature*, **444**: 203-207, 2006.
- MacLaren R.E. and Pearson R.A. Stem cell therapy and the retina. *Eye (Lond)*, **21**: 1352-1359, 2007.
- MacNeil A., Pearson R.A., MacLaren R.E., Smith A.J., Sowden J.C., Ali R.R. Comparative analysis of progenitor cells isolated from the iris, pars plana, and ciliary body of the adult porcine eye. *Stem Cells*, **25**: 2430-2438, 2007.
- Martinez-Navarrete G.C., Angulo A., Martin-Nieto J., Cuenca N. Gradual morphogenesis of retinal neurons in the peripheral retinal margin of adult monkeys and humans. *J. Comp. Neurol.*, **511**: 557-580, 2008.
- Mayer E.J., Carter D.A., Ren Y., Hughes E.H., Rice C.M., Halfpenny C.A., Scolding N.J., Dick A.D. Neural progenitor cells from postmortem adult human retina. *Br. J. Ophthalmol.*, **89**: 102-106, 2005.
- Merhi-Soussi F., Angenieux B., Canola K., Kostic C., Tekaya M., Hornfeld D., Arsenijevic Y. High yield of cells committed to the photoreceptor fate from expanded mouse retinal stem cells. *Stem Cells*, **24**: 2060-2070, 2006.
- Moe M.C., Kolberg R.S., Sandberg C., Vik-Mo E., Olstorn H., Varghese M., Langmoen I.A., Nicolaissen B. A comparison of epithelial and neural properties in progenitor cells derived from the adult human ciliary body and brain. *Exp. Eye Res.*, **88**: 30-38, 2009.
- Moshiri A., Close J., Reh T.A. Retinal stem cells and regeneration. *Int. J. Dev. Biol.*, **48**: 1003-1014, 2004.
- Moshiri A. and Reh T.A. Persistent progenitors at the retinal margin of ptc^{+/-} mice. *J. Neurosci.*, **24**: 229-237, 2004.
- Moshiri A., McGuire C.R., Reh T.A. Sonic hedgehog regulates proliferation of the retinal ciliary marginal zone in posthatch chicks. *Dev. Dyn.*, **233**: 66-75, 2005.
- Nickerson P.E., Emsley J.G., Myers T., Clarke D.B. Proliferation and expression of progenitor and mature retinal phenotypes in the adult mammalian ciliary body after retinal ganglion cell injury. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **48**: 5266-5275, 2007.
- Nishiguchi K.M., Kaneko H., Nakamura M., Kachi S., Terasaki H. Identification of photoreceptor precursors in the pars plana during ocular development and after retinal injury. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **49**: 422-428, 2008.
- Pellegrini G., De Luca M., Arsenijevic Y. Towards therapeutic application of ocular stem cells. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, **18**: 805-818, 2007.
- Perron M., Kanekar S., Vetter M.L., Harris W.A. The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the *Xenopus* eye. *Dev. Biol.*, **199**: 185-200, 1998.
- Perron M. and Harris W.A. Retinal stem cells in vertebrates. *Bioessays*, **22**: 685-688, 2000.
- Perron M., Boy S., Amato M.A., Viczian A., Koebernick K., Pieler T., Harris W.A. A novel function for Hedgehog signalling in retinal pigment epithelium differentiation. *Development*, **130**: 1565-1577, 2003.

- Raymond P.A., Barthel L.K., Bernardos R.L., Perkowski J.J. Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC Dev. Biol.*, **6**: 36, 2006.
- Reh T.A. and Constantine-Paton M. Qualitative and quantitative measures of plasticity during the normal development of the *Rana pipiens* retinotectal projection. *Brain Res.*, **312**: 187-200, 1983.
- Rowan S., Chen C.M., Young T.L., Fisher D.E., Cepko C.L. Transdifferentiation of the retina into pigmented cells in ocular retardation mice defines a new function of the homeodomain gene *Chx10*. *Development*, **131**: 5139-5152, 2004.
- Seaberg R.M. and van der Kooy D. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci.*, **26**: 125-131, 2003.
- Solter M., Locker M., Boy S., Taelman V., Bellefroid E.J., Perron M., Pieler T. Characterization and function of the bHLH-O protein XHes2: insight into the mechanisms controlling retinal cell fate decision. *Development*, **133**: 4097-4108, 2006.
- Spence J.R., Madhavan M., Ewing J.D., Jones D.K., Lehman B.M., Del Rio-Tsonis K. The hedgehog pathway is a modulator of retina regeneration. *Development*, **131**: 4607-4621, 2004.
- Spence J.R., Aycinena J.C., Del Rio-Tsonis K. Fibroblast growth factor-hedgehog interdependence during retina regeneration. *Dev. Dyn.*, **236**: 1161-1174, 2007.
- Stephens W.Z., Senecal M., Nguyen M., Piotrowski T. Loss of adenomatous polyposis coli (*apc*) results in an expanded ciliary marginal zone in the zebrafish eye. *Dev. Dyn.*, **239**: 2066-2077, 2010.
- Takahashi M., Palmer T.D., Takahashi J., Gage F.H. Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina. *Mol. Cell. Neurosci.*, **12**: 340-348, 1998.
- Takahashi K. and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126**: 663-676, 2006.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, **131**: 861-872, 2007.
- Tropepe V., Coles B.L., Chiasson B.J., Horsford D.J., Elia A.J., McInnes R.R., van der Kooy D. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science*, **287**: 2032-2036, 2000.
- Vergara M.N. and Del Rio-Tsonis K. Retinal regeneration in the *Xenopus laevis* tadpole: a new model system. *Mol. Vis.*, **15**: 1000-1013, 2009.
- Viczian A.S., Solessio E.C., Lyou Y., Zuber M.E. Generation of functional eyes from pluripotent cells. *PLoS Biol.*, **7**: e1000174, 2009.
- Wehman A.M., Staub W., Meyers J.R., Raymond P.A., Baier H. Genetic dissection of the zebrafish retinal stem-cell compartment. *Dev. Biol.*, **281**: 53-65, 2005.
- Wetts R. and Fraser S.E. Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina. *Science*, **239**: 1142-1145, 1988.
- Wetts R., Serbedzija G.N., Fraser S.E. Cell lineage analysis reveals multipotent precursors in the ciliary margin of the frog retina. *Dev. Biol.*, **136**: 254-263, 1989.
- Wohl S.G., Schmeer C.W., Kretz A., Witte O.W., Isenmann S. Optic nerve lesion increases cell proliferation and nestin expression in the adult mouse eye in vivo. *Exp. Neurol.*, **219**: 175-186, 2009.
- Xu H., Sta Iglesia D.D., Kielczewski J.L., Valenta D.F., Pease M.E., Zack D.J., Quigley H.A. Characteristics of progenitor cells derived from adult ciliary body in mouse, rat, and human eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **48**: 1674-1682, 2007a.
- Xu S., Sunderland M.E., Coles B.L., Kam A., Holowacz T., Ashery-Padan R., Marquardt T., McInnes R.R., van der Kooy D. The proliferation and expansion of retinal stem cells require functional Pax6. *Dev. Biol.*, **304**: 713-721, 2007b.
- Yanagi Y., Inoue Y., Kawase Y., Uchida S., Tamaki Y., Araie M., Okochi H. Properties of growth and molecular profiles of rat progenitor cells from ciliary epithelium. *Exp. Eye Res.*, **82**: 471-478, 2006.
- Yoshii C., Ueda Y., Okamoto M., Araki M. Neural retinal regeneration in the anuran amphibian *Xenopus laevis* post-metamorphosis: transdifferentiation of retinal pigmented epithelium regenerates the neural retina. *Dev. Biol.*, **303**: 45-56, 2007.
- Young M.J., Ray J., Whiteley S.J., Klassen H., Gage F.H. Neuronal differentiation and morphological integration of hippocampal progenitor cells transplanted to the retina of immature and mature dystrophic rats. *Mol. Cell Neurosci.*, **16**: 197-205, 2000.
- Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin, II, Thomson J.A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, **318**: 1917-1920, 2007.

Zhao S., Chen Q., Hung F.C., Overbeek P.A. BMP signaling is required for development of the ciliary body. *Development*, **129**: 4435-4442, 2002.

Zhao X., Das A.V., Soto-Leon F., Ahmad I. Growth factor-responsive progenitors in the postnatal mammalian retina. *Dev. Dyn.*, **232**: 349-358, 2005.

Zuber M.E., Gestri G., Viczian A.S., Barsacchi G., Harris W.A. Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development*, **130**: 5155-5167, 2003.

Annexe 2 : Les méthodes d'étude du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est classiquement décomposé en quatre phases successives. Au cours de l'interphase, il y a une phase de croissance (G_1), une phase de réplication de l'ADN (S) et une phase de croissance et de préparation à la mitose (G_2). Enfin arrive la mitose qui conduit à la naissance des deux cellules filles (**Figure 62**). La durée du cycle cellulaire varie d'une espèce à l'autre mais diffère aussi d'une population cellulaire à une autre. En effet, les cellules souches en général sont des cellules à division lente, par rapport aux cellules progénitrices. Des différences de longueur du cycle sont également observées selon le type de cellules progénitrices. Par exemple, au cours du développement, les progéniteurs neuraux à division proliférative (division symétrique) se divisent plus rapidement que les progéniteurs à division neurogéniques (divisions asymétriques) (Götz & Huttner, 2005).

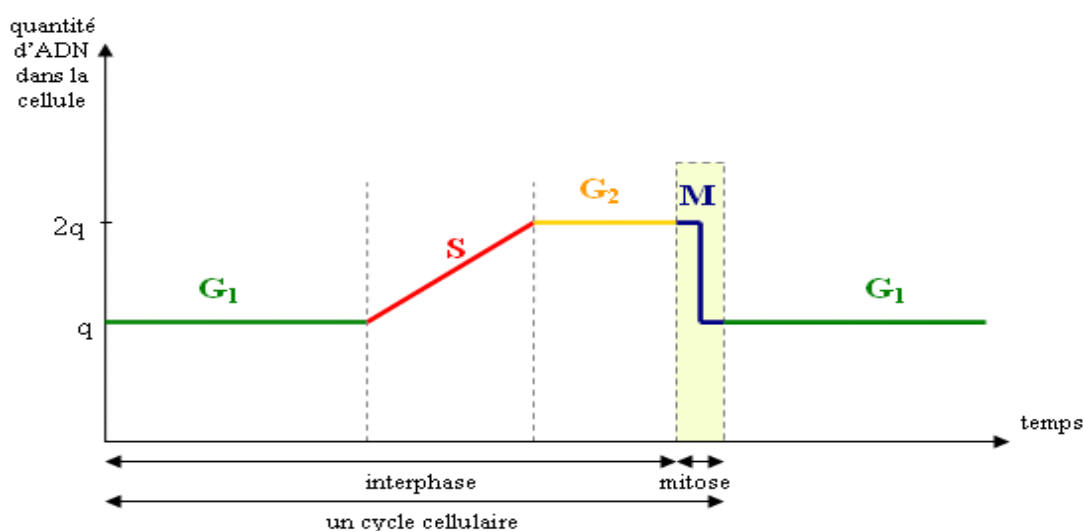


Figure 62 : Les phases du cycle cellulaire. Graphique représentant la quantité d'ADN en fonction des phases du cycle.

Les méthodes d'étude de la cinétique du cycle cellulaire sont relativement complexes, en particulier *in vivo* et dans la ZMC où les cellules cyclent de manière asynchrone. Elles s'appuient sur le principe suivant : Dans une population de cellules cyclantes de manière asynchrone, la fraction de cellules dans une phase donnée du cycle cellulaire est proportionnelle à la longueur de cette phase par rapport à la durée totale du cycle (Nowakowski et al., 1989).

Soit par exemple pour la phase S :

$$\frac{N_s}{N_t} \propto \frac{T_s}{T_c}$$

N_s = Nombre de cellules en phase S

N_t = Nombre de cellules totales

T_s = Durée de la phase S

T_c = Durée totale du cycle cellulaire

Les méthodes permettant d'étudier la cinétique du cycle cellulaire reposent donc sur la possibilité d'identifier les cellules dans une phase donnée du cycle. Généralement, les outils disponibles permettent de marquer les cellules en phase S ou M. En effet, l'utilisation d'analogues de la thymidine tels que le BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine), l'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine), l'IddU (5-Iodo-2'-deoxyuridine) ou le CldU (5-Chloro-2'-deoxyuridine) s'incorporent à l'ADN pendant la réplication au cours de la phase S. Les cellules en phase M quant à elles peuvent être identifiées grâce à un anticorps dirigé contre l'histone H3 phosphorylée (P-H3).

▪ Calcul de l'indice mitotique

Partant du principe évoqué précédemment, le nombre de cellules en phase M (N_m) par rapport au nombre total de cellules cyclantes (N_t) est proportionnel à la durée de la phase M (T_m) par rapport à la durée totale du cycle (T_c).

Soit

$$\frac{N_m}{N_t} \propto \frac{T_m}{T_c}$$

Sachant que l'on pose l'hypothèse que la durée de la phase M est peu variable quelque soit le traitement appliqué, on peut alors considérer que la variation du rapport N_m/N_t reflète une variation de la durée du cycle cellulaire.

Les cellules en phase M sont marquées grâce à un anticorps anti-P-H3 et l'ensemble des cellules cyclantes par un anticorps anti-PCNA (proliferating cell nuclear antigen).

Anticorps	Compagnie	Spécificité	Dilution
Mouse Anti-PCNA	Dako	PCNA	1/500
Rabbit Anti P-H3	Millipore	P-H3	1/500

Protocole : les embryons sont fixés directement après 24 heures de traitement pharmacologique en Bouin toute la nuit à 4°C, puis déshydratés en éthanol et, après une nuit en butanol, inclus en paraffine. Ils sont par la suite coupés au microtome (épaisseur de 12 µm). Après déparaffinage des coupes, un démasquage à l'acide chlorhydrique (HCl 2N, 45min) est réalisé suivi d'une incubation dans les anticorps primaires cités précédemment. Leur présence est révélée grâce aux anticorps secondaires fluorescents suivants : Anti-mouse 594 (rouge), 1/1000 (Invitrogen) pour PCNA; Anti-rat 488 (vert), 1/1000 (Invitrogen) pour P-H3.

▪ La technique du double marquage

La technique du double marquage consiste à discriminer des populations cellulaires distinctes au cours du temps grâce à l'utilisation de deux analogues de la thymidine tels que l'EdU, le CldU ou l'IddU. La taille relative de ces différentes populations permet de calculer la longueur de la phase S (Ts) ainsi que la durée totale du cycle cellulaire (Tc). Pour ma part, j'ai réalisé cette expérience à deux reprises en combinant le CldU et l'IddU la première fois et l'EdU et l'IddU la seconde.

Le principe consiste à injecter tout d'abord l'un des deux analogues (l'EdU ou le CldU), *in vivo* à un temps donné ($t=0h$). Les cellules passant par la phase S incorporeront cet analogue dans leur ADN. Deux heures plus tard, l'autre analogue, l'IddU par exemple, est injecté. Les cellules passant par la phase S incorporent alors les deux analogues à la fois (Fraction S). Celles qui ont incorporé de l'EdU (ou le CldU) mais qui sont sorties de la phase S avant l'injection du second analogue n'incorporeront pas l'IddU et seront donc simplement marquées EdU+ (ou CldU+). Cette population cellulaire correspond à la fraction L (« leaving » sorties de la phase S). La complexité de ce type d'expérience repose sur le choix

des anticorps. En effet, il faut trouver des anticorps qui reconnaissent un seul des deux analogues utilisés et des anticorps secondaires qui ne reconnaissent qu'un seul des deux anticorps primaires. Les anticorps utilisés sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Anticorps	Compagnie	Spécificité	Dilution
Mouse Anti-BrdU	BD biosciences	IddU	1/100
Rat Anti-BrdU	Axy	CldU	1/100

Grâce à l'utilisation de ces anticorps primaires et des anticorps secondaires couplés à des fluorochromes distincts (rouge pour le CldU et vert pour l'IddU, l'EdU étant révélé en rouge par l'utilisation d'un kit Click-iT® EdU Imaging, Molecular Probes), il est possible de discriminer les fractions L (cellules rouges simplement marquées EdU+ ou CldU+) et S (cellules jaunes, doublement marquées EdU+/IddU+ ou CldU+/IddU+) (**Figure 63**).

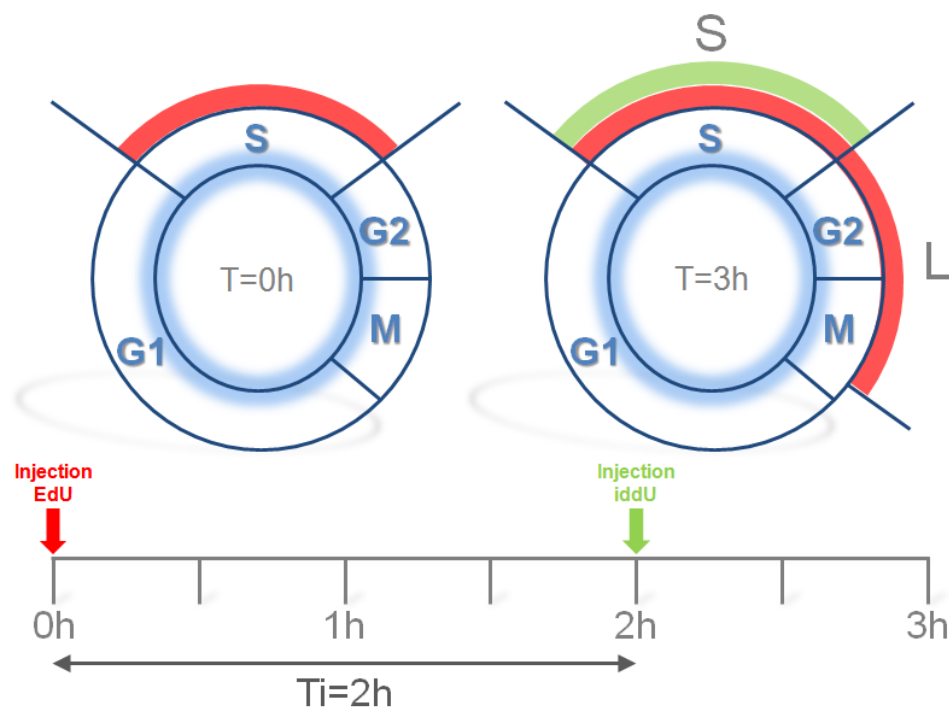


Figure 63 : Principe de la méthode de double marquage pour l'étude de la cinétique du cycle cellulaire. Des injections d'analogues de la thymidine (EdU et IddU) sont injectés au temps T=0h et T=2h et les têtards sont fixés à T=3h. De T=0h à T=2h, la totalité des cellules en phase S sont marquées par l'EdU (rouge). De T=2h à T=3h, les cellules en phase S sont doublement marquées EdU+/IddU+. Par contre, les cellules qui étaient en phase S entre T=0h et T=2h mais qui sont sorties de la phase S avant l'injection d'IddU sont simplement marquées par l'EdU (adapté de Martynoga et al., 2005).

Selon la relation de Nowakowski énoncée plus haut le ratio entre le nombre de cellules en phase S (fraction S) et le nombre de cellules ayant quitté la phase S (fraction L) est égale au ratio entre la durée de la phase S (Ts) et la durée durant laquelle les cellules ne peuvent incorporer que le premier analogue (Ti=2h) (Alfonso et al., 2012) :

$$\frac{S}{L} = \frac{T_s}{T_i}$$

d'où :

$$\mathbf{T_s} = \frac{\mathbf{T_i} \times \mathbf{S}}{\mathbf{L}}$$

Une fois cette durée de la phase S déterminée, il est aisé de calculer la durée totale du cycle cellulaire. Nous avons en effet vu précédemment que :

$$\frac{N_s}{N_t} \propto \frac{T_s}{T_c}$$

Ns correspondant à la fraction S et Nt le nombre total de cellules en prolifération dans la région observée (évalué grossièrement grâce au nombre de cellules de la ZMC marquées au Hoechst, la formule permettant de calculer la durée totale du cycle cellulaire est la suivante :

$$\mathbf{T_c} = \frac{\mathbf{T_s} \times \mathbf{N_t}}{\mathbf{S}}$$

▪ L'EdU cumulatif

La technique d'EdU cumulatif permet de connaître la durée de la phase S ainsi que la durée totale du cycle cellulaire. En appliquant des durées croissantes d'incorporation d'EdU, il est possible de suivre une proportion grandissante de cellules marquées jusqu'à atteindre un plateau correspondant à l'ensemble des cellules prolifératives de la ZMC (Nt). Sachant que le moment auquel le plateau est atteint correspond à Tc-Ts et que la fraction de cellules EdU+

estimée au temps 0h est, d'après ce que j'ai précédemment décrit, égale à $(T_s/T_c)*GF$, on peut déduire de ces deux équations à deux inconnues la T_s et la T_c (**Figure 64**).

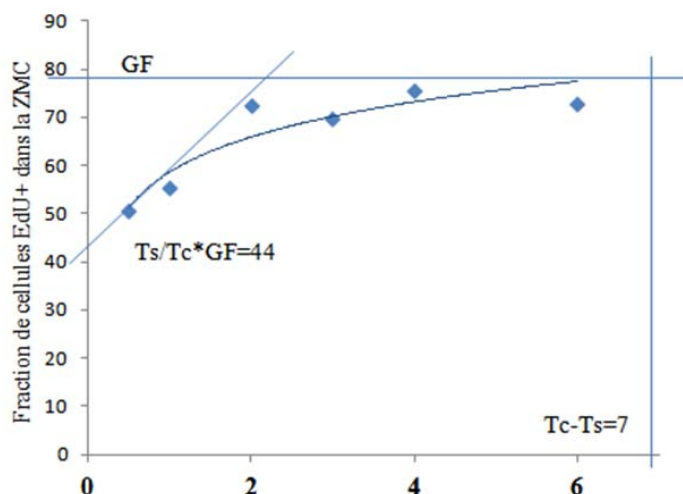


Figure 64 : Courbe de détermination des durées du cycle cellulaire. Le plateau est atteint à $7h=T_c-T_s$ pour une fraction GF correspondant à 78%. L'estimation de la fraction de cellules EdU+ au temps $t=0h$ est de 44. Partant de deux équations à deux inconnus, les durées T_s et T_c peuvent être calculées.

Protocole commun pour le double marquage et l'EdU cumulatif : Après les traitements pharmacologiques, les embryons sont anesthésiés dans du MS222 à 0,4 g/L. L'IddU, le CldU (10 mM, Sigma) ou l'EdU (1 mM, Invitrogen) est injecté dans leur vitellus. La durée d'incorporation avant fixation des embryons dépend du type d'expérience. Pour les expériences d'EdU cumulatif, les embryons sont fixés la nuit à 4°C en PFA 4% (paraformaldéhyde) après des durées croissantes d'incorporation d'EdU, puis déshydratés en éthanol et, après une nuit en butanol, inclus en paraffine. Ils sont par la suite coupés au microtome (épaisseur de 12 μm). La détection de l'EdU incorporé s'effectue avec le kit Click-iT® EdU Imaging (Molecular Probes). Pour le double marquage, l'IddU et le CldU sont identifiés par l'utilisation des anticorps primaires cités précédemment après un démasquage à l'acide chlorhydrique (HCl, 2N, 45min). Enfin la révélation se fait à l'aide des anticorps secondaires suivants : Anti-rat 594 (rouge), 1/1000 (Invitrogen) pour le CldU; Anti-mouse 488 (vert), 1/1000 (Invitrogen) pour l'IddU.