



HAL
open science

Rôle des répresseurs transcriptionnels Hes1/4 dans la maintenance des cellules souches rétinienne chez *Xenopus laevis*

Warif Abdelhamid El Yakoubi

► **To cite this version:**

Warif Abdelhamid El Yakoubi. Rôle des répresseurs transcriptionnels Hes1/4 dans la maintenance des cellules souches rétinienne chez *Xenopus laevis*. Biologie du développement. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA11T052 . tel-00743085

HAL Id: tel-00743085

<https://theses.hal.science/tel-00743085v1>

Submitted on 18 Oct 2012

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.

THESE

Présentée par

El Yakoubi Warif Abdelhamid

En vue d'obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris-Sud

Titre

**Rôle des répresseurs transcriptionnels *Hes1/4* dans la
maintenance des cellules souches rétiniennes chez *Xenopus
laevis***

**Unité UPR 3294 "Neurobiologie et Développement"
Équipe "Cellules souches et neurogenèse dans la rétine"**

**Discipline: REPRODUCTION - DEVELOPPEMENT
Ecole Doctorale BIO-SigNE**

Soutenue le 01 Octobre 2012

Membre du Jury :

Pr. Anne-Hélène Monsoro-Burq
Pr. Eric Bellefroid
Dr. Fabienne Pituello
Dr. Laure Bally-Cuif
Dr. Muriel Perron
Dr. Morgane Locker

Président du Jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse
Co-Directeur de thèse

REMERCIEMENT

Ce document de thèse est une occasion pour moi de remercier les personnes, qui d'une façon directe ou indirecte, participées à l'aboutissement de ce travail.

Ma reconnaissance va en premier lieu à mes parents qui durant mes études et durant ces années de thèse n'ont cessé de m'encourager et de me soutenir.

Je remercie mon directeur de thèse Muriel Perron qui m'a accueilli dans son équipe et qui a mis à ma disposition les moyens nécessaires qui m'ont permis de mener à bien ce travail. Merci pour ton encadrement, ta patience, ton enthousiasme et pour ta disponibilité. Merci enfin pour la relecture de ce manuscrit de thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mon Co-directeur de Thèse Morgane Locker

Morgane, tu as su me fournir un excellent encadrement et guidé mes premiers pas dans la recherche. Tu as su me communiquer ta rigueur scientifique et ton goût du travail bien fait. Les conseils que tu m'as prodigués pendant ces années de thèse, ont toujours été clairs et succincts, me facilitant grandement la tâche. Enfin merci pour le temps que tu as consacré pour redonner de la rigueur à ma plume qui a tendance à dérapier.

Je remercie également Philippe Vernier de m'avoir accueilli dans son laboratoire ainsi que toutes les équipes du *NED* avec lesquels j'ai partagé les intéressants meetings du lundi ainsi que les vendredi de l'INAF.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude à Fabienne Pituello et à Eric Bellefroid d'avoir bien voulu accepter la charge de rapporteur. Vous étiez l'œil critique de ce manuscrit, tant sur le fond que sur la forme. Merci pour le temps que vous avez consacré pour corriger et juger ce travail.

Je remercie également à Laure Bally-Cuif d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse ainsi qu'à Anne Hélène Monsoro-Burq qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider cette commission d'examen.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance à Andrés Mazabraud, Jean-pierre Muller, et Dario Cohen qui m'ont fait découvrir la biologie de développement, pour leur sympathie et leur encouragement pendant ma thèse.

Une pensée particulière à Maurice Wegnez qui aujourd'hui, n'est plus parmi nous il m'a donné le goût de la biologie de développement

Mes remerciements vont ensuite à mes « collègues de paillasse » :

Caroline Borday pour les discussions scientifiques et sa bonne humeur,

Karine Parain pour ces conseils techniques qui commencent toujours par « Warif !! Si tu veux faire une bonne thèse... »,

Pauline Cabouchette pour sa bonne humeur, Marie-Ange Richard pour sa joie de vivre,

Magdalena Hidalgo et Guillermo Véga-Lopez pour leur sympathie,

Nicolas Mazurier pour ses aides et discussions,

Ferdinand Kaya pour ces conseils et son encouragement,

Odile Bronchain pour ces nombreux conseils et discussions fructueuses,

Enfin aux nombreux stagiaires qui sont passés par le labo, et à tous les anciens, partis vers de nouveaux horizons, plus particulièrement Gabriel Colozza à qui j'exprime mon amitié.

Bien sûr, je voudrais aussi adresser un merci plus particulier à quelques personnes qui m'ont beaucoup marqué durant ces années de thèse : Christophe de Medeiros, pour avoir gâté nos petites grenouilles, pour nos discussions et pour les parties de pêche tôt le matin dans lesquelles on a appris à être patient et résistant au froid.

Un grand Merci à Albert Chesneau pour m'avoir appris la technique de transgénèse, et pour les discussions scientifiques, et je remercie aussi sa petite famille.

Un immense remerciement à Johanna Hamdache. Pendant ces années de thèse, j'ai trouvé en elle un soutien sans réserve. Elle a cru en moi et j'ai pu bénéficier de ces compétences techniques, de ces connaissances et de son aide pour amener à bien mon projet de thèse. Toujours présente pour me pousser vers l'avant et toujours bienveillante, je l'ai considéré comme une mère et c'est pour cela qu'elle est devenue « *Ma Maman de France* ».

Je n'oublie pas mes collègues drosophilistes, Patricia Uguen, Olivier Fayol, Duy Nguyen que je remercie fortement.

Merci aussi à tous mes amis qui se reconnaîtront ici, qui ont compté beaucoup pour moi ces dernières années : Ana Lucia, Houssein Chalhoub, Malak Safi, Nathalie Printemps, Juan-Martinez Sanz, Julien Vautier, Cédric Biasaka, Amina Ayad, Radia Boudjenah, Hani Salmane et Clément Tanimola.

Enfin mes dernières pensées vont à mes parents : Mohamed El Yakoubi et Tama Naciri, à mes frères : Yassin et sa femme Jamila, Marouan, Youssef et Youness, à mes nièces : les petites lumières Nawar et Malak et à mon neveu le petit ange Safouane, que je remercie pour leur soutien et leur amour sans faille.

A mon Père et à ma Mère

A mon frère Marouan

Je dédie.....

RESUME

Contrairement aux mammifères, la rétine des amphibiens et des poissons croît tout au long de la vie de l'animal grâce à l'activité de cellules souches neurales présentes dans une région de neurogenèse continue appelée zone marginale ciliaire (ZMC). Leur caractérisation moléculaire et la compréhension des mécanismes qui sous-tendent leur activité et leur maintenance pourraient trouver des applications majeures dans le traitement par thérapie cellulaire des patients atteints de pathologies neurodégénératives de la rétine.

Au cours de ma thèse, je me suis principalement penché sur deux problématiques majeures : quelle est l'origine ontologique de ces cellules souches adultes et comment se maintiennent-elles au cours de la rétino-genèse embryonnaire ? J'ai abordé ces deux questions *via* l'analyse descriptive et fonctionnelle de deux gènes, *Hes1* et *Hes4*, identifiés dans mon laboratoire comme des marqueurs spécifiques des cellules souches rétinienne. Ces gènes codent pour des répresseurs transcriptionnels de type bHLHO.

L'étude de leur dynamique d'expression au cours du développement montre que ces gènes marquent un territoire restreint, situé initialement à la frontière entre l'épithélium pigmenté rétinien (EPR) présomptif et la rétine neurale, dont l'évolution au cours du temps suggère qu'il est à l'origine de la cohorte des cellules souches adultes. Ces résultats permettent pour la première fois de proposer que ces dernières seraient ségréguées très tôt au cours de l'embryogenèse rétinienne des cellules destinées à se différencier.

Je me suis ensuite posé la question du rôle de *Hes1/4* dans la maintenance de ces cellules souches présomptives. Mes expériences de gain de fonction suggèrent que ces gènes contribuent de façon autonome cellulaire (i) à les empêcher de se différencier vers un destin EPR ou neuronal, (ii) à les maintenir en prolifération et (iii) à ralentir leurs divisions. Enfin, j'ai également travaillé à positionner les gènes *Hes1/4* dans le réseau de signalisation qui contrôle les cellules souches rétinienne en étudiant leur régulation par les voies Wnt, Hedgehog et Notch. L'ensemble de mes données me permet de proposer un modèle selon lequel les facteurs *Hes1/4*, sous contrôle positif de la voie Wnt, permettent au cours du développement la maintenance à l'état indifférencié et en prolifération lente d'une population cellulaire destinée à former la cohorte des cellules souches adultes de la ZMC.

SOMMAIRE

Résumé	1
Sommaire	2
Liste des illustrations	5
Liste des abréviations.....	7
I. Introduction.....	10
1. Le xénope : un modèle d'étude du développement embryonnaire.....	10
1.1. De la biologie du développement à la biologie moléculaire	10
1.2. La génétique et la génomique pour étudier le développement chez le xénope	11
2. Les grandes étapes du développement de la rétine	12
2.1. Anatomie de l'œil et de la rétine des vertébrés.....	13
2.1.1. Les tuniques de l'œil	13
2.1.2. Structure de la rétine	14
2.2. Morphogenèse et histogenèse rétiniennes	15
2.2.1. Vue d'ensemble de la morphogenèse rétinienne.....	15
2.2.2. La spécification des champs optiques	18
2.2.3. Le patterning des 3 territoires rétiniens : tige optique, rétine neurale et épithélium pigmenté	20
2.2.4. Histogenèse embryonnaire de la rétine neurale : contrôle de la détermination cellulaire.....	23
2.2.5. Histogenèse embryonnaire de la rétine neurale : contrôle de la prolifération cellulaire.....	29
2.2.6. Rétinogenèse post-embryonnaire chez les poissons et les amphibiens.....	36
3. Les cellules souches rétiniennes chez les Vertébrés	38
3.1. Des cellules souches rétiniennes adultes chez les mammifères ?	38
3.1.1. Un dogme bouleversé par la découverte de cellules souches dans le corps ciliaire de la rétine des mammifères.....	38
3.1.2. Les autres sources de cellules souches neurales potentielles	40
3.1.3. Les enjeux nés de la découverte de cellules souches neurales rétiniennes chez les mammifères	41
3.2. État de l'art des connaissances actuelles sur les mécanismes contrôlant la maintenance et la prolifération des cellules souches rétiniennes adultes	43
3.2.1. Principales voies de signalisation impliquées	43
3.2.2. Les facteurs intrinsèques	47

3.3. La ZMC du xénope pour trouver des nouveaux marqueurs des cellules souches rétiniennes	48
3.3.1. Les marqueurs connus des cellules souches de la ZMC	48
3.3.2. Principe du crible à grande échelle	49
3.3.3. Les nouveaux marqueurs identifiés.....	50
4. Les facteurs HES : inhibiteurs transcriptionnels de type bHLH-O	51
4.1. Les facteurs de transcription Hairy and Enhancer of Split	51
4.1.1. Structure et domaines conservés des facteurs Hairy and Enhancer of Split	51
4.1.2. Mécanismes de répression transcriptionnelle.....	54
4.2. Rôles multiples des gènes <i>Hes</i> au cours du développement embryonnaire	55
4.2.1. Des cibles de la voie Notch.....	55
4.2.2. Une implication dans des processus développementaux divers.....	57
4.2.3. Rôles dans les cellules souches adultes, la quiescence et l'oncogenèse	61
4.3. Rôles des gènes <i>Hes1/4</i> dans les cellules souches et précurseurs neuraux embryonnaires 65	
4.3.1. <i>Hes1</i> et maintenance des précurseurs neuraux au cours du développement du système nerveux 65	
4.3.2. Le cas de <i>Hes4</i>	72
5. Objectifs de mon travail de thèse	73
II. Matériels et méthodes	75
1. Embryons et lignée transgénique.....	75
2. Traitements pharmacologiques.....	75
3. Oligonucléotides Morpholinos	76
4. Vecteurs d'expression.....	76
5. Micro-injection et lipofection <i>in vivo</i>	77
6. Hybridation <i>in situ</i>	78
7. Marquages au BrdU ou à l'EdU	78
8. Immunocytochimie sur coupes cryostat et paraffine.....	78
9. Analyse des paramètres du cycle cellulaire	79
10. Rétro-transcription et PCR quantitative en temps réel	79
11. Western Blot	80
12. Quantification et tests statistiques	80
13. Transgenèse	80
III. Résultats	81

1. Expression, régulation et fonction du gène <i>Hes4</i> au cours de la rétino-genèse embryonnaire	81
1.1. Résumé des principaux résultats	81
1.1.1 Profil d'expression de <i>Hes4</i>	81
1.1.2 Régulation de <i>Hes4</i>	82
1.1.3 Analyse fonctionnelle de <i>Hes4</i>	82
1.2. Conclusions	83
2. Expression, régulation et fonction du gène <i>Hes1</i> au cours de la rétino-genèse embryonnaire	84
2.1. Profil d'expression de <i>Hes1</i> et comparaison avec <i>Hes4</i>	84
2.2. Régulation de <i>Hes1</i> et comparaison avec <i>Hes4</i>	86
2.3. Analyse fonctionnelle de <i>Hes1</i> et comparaison avec <i>Hes4</i>	91
2.3.1. Perte de fonction	91
2.3.2. Gain de fonction	93
3. Établissement de lignées transgéniques rapportrices de l'expression d'<i>Hes4</i>	97
4. Mise au point d'outils génétiques pour l'étude des gènes <i>Hes1/4</i> dans les cellules souches adultes	101
IV. Discussion et perspectives	105
1. Les gènes <i>Hes1/4</i> : des outils pour comprendre l'ontogenèse des cellules souches rétinienne-s adultes	106
2. Les gènes <i>Hes1/4</i> : des gènes requis pour la maintenance d'un pool de cellules souches au cours de la rétino-genèse embryonnaire ?	107
3. Comment les facteurs <i>Hes1/4</i> contrôlent-ils les propriétés prolifératives des cellules souches rétinienne-s présumptives ?	107
4. Les gènes <i>Hes1/4</i> sont-ils des cibles clefs des interactions Wnt/Hedgehog dans le contrôle des cellules souches rétinienne-s ?	108
5. Quels modes d'action, partenaires et interactants pour les facteurs <i>Hes1/4</i> ?	111
V. Bibliographie	112
VI. Annexe	144

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Coupe transversale schématique de l'œil humain adulte.

Figure 2 : Étapes de spécification des cellules souches rétiniennes.

Figure 3 : Représentation schématique du développement de la rétine chez la souris.

Figure 4 : Patron d'expression des EFTFs au cours de la spécification des champs optiques.

Figure 5 : Réseau moléculaire impliqué dans le patterning de la vésicule optique et la différenciation de l'EPR.

Figure 6 : Les étapes de la rétinogenèse.

Figure 7 : Le modèle de compétence des précurseurs rétiniens.

Figure 8 : La voie de signalisation Notch.

Figure 9 : La voie de signalisation Sonic-Hedgehog (Shh) chez les vertébrés.

Figure 10 : La voie de signalisation Wnt chez les Vertébrés.

Figure 11 : Organisation de la ZMC.

Figure 12 : **A.** Représentation schématique d'un œil de vertébré adulte (section transversale).

B. Agrandissement de la région contenant le corps ciliaire.

Figure 13 : **A.** Modèle du rôle de la voie Hedgehog dans la ZMC. **B-E.** Modèle d'interaction des voies Wnt and Hedgehog dans la ZMC post-embryonnaire.

Figure 14 : Analyse comparative de l'expression de gènes bHLHO dans la ZMC.

Tableau 1 : Orthologues probables de diverses protéines bHLHO humaines chez d'autres vertébrés d'après une analyse phylogénétique.

Figure 15 : Structure et domaines conservés des facteurs Hes.

Figure 16 : Schéma des structures des sous-familles de facteurs bHLH-O.

Figure 17 : Modes de répression des facteurs Hes.

Figure 18 : Hes1 régule la différenciation des cellules pancréatiques.

Figure 19 : Les gènes Hes sont des oscillateurs moléculaires.

Figure 20 : L'oscillation de la voie Notch régule la maintenance des cellules souches neurales.

Figure 21 : Les différents modes d'expression de *Hes1* pendant le développement du système nerveux.

Figure 22 : Comparaison par hybridation *in situ* des profils d'expression des gènes *Hes1/4* au cours de la rétinogenèse.

Figure 23 : Les voies Wnt et Hedgehog régulent positivement l'expression embryonnaire de *Hes1*.

Figure 24 : L'expression embryonnaire du gène *Hes1* est indépendante de la voie Notch.

Figure 25 : Régulation de l'expression des gènes *Hes1/4* dans la ZMC post-embryonnaire.

Figure 26 : La perte de fonction du gène *Hes1* perturbe fortement la formation de l'œil.

Figure 27 : La surexpression du gène *Hes1* inhibe les destinées neuronales et EPR.

Figure 28 : La surexpression de *Hes1* maintient les précurseurs rétiniens en prolifération.

Figure 29 : La surexpression du gène *Hes1* ralentit la vitesse du cycle cellulaire.

Tableau 2. Paramètres du cycle cellulaire mesurés dans le neuroépithélium rétinien au stade 25.

Figure 30 : Analyse des animaux transgéniques rapporteurs de l'activité du promoteur *Hes4a* (génération F0).

Figure 31 : Analyse des animaux transgéniques rapporteurs de l'activité du promoteur *Hes4a* (génération F1).

Figure 32 : Carte du plasmide *Hes1GR-pHSHSG2*.

Figure 33 : Mise au point de l'expression inductible d'un transgène par choc thermique chez le têtard.

LISTE DES ABREVIATIONS

AC	Amacrine Cells = cellules amacrines
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARNi	Acide ribonucléique interférent
A-Sc	Achaete-Scute
Ath	Atonal homolog
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate
BET	Bromure d'éthidium
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
bHLH-LZ	basic Helix-Loop-Helix et Leucine-Zipper
BIO	6-3'-oxime-bromoindirubin
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BrdU	5-Bromo-2'-deoxy-uridine
BSA	Bovine Serum Albumin
CB	Ciliary Body = Corps Ciliaire
CDKI	Cyclin Dependant Kinase Inibitors = Inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines
CE	Ciliary Epithélium = épithélium ciliaire
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
Cr	Cristallin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DAPT	N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester
DEX	Dexaméthasone
DIG	Digoxygénine
DMLA	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge
DLL1	delta-like1
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium-propane
DRPs	Definitive embryonic Retina-producing Precursors
EDTA	Éthylène Diamine tetra Acétate
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
EFTFs	Eye Field Transcription Factors
EGF	Epidermal Growth Factor
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
EPR	Epithélium pigmenté rétinien
ES	Embryonic Stem Cells = Cellules souches embryonnaires
EST	Expressed Sequence Tag
EtOH	Ethanol
FGF	Fibroblast Growth Factor
Fzd	Frizzled
Fu	Fused
GCL	Ganglion Cell Layer = couche des cellules ganglionnaires
GF	Growth Fraction

GFP	Green Fluorescent Protein
GR	Glucocorticoid receptor = récepteur aux glucocorticoïdes
GS	Goat Serum
HC	Horizontal Cells = cellules horizontales
HCl	Acide chlorhydrique
HDACs	Histones désacétylases
Her	<u>H</u> airy and <u>e</u> nhancer of <u>s</u> plit <u>r</u> elated
Hes	Hairy and Enhancer of split (E(spl))
Hsp70	Heat shock protein 70
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
Ihh	Indian Hedgehog
INL	Inner Nuclear Layer = couche nucléaire interne
IPL	Inner Plexiform Layer = couche plexiforme interne
iPS	Induced Pluripotent Stem cells
IWR-1	4-(1,3,3a,4,7,7a-Hexahydro-1,3-dioxo-4,7-methano-2H-isoindol-2-yl)-N-8-olonyl-Benzamide
KCl	Chlorure de potassium
Lfng	Lunatic fringe
Lhx2	LIM homeobox 2
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
MBS	Modified Barths Saline
MC	Müller Cells = cellules gliales de Müller
MEM	MOPS EGTA MgSO ₄
MetOH	Méthanol
MHB	Midbrain/Hindbrain Boundary
Mitf	Microphtalmic-associated transcription factor
Mo	Oligonucléotide Morpholino
MS222	Ethyl3-aminobenzoate methanesulfonate Salt
NaCl	Chlorure de sodium
NBT	Nitro blue tetrazolium chloride
NO	Nerf Optique
NGF	Nerve Growth Factor
NICD	Notch Intracellular Domain = domaine intracellulaire de Notch
NP40	Nonyl phenoxypolyethoxyethanol
Nr2e1	Nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1 ou tailless
NTMT	NaCl Tris MgCl ₂ Tween-20
OCT	Optimal Cutting Temperature
ONL	Outer Nuclear Layer = couche nucléaire externe
OPL	Outer Plexiform Layer = couche plexiforme externe
Otx2	Orthodenticle homeobox 2
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldéhyde
pH3	Phospho-Histone 3
PKA	Protéine Kinase A
PSM	Presomitic Mesoderm = mésoderme présomitique
Pth	Préthalamus
PR	Photorécepteurs

PTw	PBS Tween
qPCR	PCR quantitative en temps réel
Rb	Retinoblastoma tumor suppressor
RC	Rétine Centrale
REMI	Restriction-Enzyme-Mediated Integration
RN	Rétine Neurale
RP	Rétinite Pigmentaire
RSCs	Retinal Stem Cells = cellules souches rétiniennes
RT	Room Temperature = température ambiante
Rx1/Rax	Retina and anterior neural fold homeobox
SDS	Sodium dodécylsulfate
SFRP	Secreted Frizzled Related Protein
SGZ/DG	Zone subgranulaire du gyrus denté
Shh	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
Six3	Six homeobox 3
Six6	Six homeobox 6
SSC	Saline Sodium Citrate
Su(Fu)	Suppressor of fused
SVZ/LV	Zone sous ventriculaire du ventricule latéral
Tbx3	T-box 3 ou ET
TBE	Tris Borate EDTA
TCF	T-cell specific transcription factor
T _{G1}	Durée de la phase G1
T _{G2}	Durée de la phase G2
TGF α	Transforming Growth Factor α
TGF β 1/2	Transforming Growth Factor β 1/2
Th	Thalamus
T _M	Durée de la phase M
TNX	Tris NaCl triton
TN	Tube Neural
T _S	Durée de la phase S
VO	Vésicule Optique
VP16	Herpes simplex virus protein 16
ZMC	Zone Marginale Ciliaire
ZLI	Zona Limitans Intrathalamica

I. INTRODUCTION

1. Le xénope: un modèle d'étude du développement embryonnaire

Les amphibiens en général, et le xénope plus particulièrement, servent de modèles d'étude du développement embryonnaire. Les premières observations ont montré leurs extraordinaires capacités à régénérer des parties de leurs corps, notamment leurs membres. En 1780, des expériences ont indiqué que certains urodèles (tritons et salamandres) pouvaient notamment régénérer leurs yeux après une ablation partielle (king, 1905). Le développement externe des amphibiens et la facilité de maintenir leurs embryons en culture ont permis l'essor de l'embryologie expérimentale, avec la mise au point de techniques telles que les transplantations et l'isolation d'explants. Dans les années 1960, le crapaud à griffe, *Xenopus laevis* devient le modèle favori des chercheurs. Cela vient du fait que la ponte est inductible par injection d'hormone, que les œufs collectés sont de grande taille (~1½ mm) et que leur développement est synchrone. Ce dernier est de plus très rapide : par exemple, 14h suffisent après fécondation pour l'apparition des domaines de la future rétine (champs optiques), et moins de trois jours pour former des rétines fonctionnelles (Witkovsky et al., 1976).

1.1. DE LA BIOLOGIE DU DEVELOPPEMENT A LA BIOLOGIE MOLECULAIRE

Grâce à ces propriétés, les embryologistes ont établi de nombreux principes de la biologie de développement. Ils ont pu mettre en lumière les phénomènes fondamentaux de détermination, de spécification, de formation des axes, d'induction, etc. L'utilisation du xénope, associée au développement de la biologie moléculaire a permis d'étudier en détail les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents. Les œufs de xénope permettent de réaliser des expériences de micro-injection d'ADN, d'ARN ou de protéines. La créativité des chercheurs a permis de modifier ces molécules pour générer des protéines constitutivement actives, inductibles, dominantes négatives ou à activités hypermorphique ou antimorphique, afin d'étudier les effets de gain et de perte de fonction de gènes d'intérêt (Sive et al., 2000). Les expériences de perte de fonction peuvent aussi être réalisées en utilisant des ARN antisens, des ARNi et des oligonucléotides morpholinos (Heasman et al., 2000); (Nakano et

al., 2000); (Steinbeisser et al., 1995) ; (Zhou et al., 2002).

Par ailleurs, le lignage cellulaire des différents blastomères (cellules issues des premières divisions) est bien connu. Par exemple, il a été démontré que la majorité des cellules rétiniennes (>50%) proviennent d'un seul blastomère localisé au pôle animal (Huang and Moody, 1993) ; (Moody, 1987). Par conséquent, en faisant varier l'emplacement d'injection, on peut plus particulièrement cibler les cellules et les tissus d'intérêt. Pour des analyses clonales, l'ADN, l'ARN et les morpholinos peuvent être introduits par lipofection ou électroporation (Ohnuma et al., 2002b); (Sasagawa et al., 2002).

1.2. LA GENETIQUE ET LA GENOMIQUE POUR ETUDIER LE DEVELOPPEMENT CHEZ LE XENOPE

En plus des techniques citées précédemment, la transgénèse chez le xénope s'est considérablement développée (Chesneau et al., 2008). La génération de lignées transgéniques permet l'étude de régions promotrices des gènes (expériences de lignage, lignées rapportrices) et ouvre de nouvelles perspectives pour les études fonctionnelles *via* la mise au point de systèmes d'expression inductible et ciblée (protéines actives ou dominantes négatives placées sous le contrôle d'un promoteur tissu spécifique par exemple). Ces dernières années, des techniques précédemment utilisées chez la drosophile, la souris et le poisson zèbre ont été développées chez le xénope. Parmi elles, les méthodes d'expression inductible FLP-FRT ou Cre-loxP, ainsi que les systèmes d'induction par choc thermique (promoteur *Hsp70*) et promoteurs sensibles à la tétracycline (Chae et al., 2002) ; (Li and Rohrer, 2006) ; (Ridgway et al., 2000) ; (Roose et al., 2009) ; (Waldner et al., 2006) ; (Werdien et al., 2001) ; (Wheeler et al., 2000) ; (Rankin et al., 2009).

Très récemment, une ressource de plasmides modulables (appelée pTransgenesis) a été développée. Elle comprend quatre types de constructions, chacune contenant un des éléments indispensables à la réalisation d'un vecteur de transgénèse : (i) des gènes de sélections, (ii) des marqueurs fluorescents (ou potentiellement toute autre séquence codante), (iii) des promoteurs spécifiques et (iv) des séquences facilitant l'intégration dans le génome. Ces constructions sont recombinaisons entre elles et permettent donc de cloner aisément le vecteur de transgénèse de son choix en associant à loisir les quatre types de plasmides (Love et al., 2011). Cette ressource constitue un progrès énorme qui devrait faciliter la génération d'animaux transgéniques et le transfert de technologies de transgénèse entre espèces.

Les inconvénients de *Xenopus laevis* sont sa pseudotétraploïdie et le temps de génération qui est long (1-2 ans). Cela a mené à adopter l'espèce diploïde *Xenopus tropicalis* dans les laboratoires. Outre son avantage pour les études génétiques, cette espèce a permis de développer des approches génomiques (Harland and Grainger, 2011). En effet, son génome est totalement séquencé, alors que celui de *X. laevis* n'est pas encore complet. Les séquences ADN des deux espèces sont suffisamment proches pour réaliser des expériences de microarray ou d'hybridations *in situ* chez l'un à partir de sondes faites à partir du génome de l'autre (Chalmers et al., 2005) ; (Khokha et al., 2002). Ces nouvelles techniques ainsi que les informations sur le xénope que l'on peut trouver sur le site web Xenbase (<http://www.xenbase.org/>), couplées à l'ancienne école de l'embryologie expérimentale, permettent au xénope d'être un modèle de choix pour l'analyse des bases moléculaires des processus développementaux, dont la rétino-genèse étudiée dans mon laboratoire.

2. Les grandes étapes du développement de la rétine

Le développement du système nerveux central, et plus particulièrement celui de l'œil, ont attiré l'attention des chercheurs depuis les trois derniers siècles. Le professeur belge Daniel Van Duyse (1852-1924) fut le premier à publier des travaux liés à des malformations du nerf optique, l'absence d'iris, la cyclopie, etc. Dans la même période, le professeur Ida Mann (1883-1983) développa le domaine de l'ophtalmologie et à cet effet, elle rédigea plusieurs livres décrivant la formation de l'œil dont celui de l'homme. Mais c'est à partir de 1902 que le biologiste allemand Hans Spemann établit les bases réelles du développement de l'œil. Dans le chapitre 3 de son livre intitulé « Embryonic development and induction », il décrit l'origine embryonnaire de l'œil chez les amphibiens. Ces travaux et ceux de Bautzmann, Holtfreter, Mangold et Adelman mettent notamment en évidence les phénomènes d'induction et de spécification des champs optiques : Spemann résume les découvertes de son équipe : « from his experiments we may conclude that before the commencement of neurulation, the determination of the eye-rudiment is labile, that it gradually becomes stable during gastrulation, and that it becomes finally established in the neurula stage ». L'apparition de nouvelles technologies, notamment en biologie moléculaire, en génétique et en génomique, a permis des avancées considérables dans la compréhension des processus qui gouvernent le développement de l'œil et sont à l'origine des malformations citées ci-dessus.

2.1. ANATOMIE DE L'ŒIL ET DE LA RETINE DES VERTEBRES

2.1.1. Les tuniques de l'œil

L'œil des vertébrés se compose de trois couches ou tuniques (Figure 1):

- La tunique externe composée elle-même de deux couches ; la plus externe, appelée sclérotique (ou « blanc de l'œil »), est un tissu rigide et opaque qui protège et donne sa forme à l'œil. La deuxième couche, la cornée, est un tissu transparent situé à l'avant de l'œil et qui laisse la lumière entrer dans celui-ci.
- La tunique uvéale ou uvée, formée de trois éléments distincts, l'iris, le corps ciliaire et la choroïde; la choroïde est composée d'un abondant lit capillaire, source principale de l'approvisionnement en sang de la rétine. Vers l'avant de l'œil, prolongeant la choroïde, le corps ciliaire est une structure musculaire formant un anneau qui entoure le cristallin et qui permet la régulation de sa forme. L'élément le plus antérieur de l'uvée est l'iris, partie colorée de l'œil que l'on peut voir à travers la cornée. Il comprend deux groupes de muscles qui permettent d'ajuster la taille de la pupille (l'ouverture située au centre de l'iris).
- La tunique interne de l'œil, ou rétine à proprement parler, contient des neurones sensibles à la lumière et capables de transmettre les signaux visuels aux centres encéphaliques. Les détails sur la structure de la rétine seront présentés dans le paragraphe qui suit.

En plus, l'œil contient deux milieux ;

- L'humeur aqueuse qui est sécrétée par le corps ciliaire dans la chambre postérieure de l'œil, entre le cristallin et l'iris. Elle apporte les nutriments nécessaires à ces deux structures.
- L'humeur vitrée qui remplit l'espace entre l'arrière du cristallin et la rétine. Elle contribue à maintenir la forme de l'œil et, de plus, elle contient des cellules caractérisées par leurs activités phagocytaires qui font disparaître le sang et les débris qui pourraient interférer avec la transmission de la lumière.

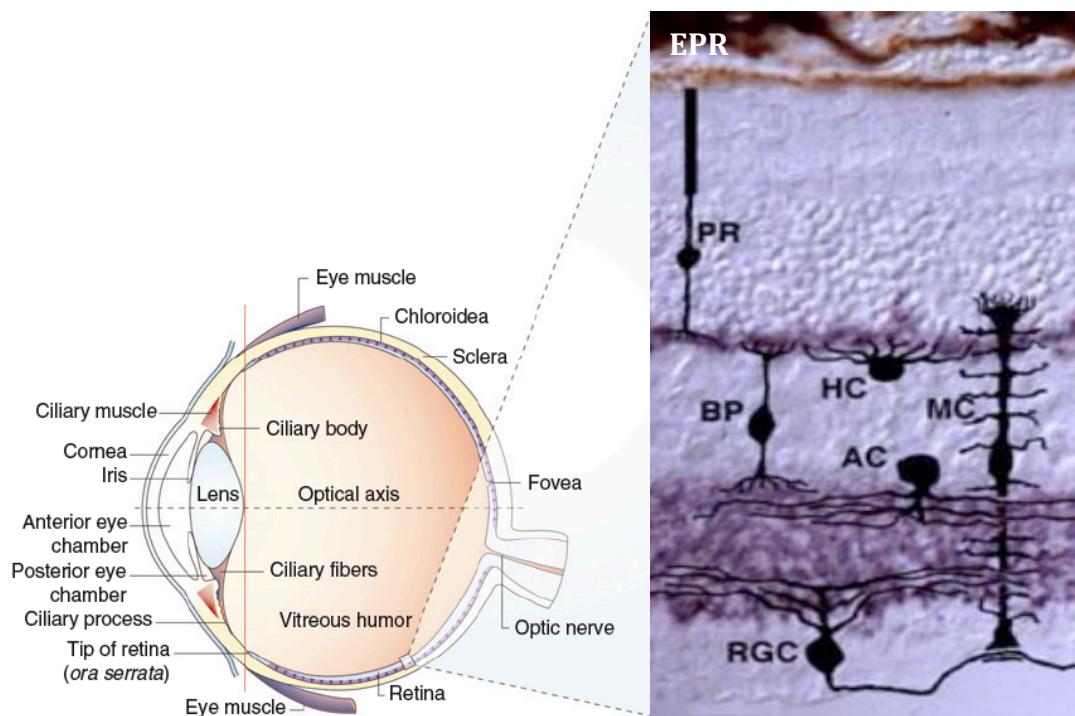


Figure 1 : Coupe transversale schématique de l'œil humain adulte.

La ligne verticale divise le segment antérieur de l'œil (la cornée, le cristallin, l'iris et le corps ciliaire) du segment postérieur (composé principalement de l'humeur vitrée, la rétine et la choroïde). La lumière pénètre dans l'œil à travers la cornée, la chambre antérieure, et la lentille. Avant qu'elle ne rencontre la rétine, la lumière doit passer à travers le corps vitré. Le schéma sur la droite montre une vue rapprochée des composants de la rétine, qui sont (de l'extérieur vers l'intérieur de la rétine) : les cellules de l'épithélium pigmenté rétinien (EPR), les photorécepteurs (PR), les cellules gliales de Müller (MC), les cellules horizontales (Boucher and Hitchcock), les cellules bipolaires (BP), les cellules amacrines (AC) et les cellules ganglionnaires (RGC). INL/ONL : Couches nucléaires interne/externe ; IPL/OPL : Couches plexiformes interne/externe. Adapté (Graw, 2010).

2.1.2. Structure de la rétine

La rétine, comme il est mentionné auparavant, est la seule partie nerveuse de l'œil et elle permet de transformer les signaux lumineux en impulsions nerveuses qui parcourent le nerf optique vers le cerveau. Elle fait partie du système nerveux central et contient six types cellulaires organisés en trois couches (Figure 1) :

i) La couche cellulaire externe (ONL ; Outer Nuclear Layer) est composée des corps cellulaires des photorécepteurs, cônes et bâtonnets.

ii) La couche cellulaire interne (INL ; Inner Nuclear Layer) contient les trois types d'interneurones (cellules horizontales, bipolaires et amacrines) ainsi que les corps cellulaires des cellules gliales de Müller.

iii) La couche la plus interne (GCL ; Ganglion Cell Layer) contient des cellules amacrines dites « déplacées » mais surtout les corps cellulaires des cellules ganglionnaires. Les axones de ces dernières forment le nerf optique qui connecte la rétine au cerveau.

Ces couches cellulaires sont séparées par les couches plexiformes externe (OPL ; Outer Plexiform Layer) et interne (IPL ; Inner Plexiform Layer).

Outre ce tissu nerveux, la rétine est entourée d'une monocouche de cellules pigmentaires appelée « épithélium pigmenté rétinien » (EPR). L'EPR est impliqué dans différents processus biologiques parmi lesquels la réduction de la réflexion parasite de la lumière qui pénètre dans l'œil et l'entretien des photorécepteurs *via* le renouvellement des pigments photosensibles et la phagocytose des disques des photorécepteurs dont le renouvellement rapide est indispensable à la vision.

2.2. MORPHOGENESE ET HISTOGENESE RETINIENNES

2.2.1. Vue d'ensemble de la morphogenèse rétinienne

Pendant les toutes premières divisions cellulaires chez le xénope, quelques cellules embryonnaires pluripotentes possèdent la compétence à devenir des cellules rétiniennes (Zaghloul et al., 2005). À partir de ce pool cellulaire se détache un groupe de cellules dites DRPs (« Definitive embryonic Retina-producing Precursors »). Des expériences de lignage et transplantation ont en effet montré qu'au stade 32 cellules, seuls 9 blastomères situés au pôle animal sont compétents à générer les rétines (Huang and Moody, 1993). Par la suite, ces derniers produiront les cellules à l'origine des tissus de la rétine mature (Figure 2). Pendant la gastrulation, ces cellules rétiniennes sont disposées dans un seul territoire présomptif de la rétine localisé au centre du futur prosencéphale (cerveau antérieur). Une fois la ligne médiane mise en place, ce domaine est scindé en deux régions ou « champs optiques », à l'origine des rétines droite et gauche.

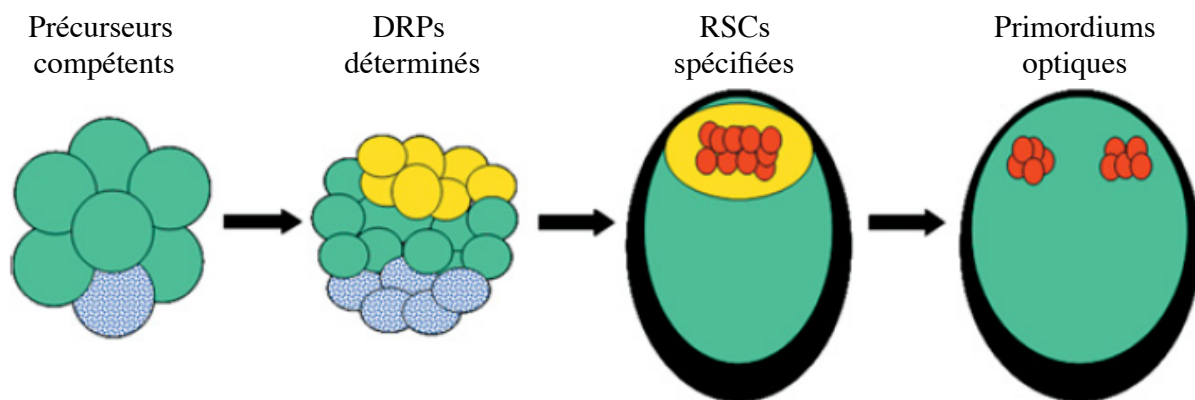


Figure 2 : Étapes de spécification des cellules souches rétiniennes.

La spécification des cellules souches rétiniennes embryonnaires (RSCs) se déroule en plusieurs étapes. Tout d'abord, une sous-population de cellules embryonnaires du pôle animal (en vert) devient compétente pour contribuer à la rétine. Ensuite, un sous groupe de blastomères compétents (DRPs ou « Definitive embryonic Retina-producing Precursors », en jaune) se détermine en réponse à des signaux rétino-géniques. La descendance de ces derniers génère les RSCs (en rouge) à l'extrémité antérieure de la plaque neurale. Au cours de la neurulation, les RSCs se séparent en deux primordiums optiques droit et gauche. D'après (Zaghloul et al., 2005).

Pendant la neurulation, de part et d'autre du diencéphale, apparaissent deux dépressions qui s'évagent vers l'ectoderme superficiel pour former les vésicules optiques (Figure 3 a, b). Ces dernières vont induire l'ectoderme à former les placodes cristalliniennes qui seront à l'origine des futurs cristallins. À partir de là, les vésicules optiques vont s'invaginer en cupules optiques (Figure 3 c, d). Les mécanismes responsables de ce phénomène d'invagination restent controversés : des travaux montrent que c'est étroitement dépendant d'une induction par les placodes cristalliniennes (Ashery-Padan et al., 2000), alors que d'autres, très récents, affirment qu'il s'agit d'un comportement totalement indépendant de ces régions (Eiraku et al., 2011).

La cupule optique est formée de deux couches qui suivent deux évolutions différentes : la couche externe donnera l'épithélium pigmenté rétinien et la couche interne, proche du cristallin formera la rétine neurale. Par ailleurs, la partie proximale ventrale de la vésicule optique s'amincit et s'allonge pour former la tige optique, futur nerf optique. C'est par cette structure que passeront les axones des cellules ganglionnaires sortant de la rétine et les vaisseaux sanguins venant irriguer celle-ci (Figure 3e).

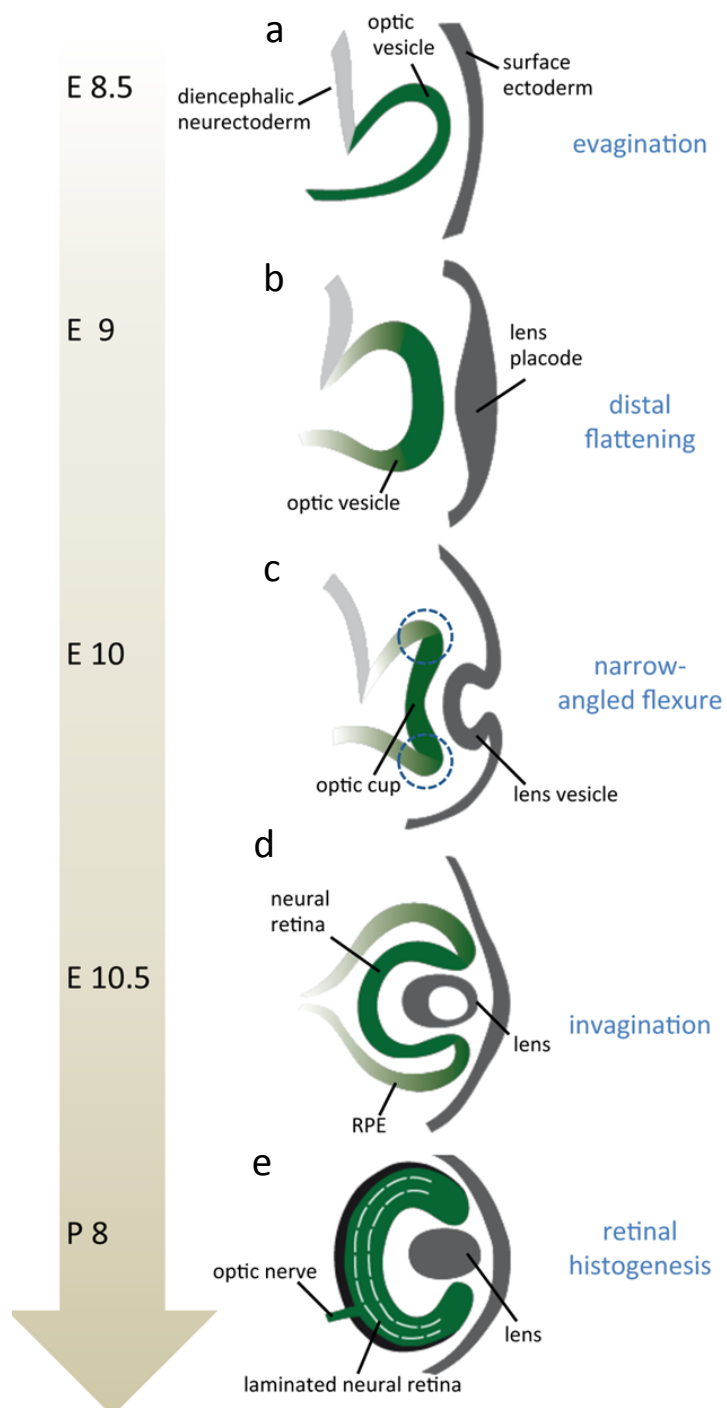


Figure 3 : Représentation schématique du développement de la rétine chez la souris.

Au cours du développement embryonnaire, la vésicule optique (en vert) s'évagine à partir du diencephale (a) et entre en contact avec l'ectoderme superficiel qui s'épaissit alors pour former les placodes cristalliniennes (b). La paroi extérieure de la vésicule optique s'invagine ensuite pour former la cupule optique (c). Sa couche proximale forme l'EPR, tandis que sa couche distale constitue la rétine neurale (d). L'histogenèse et la lamination consécutive de la rétine neurale commencent vers E10,5 et s'achèvent en période post-natale (e). D'après (Colozza et al., Accepted).

2.2.2. La spécification des champs optiques

Pendant les années 90, un énorme progrès a été réalisé *via* l'identification des facteurs de transcription qui s'expriment dans les champs optiques et qui régulent leur formation. Ces gènes sont regroupés sous le nom d'EFTFs pour « Eye Field Transcription Factors » (Zuber et al., 2003) ; (Zuber, 2010). Ils sont très conservés chez les animaux possédant un système de vision, c'est-à-dire depuis la drosophile jusqu'à l'homme.

Parmi ces gènes, figurent *Otx2* (*Orthodenticle homeobox 2*), *Six3* (*Six homeobox 3*), *Rx1* (ou *Rax*, *Retina and anterior neural fold homeobox*), *Pax6* (*Paired box 6*), *Lhx2* (*LIM homeobox 2*), *Six6* (*Six homeobox 6*, également appelé *Otx2*), *Tbx3* (*T-box 3* ou *ET*) et *Nr2e1* (*Nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1* ou *tailless*). Pendant la gastrulation, l'expression de ces EFTFs est restreinte à une bande qui chevauche le territoire présomptif de la rétine (Figure 4). Quand la ligne médiane est mise en place, elle sécrète la protéine Sonic Hedgehog (*Shh*) qui réprime l'expression des EFTFs et sépare par la suite leur domaine d'expression en deux spots latéraux qui correspondent aux champs optiques (Li et al., 1997) ; (Yang, 2004).

Ces facteurs jouent d'importants rôles dans la spécification des champs optiques. Chez le xénope, les poissons et les rongeurs, leur perte de fonction engendre de sévères défauts allant de la réduction de la taille de la rétine jusqu'à sa perte totale (Graw, 2010). À l'inverse, leur surexpression groupée dans des cellules naïves du pôle animal au stade blastula rend ces dernières capables de former des yeux ectopiques après transplantation sur le flanc d'embryons (Vicizian et al., 2009).

Les chercheurs ont décortiqué, par la suite, les mécanismes par lesquels ces EFTFs régulent la spécification des champs optiques. Les résultats qu'ils ont obtenus suggèrent les points suivants :

i) Ils sont régulés et régulent eux-mêmes des voies de signalisation qui « patternent » le système nerveux. Parmi celles-ci figurent les voies BMP (Bone Morphogenetic Protein), FGF (Fibroblast Growth Factor), Wnt, Nodal et l'acide rétinoïque. Par exemple, l'inhibition de la voie de signalisation BMP est essentielle pour l'induction neurale et pour la formation des champs optiques. Ainsi, la surexpression de BMP4 sous le contrôle du promoteur *Pax6* chez des têtards transgéniques réprime l'expression de *Otx2* et de *Rx1* ce qui provoque la perte des yeux (Hartley et al., 2001). L'inhibition de la voie BMP dans les champs optiques est assurée

entre autres par le répresseur transcriptionnel Six3 *via* sa fixation sur le promoteur du gène codant BMP4 (Gestri et al., 2005).

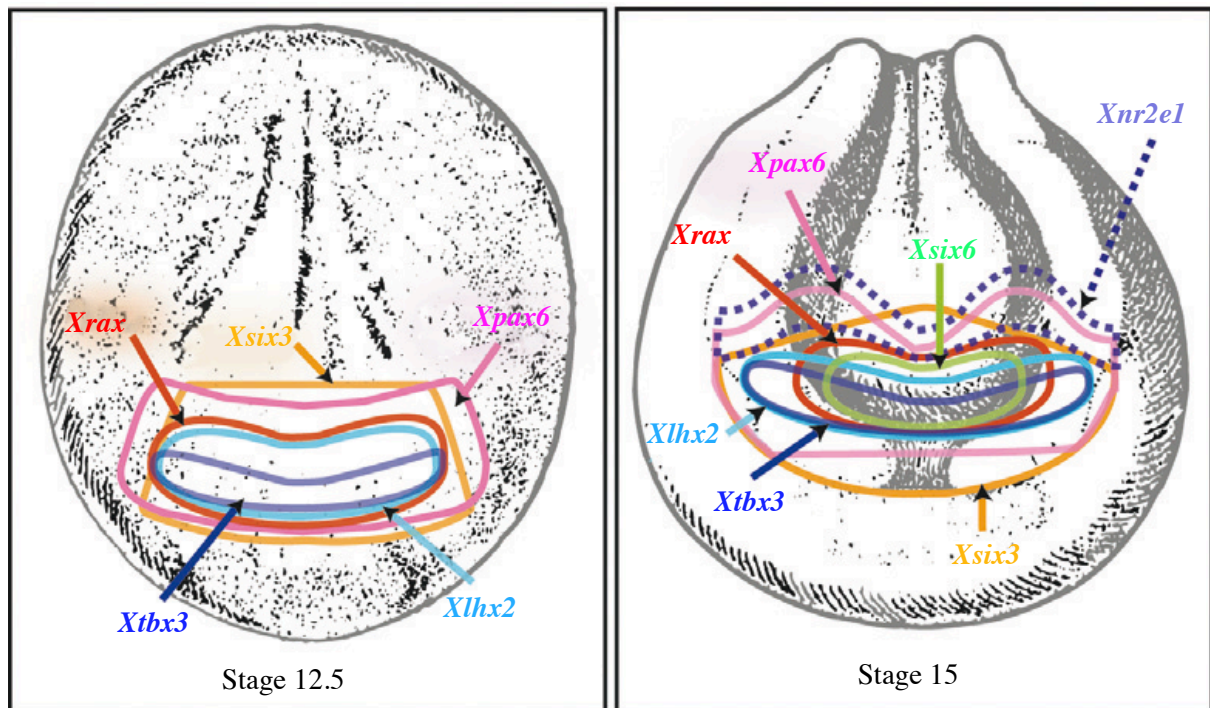


Figure 4 : Patron d'expression des EFTFs au cours de la spécification des champs optiques.

Profils d'expression des EFTFs aux stades 12,5 et 15 chez le Xénope, montrant leur chevauchement pendant la spécification des champs optiques. Les domaines d'expression de ces gènes en dehors des champs optiques à ces stades n'ont pas été inclus pour plus de clarté. Illustrations adaptées de (Nieuwkoop and Faber, 1994). D'après (Zuber, 2010).

ii) Ils sont impliqués dans le contrôle de la migration cellulaire. Pendant la gastrulation et la neurulation, des mouvements cellulaires sont à l'origine de la mise en place des trois feuilletts embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme) ainsi que de la plaque neurale. Ces migrations sont régulées par l'activité et l'interaction de plusieurs facteurs. Des travaux ont montré que les EFTFs contrôlent la migration des cellules à l'origine de la rétine. En effet, la surexpression des gènes *Otx2*, *Rx1* et *Pax6* dans les cellules du pôle végétal (qui ne participent pas normalement à la formation de la rétine) provoque la migration de ces dernières vers la plaque neurale et les champs optiques (Kenyon et al., 2001).

iii) Ils jouent un rôle dans le maintien de la prolifération des cellules des champs optiques. Chez le xénope, la différenciation des cellules du neuroectoderme commence juste après la gastrulation. Les cellules des champs optiques sont, elles, maintenues en prolifération pour générer un nombre suffisant de cellules rétinienne. Je vais détailler ce troisième point dans le

paragraphe 2.2.5.1.

iv) Les travaux de Zuber et d'autres, ont montré que les EFTFs interagissent entre eux soit pour potentialiser leurs effets (Zuber et al., 2003) soit pour réguler leur expression (Zuber et al., 1999) ; (Zuber et al., 2003) ; (Terada et al., 2006) ; (Danno et al., 2008).

Il a également été montré que les EFTFs et la spécification des précurseurs rétiniens étaient régulés par la voie purinergique (Masse et al., 2007). Enfin, très récemment, Levin et ses collègues ont effectué un travail remarquable montrant un rôle instructif du potentiel de membrane dans l'induction de l'œil et l'expression des EFTFs. Ils ont en effet trouvé que les précurseurs rétiniens exhibent une hyperpolarisation caractéristique. L'altération de cette polarisation, chez le xénope, provoque la perte des yeux suite à la diminution de l'expression de *Rx1* et de *Pax6* (Pai et al., 2012).

2.2.3. Le patterning des 3 territoires rétiniens : tige optique, rétine neurale et épithélium pigmenté

Les cellules des champs optiques sont multipotentes et à l'origine de tous les types cellulaires de la rétine. À la fin de l'évagination de la vésicule optique, cette dernière est subdivisée en trois territoires présomptifs : la rétine neurale, l'EPR et la tige optique. Le premier provient de la portion distale de la vésicule optique, le deuxième de sa région dorsale (Hirashima et al., 2008) ; (Kagiyama et al., 2005) ; (Furimsky and Wallace, 2006) ; (Fuhrmann, 2010) et le troisième de sa portion ventrale (Figure 5A). Comment les précurseurs sont-ils spécifiés pour former l'un de ces trois territoires ?

La protéine Shh (Sonic Hedgehog), qui provient de la ligne médiane, influence les précurseurs de la partie ventrale pour devenir la future tige optique (Graw, 2010). Sa surexpression agrandit le domaine de la tige optique aux dépens de la rétine neurale. Il a été montré, chez le xénope et chez le poisson zèbre que cette surexpression promeut l'expression de *Pax2*, marqueur de la tige optique, et inhibe celle de *Pax6*, marqueur de la rétine neurale (Ekker et al., 1995) ; (Macdonald et al., 1995) ; (Perron et al., 2003). Ces deux facteurs se répriment mutuellement pour établir la frontière entre la rétine neurale et la tige optique (Schwarz et al., 2000). En plus de *Pax2*, Shh stimule dans la région ventrale l'expression de *Vax2*, un gène essentiel à l'établissement de la polarité dorso-ventrale rétinienne (Mui et al., 2005).

La spécification de l'EPR implique deux gènes clés : *Otx2* et *Mitf* (*Microphthalmic-associated transcription factor*) ; (Bharti et al., 2006). Ce dernier code une protéine à

domaines basic helix-loop-helix et leucine-zipper (bHLH-LZ) qui active l'expression de gènes indispensables à la différenciation des cellules pigmentaires tels que *Dct*, *Tyrp1* et *tyrosinase* (Bharti et al., 2006) ; (Martinez-Morales et al., 2004). Chez la souris, l'expression de *Mitf* s'étend initialement dans toute la vésicule optique puis se retreint à l'EPR (Fuhrmann, 2010) ; (Nguyen and Arnheiter, 2000). Chez le poulet il s'exprime spécifiquement dans l'EPR (Mochii et al., 1998). Différents facteurs de transcription et voies de signalisation contrôlent son expression (Figure 5B). Parmi eux, Pax2 et Pax6 sont capables de se fixer sur son promoteur et contribuent de façon redondante à son expression dans l'EPR chez la souris (Baumer et al., 2003). La transcription de *Mitf*, comme celle d'*Otx2*, est également positivement régulée par la voie de signalisation Wnt/ β -catenin, comme cela a été démontré chez le poulet et la souris (Westenskow et al., 2010) ; (Fujimura et al., 2009). La voie FGF contribue quant à elle à limiter l'expression de *Mitf* à l'EPR en réprimant son expression dans la rétine neurale, *via* l'induction du facteur Chx10 (également appelé Vsx2) (Horsford et al., 2005) ; (Bharti et al., 2008). Enfin, la différenciation de l'EPR est assurée par plusieurs voies de signalisation dont la voie Hedgehog. Chez le xénope, son inhibition entraîne une absence d'expression des marqueurs de l'EPR différencié (Perron et al., 2003).

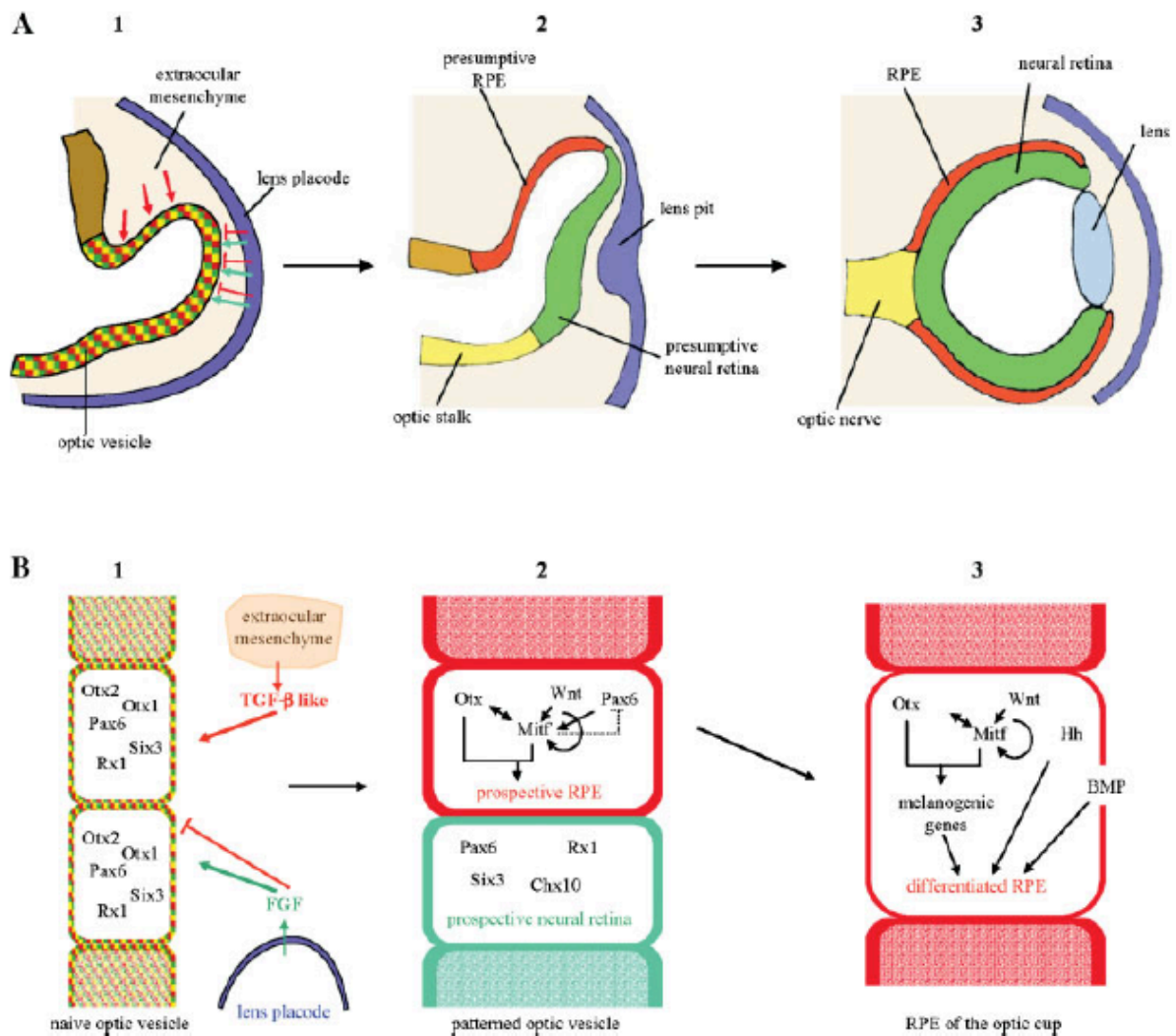


Figure 5 : Réseau moléculaire impliqué dans le patterning de la vésicule optique et la différenciation de l'EPR.

A. Représentation schématique de la transition d'une vésicule optique non structurée (1) à une vésicule optique où les territoires de l'EPR, de la rétine neurale et de la tige optique sont définis (2) puis à une cupule optique (3). **B.** Composants moléculaires impliqués dans le patterning de la vésicule optique. Dans l'étape (1), toutes les cellules neuroépithéliales apparaissent semblables (code couleur mixte) et expriment un ensemble commun de facteurs de transcription. Les signaux $TGF\beta$ provenant des cellules mésenchymateuses extraoculaires favorisent la formation de l'EPR (flèche rouge), tandis que les signaux FGF provenant de la placode cristallinienne la répriment (ligne rouge). Ces derniers activent en revanche la spécification de la rétine neurale (flèche verte). Dans l'étape suivante (2), les territoires présomptifs de l'EPR (en rouge) et de la rétine neurale (en vert) acquièrent une identité moléculaire propre et expriment des facteurs de transcription spécifiques. L'interaction et l'activité de ces facteurs (Otx2, Pax6, Mitf) sous contrôle des voies de signalisation Wnt, BMP et Hedgehog permettent la différenciation de l'EPR (3). D'après (Martinez-Morales et al., 2004).

La formation de la rétine neurale requiert essentiellement l'action des voies de signalisation FGF/MAP kinase et BMP (Figure 5B) qui sont nécessaires aussi pour l'initiation ultérieure de la neurogenèse rétinienne. Les ligands et les récepteurs de la voie FGF/MAP kinase sont abondants dans les milieux oculaire et extraoculaire. La surexpression de FGF/MAPK transforme toute la rétine, y compris l'EPR, en rétine neurale chez le xénope, le poulet et les rongeurs (Fuhrmann, 2010). À l'inverse, l'ablation des placodes cristalliniens, sources de FGF1/2, empêche la formation de la rétine neurale (Hyer et al., 1998) ; (Pittack et al., 1997). Le même phénotype est observé chez les mutants perte de fonction BMP (Morcillo et al., 2006) ; (Murali et al., 2005). D'autres expériences ont pu démontrer que le facteur Chx10 agit en aval des voies FGF/MAP kinase et BMP pour la spécification de la rétine neurale. Après la spécification de la rétine neurale le processus de la rétinogenèse peut commencer.

2.2.4. Histogenèse embryonnaire de la rétine neurale : contrôle de la détermination cellulaire

L'histogenèse de la rétine neurale chez les vertébrés (Figure 6A) passe par 5 étapes majeures :

- i)** Acquisition de l'identité précurseur rétinien pendant les stades vésicule et cupule optiques (McCollum et al., 2007) ; (Zaghloul and Moody, 2007).
- ii)** Expression des facteurs de transcription impliqués dans la détermination des différents types cellulaires (Inoue et al., 2002) ; (Kageyama et al., 2005).
- iii)** Sortie du cycle cellulaire (Dyer and Cepko, 2000) ; (Dyer and Cepko, 2001a) ; (Dyer and Cepko, 2001b) ; (Park et al., 2005) ; (Shkumatava and Neumann, 2005).
- iv)** Expression des facteurs impliqués dans la différenciation (Sernagor, 2006) ; (Harada et al., 2007).
- v)** Maturation des cellules neuronales et gliales.

La première étape de la rétinogenèse implique la fonction des EFTFs décrits précédemment. Dans cette partie et la suivante, je présenterai un aperçu des facteurs impliqués dans les 2^{ème} et 3^{ème} étapes.

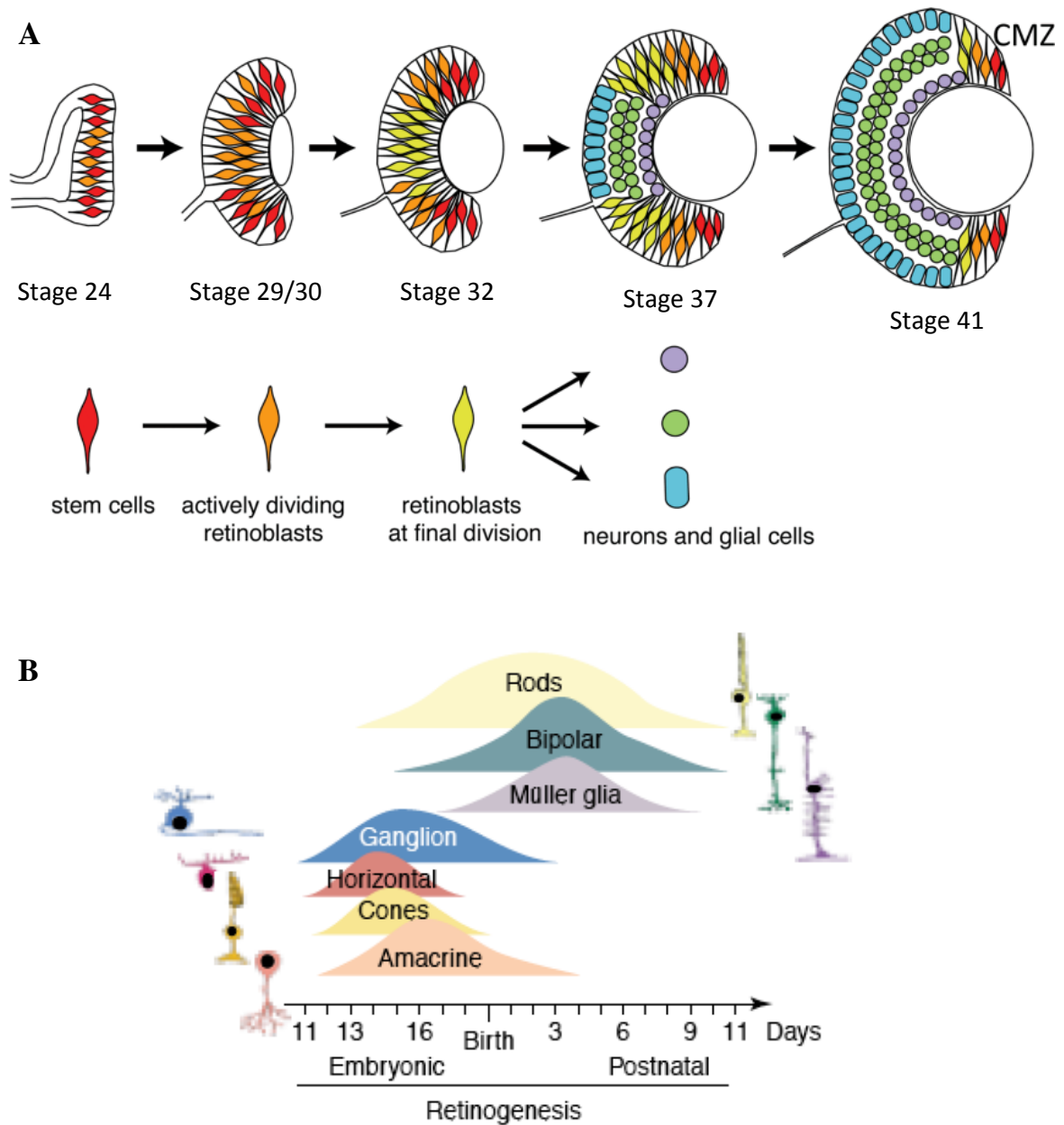


Figure 6 : Les étapes de la rétino-genèse.

A. Représentation schématique de l'histogenèse rétinienne chez le xénope. D'après (Bilitou and Ohnuma, 2010). **B.** Génèse des différents types cellulaires chez la souris (ordre conservé chez tous les vertébrés). Les chiffres correspondent aux jours de la phase embryonnaire et du développement post-natal. D'après (Marquardt and Gruss, 2002).

2.2.4.1. *Genèse conservée des différents types cellulaires chez les Vertébrés*

Dans la rétine neurale, les précurseurs rétinien vont progressivement générer six types de neurones et un type de cellules gliales. Ces différentes cellules naissent dans un ordre conservé chez tous les vertébrés. Les cellules ganglionnaires sont les premières à se déterminer et à sortir du cycle, suivies des cônes et des horizontales, puis des cellules

amacrines, des bâtonnets, des cellules bipolaires et finalement des cellules gliales de Müller (Livesey and Cepko, 2001) ; (Andreazzoli, 2009). Il doit cependant être noté que malgré cet ordre très conservé, il existe un chevauchement, plus ou moins important selon les espèces, de la genèse de ces différents types cellulaires (Figure 6B).

Des expériences de lignage cellulaire ont montré que tous ces types cellulaires peuvent provenir d'un seul progéniteur, ce qui montre la multipotence de ce dernier (Turner et al., 1990) ; (Wetts and Fraser, 1988). Qu'est ce qui détermine le destin des précurseurs rétiniens et qu'est-ce qui limite le répertoire de cellules pouvant être générées à un moment donné ? Pour répondre à cette question deux modèles ont été proposés : le premier stipule que les précurseurs sont homogènes et que leur destin est imposé par l'environnement alors que le deuxième propose une hétérogénéité intrinsèque qui biaise leur choix de destin.

2.2.4.2. *Rôle des facteurs environnementaux*

Chez la plupart des espèces, une vague de différenciation s'initie au centre de la rétine et se propage vers sa périphérie. La voie de signalisation FGF est importante pour l'initiation de cette vague neurogénique (Martinez-Morales et al., 2005). Chez le poisson zèbre, sa propagation est ensuite contrôlée par la protéine Shh. Cette dernière, sécrétée par les premières cellules ganglionnaires formées, induit la différenciation neuronale et sa propre expression dans les précurseurs alentours, propageant ainsi la vague de proche en proche (Neumann and Nüsslein-Volhard, 2000) ; (Shkumatava et al., 2004) ; (Stenkamp et al., 2000). Cette fonction n'est cependant pas conservée chez les mammifères et chez le poulet. Dans ces espèces en effet, Shh est également produit par les cellules ganglionnaires mais il inhibe leur différenciation, illustrant le rétrocontrôle négatif que des cellules différenciées exercent sur leur propre production (Wang et al., 2002) ; (Wang et al., 2005) ; (Zhang and Yang, 2001) ; (Sakagami et al., 2009). D'autres facteurs, tel que le FGF, se substituerait à Shh pour propager la vague neurogénique dans ces espèces (McCabe et al., 1999). Néanmoins, il a été proposé que Shh induirait à des stades plus tardifs la différenciation d'autres types cellulaires, comme c'est le cas chez le rat où il est impliqué dans la genèse des photorécepteurs (Levine et al., 1997) ou chez la souris où il semble requis pour la production des cellules bipolaires et gliales (Wang et al., 2002).

De nombreux autres facteurs comme le TGF α (Transforming Growth Factor α), l'EGF (Epidermal Growth Factor) le NGF (Nerve Growth Factor), le LIF (Leukemia Inhibitory Factor) ou le CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) ont prouvé leur capacité à

induire ou inhiber certaines destinées rétiniennes (Marquardt, 2003). En général cependant, ces signaux environnementaux ne font qu'altérer les proportions relatives de chaque type cellulaire à un moment donné mais ne peuvent pas influencer les précurseurs à produire des types cellulaires temporellement inappropriés.

2.2.4.3. *Le modèle de compétence*

De nombreuses études sont en faveur du deuxième modèle où chaque précurseur rétinien semble être contrôlé par des facteurs intrinsèques qui le déterminent à générer un type ou un groupe de cellules spécifiques. Ceci a historiquement été montré par des expériences d'hétérochronie, qui consistent à placer des précurseurs isolés à un stade de développement donné dans un environnement d'un autre âge (précoce ou tardif). Il a ainsi été montré que des précurseurs précoces continuent à générer des types cellulaires précoces lorsqu'ils sont cultivés dans un environnement tardif et *vice-versa* (Morrow et al., 1998) ; (Belliveau and Cepko, 1999) ; (Rapaport et al., 2001). À partir de ces résultats et d'autres, Livesey et Cepko ont proposé le modèle de compétence (Figure 7), qui stipule que la détermination des types cellulaires dans la rétine repose sur une compétence intrinsèquement régulée des précurseurs à répondre à des signaux environnementaux et que ces états de compétence changent au cours du temps. Ceci implique qu'à un moment donné un précurseur n'est capable de générer qu'un nombre limité de types cellulaires. Au cours du développement, ils vont perdre leur compétence à générer les cellules dites précoces pour acquérir la compétence à générer les cellules tardives. L'étude du transcriptome de précurseurs individuels a confirmé que les progéniteurs rétiniens présentent une grande hétérogénéité dans le temps mais également à chaque stade développemental, notamment en terme de répertoire de facteurs de transcription (Trimarchi et al., 2008). Quels sont les facteurs qui sont à l'origine de ces états de compétence ?

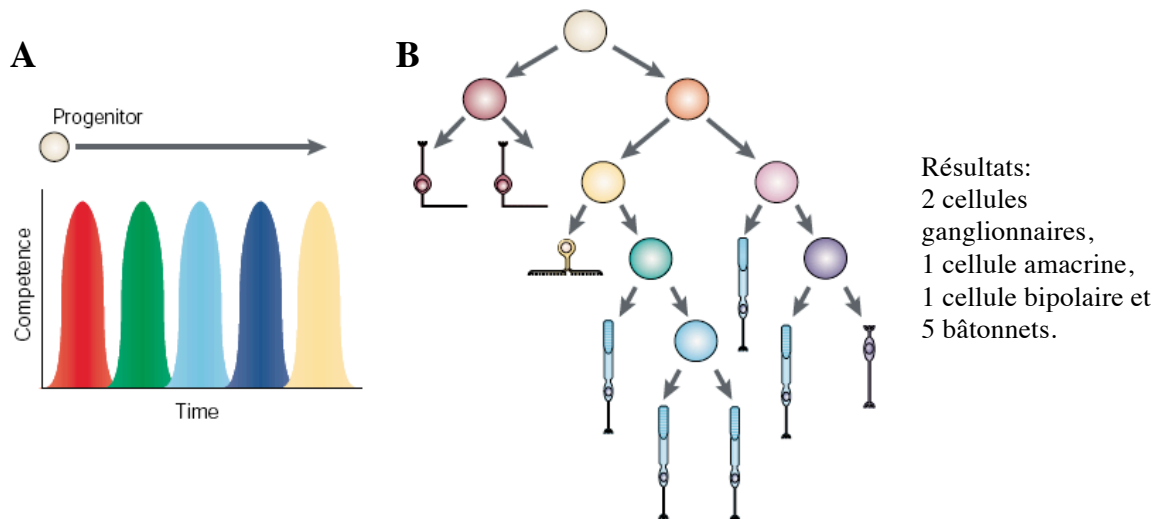


Figure 7 : Le modèle de compétence des précurseurs rétiniens.

A. Selon ce modèle, les précurseurs passent par des états de compétence distincts et successifs, indiqués par des couleurs différentes, au cours desquels ils ne peuvent générer que certains types de cellules post-mitotiques. **B.** Représentation schématique du lignage d'un précurseur multipotent au fil du temps. À chaque division, un précurseur génère deux descendants qui peuvent soit continuer à proliférer soit sortir du cycle. Les couleurs des précurseurs désignent des états différents de compétence. Notez que plusieurs précurseurs sont déterminés pour produire un destin cellulaire particulier, ici les bâtonnets (en bleu). D'après (Livesey and Cepko, 2001).

2.2.4.4. Rôle des facteurs à domaine bHLH et à homéoboîtes

La neurogenèse de la rétine fait intervenir la voie Notch/Delta (Perron and Harris, 2000). Cette voie de signalisation met en jeu une interaction de contact entre cellules avoisinantes dénommée « inhibition latérale » (Figure 8 A, B et voir aussi Figure 20A). Nous rediscuterons plus loin des nouvelles avancées dans la compréhension de ce processus et ne présenterons ici que sa vue classique, principalement acquise à la suite de travaux chez la drosophile. Delta est le ligand de Notch et son niveau d'expression fluctue dans les précurseurs. Parmi ces derniers, un va se démarquer des autres de façon stochastique et exprimer plus le ligand Delta, entraînant une activation plus importante de la voie Notch dans les cellules voisines. Celles-ci voient alors leur différenciation neuronale inhibée et leur niveau d'expression du ligand Delta baisser. La première cellule est donc en conséquence moins soumise à l'inhibition exercée par la voie Notch et peut se différencier en neurone. L'inhibition latérale implique, en aval du récepteur Notch, l'intervention de plusieurs facteurs de transcription à domaine bHLH, qui peuvent être classés en deux groupes : des activateurs transcriptionnels, ou gènes proneuraux, qui sont induit par le ligand Delta et biaisent les

cellules à devenir des neurones, et des répresseurs qui antagonisent leurs effets (Vetter and Brown, 2001). Je reviendrai sur cette dernière catégorie de facteurs en détail dans la partie 4 de cette introduction.

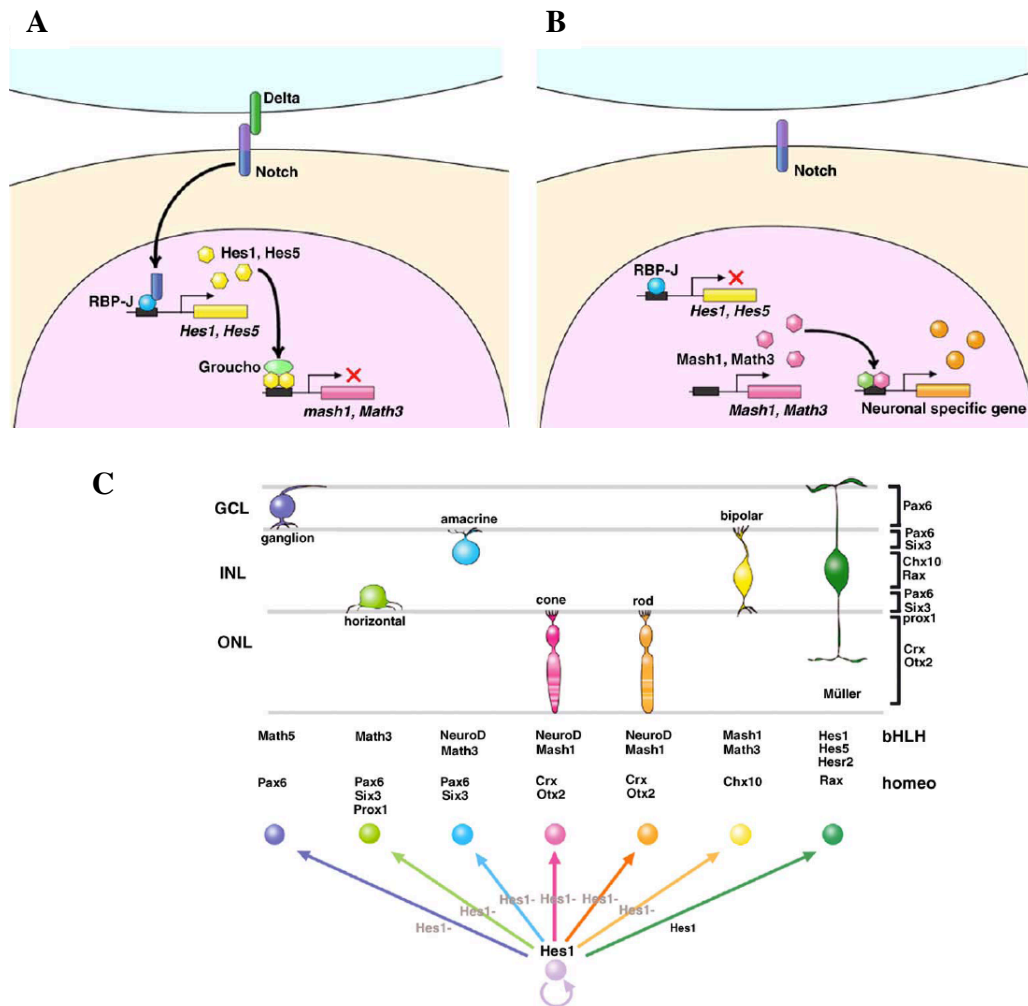


Figure 8 : La voie de signalisation Notch.

A. Après l'activation du récepteur Notch par le ligand Delta, son domaine intracellulaire (NICD) est clivé et transloqué dans le noyau. Il forme alors un complexe avec la protéine liant l'ADN RBP-J. Ce complexe induit l'expression de répresseurs bHLHO tels que Hes1 et Hes5. Ces deux facteurs répriment l'expression des gènes proneuraux et inhibent ainsi la différenciation neuronale. Ainsi, la voie Notch relie des signaux extrinsèques (Delta et Notch) à des facteurs intrinsèques (Hes1/Hes5) pour la régulation de la différenciation cellulaire. **B.** Quand Notch n'est pas activé, l'expression de Hes1/Hes5 est inhibée, permettant aux facteurs proneuraux d'induire l'expression des gènes nécessaires à la différenciation neuronale. **C.** Implication des facteurs de transcription à domaine bHLH et à homéodomaine dans la spécification des types cellulaires rétiniens. Des combinatoires spécifiques de ces facteurs de transcription sont nécessaires pour la correcte détermination de chaque type cellulaire rétinien. D'après (Hatakeyama and Kageyama, 2004).

Chez les vertébrés, il existe deux groupes de gènes proneuraux : *Ash* (*Ash1-3*) et *Ath*, respectivement, homologues de *Achaete-Scute* (*A-Sc*) et *Atonal* de la drosophile (Bertrand et al. 2002 ; Powell et al. 2008). Le deuxième groupe est subdivisé en plusieurs familles parmi lesquelles *Ath*, *Neurogenin* (*Ngn*) et *NeuroD*. Ces gènes proneuraux sont nécessaires et suffisants à l'engagement des précurseurs neuraux vers une destinée neuronale et leur combinatoire influence la genèse de types cellulaires rétiniens particuliers (Figure 8C) (Wang and Harris, 2005) ; (Ohsawa and Kageyama, 2008) ; (Andreazzoli, 2009) ; (Bassett and Wallace, 2012). Par exemple, *Atoh7* (également appelé *Math5* chez la souris et *Xath5* chez le xénope) est essentiel à la genèse des cellules ganglionnaires ; *NeuroD* et *NeuroD4* (également appelé *Math3* ou *Xath3*) sont impliqués dans la détermination des cellules amacrines ; ou encore *Ascl1* (également appelé *Mash1* ou *Xash1*) et *Ath3* dans celle des cellules bipolaires (Ohsawa and Kageyama, 2008) ; (Bassett and Wallace, 2012). Il est en outre bien établi que ces facteurs à domaine bHLH coopèrent entre autres avec des facteurs à homéodomaine dans le processus de spécification des types cellulaires rétiniens (Figure 8C) (Wang and Harris, 2005) ; (Ohsawa and Kageyama, 2008). Par exemple, la co-surexpression de *Ascl1* ou *NeuroD4* avec *Chx10* augmente le nombre des cellules bipolaires, alors que la surexpression de l'un de ces gènes seul n'a pas d'effet sur ces cellules (Hatakeyama et al., 2001).

Malgré des progrès considérables dans la description et la caractérisation de ces facteurs de transcription, la question des mécanismes qui régissent l'identité temporelle des précurseurs et le timing de leur différenciation reste largement irrésolue. En particulier la part du lignage ou de processus stochastiques dans la genèse ordonnée des différents types cellulaires est actuellement le sujet d'investigations croissantes et offre matière à débat (Bassett and Wallace, 2012). Il en est de même de l'étude des liens entre la machinerie de prolifération et la détermination cellulaire (Agathocleous and Harris, 2009).

2.2.5. Histogenèse embryonnaire de la rétine neurale : contrôle de la prolifération cellulaire

2.2.5.1. Contrôle de la prolifération des précurseurs rétiniens par des facteurs intrinsèques

De nombreuses études indiquent que les EFTFs stimulent la prolifération des précurseurs rétiniens (Agathocleous and Harris, 2009). Chez le xénope par exemple, la surexpression de *Six6*, *Rx1* ou de *Pax6* augmente la prolifération cellulaire et la taille des rétines. L'invalidation de l'un de ces gènes provoque l'effet inverse : une diminution de la

prolifération et des rétines microphthalmiques (Zuber et al., 2003) ; (Zaghloul and Moody, 2007). D'autres expériences montrent que *Rx1* maintient les précurseurs rétiniens en prolifération en réprimant l'expression du gène *p27Xic1*, un inhibiteur du cycle cellulaire, ainsi que celle des gènes proneuraux comme *Ngn-1* (Andreazzoli et al., 2003). Cet exemple illustre comment les EFTFs utilisent plusieurs mécanismes (inhibition de la différenciation neuronale et régulation de molécules clés du cycle cellulaire) pour maintenir les précurseurs rétiniens en prolifération. Il est à noter que la fonction des EFTFs varie dans le temps et en fonction du contexte cellulaire. *Pax6* par exemple est également impliqué dans le contrôle de la différenciation terminale de nombreux types cellulaires (Agathocleous and Harris, 2009).

D'autres facteurs de transcription, exprimés précocement dans la vésicule optique régulent directement la machinerie du cycle cellulaire et/ou le potentiel de différenciation. C'est le cas de *Chx10* dont l'inactivation résulte en des rétines microphthalmiques suite à l'activation de l'inhibiteur du cycle cellulaire *p27kip1* (Green et al., 2003).

2.2.5.2. *Contrôle de la prolifération des précurseurs rétiniens par des facteurs extrinsèques*

La balance entre prolifération et différenciation des précurseurs rétiniens est aussi régulée par des facteurs extracellulaires (Agathocleous and Harris, 2009). Je me limiterai ici à une brève présentation de l'implication des voies Hedgehog, Wnt et Notch sur lesquelles nous reviendrons plus loin. Ces dernières ont des rôles complexes et jouent sur divers processus cellulaires de la rétino-genèse embryonnaire. Notons qu'il est souvent très difficile de savoir si ces effets multiples sont couplés ou indépendants, s'ils varient au cours du temps et s'ils concernent tout type de progéniteurs ou seulement certaines sous-populations.

(i) Implication de la voie Hedgehog dans la prolifération des précurseurs rétiniens embryonnaires

La voie de signalisation Hedgehog (Figure 9) illustre bien cette complexité puisqu'elle contrôle à la fois la destinée de plusieurs types cellulaires, comme nous l'avons évoqué plus haut, et la prolifération des précurseurs. En outre, alors que des données chez la souris et le poulet rapportent un rôle mitogène de la voie, des données opposées obtenues chez le poisson zèbre, montrent à l'inverse son rôle actif dans la sortie du cycle cellulaire (Wallace, 2008) ; (Agathocleous et al., 2007). Ces résultats apparemment contradictoires ont pu être au moins partiellement réconciliés par des travaux menés au laboratoire qui démontrent un rôle ambivalent d'Hedgehog dans le contrôle du cycle cellulaire. En effet, l'activation de cette

voie accélère la vitesse de division des précurseurs (effet mitogène) mais induit également leur sortie prématurée du cycle cellulaire (Locker et al., 2006) ; (Agathocleous et al., 2007). Ces effets sur la cinétique du cycle ont depuis été confirmés dans la rétine de souris (Sakagami et al., 2009) mais dans cette dernière la voie Hedgehog semble requise pour maintenir le pool des précurseurs prolifératifs (Wall et al., 2009). Il semble donc qu'il existe des différences interspécifiques dans la manière dont cette voie contrôle la prolifération.

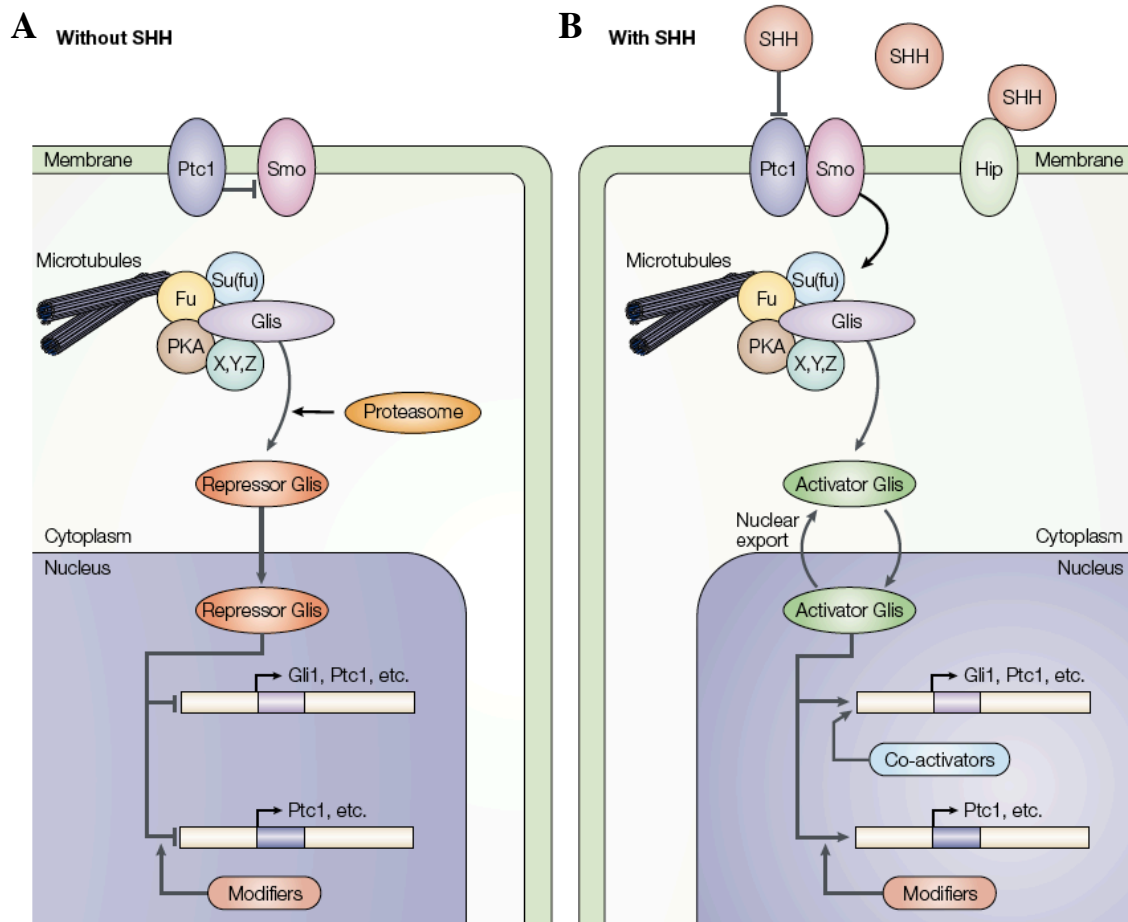


Figure 9 : La voie de signalisation Sonic-Hedgehog (Shh) chez les vertébrés.

A. En l'absence de Shh, le récepteur Patched1 (Ptc1) réprime Smoothened (Smo), inhibant ainsi la cascade de transduction en aval. Les protéines Gli sont phosphorylées par la protéine kinase A (PKA), conduisant à leur clivage par le protéasome. Clivées, ces protéines constituent des répresseurs transcriptionnels des gènes cibles de la voie. **B.** Quand Shh se fixe sur le récepteur Ptc1, l'inhibition exercée sur Smo est levée. Le complexe macromoléculaire associé au cytosquelette et qui comprend entre autres les protéines Su(fu) (Suppressor of fused), Fu (fused) et PKA, « libère » le facteur Gli qui peut alors aller activer la transcription des gènes cibles. D'après (Ruiz i Altaba et al., 2002).

(ii) Implication de la voie Wnt dans la prolifération des précurseurs rétiniens embryonnaires

La voie canonique Wnt (Figure 10) est principalement active en périphérie de la rétine chez la souris (Liu et al., 2003) ; (Liu et al., 2006) ; (Liu et al., 2007), le poulet (Cho and Cepko, 2006) et le poisson zèbre (Dorsky et al., 2002) ; (Yamaguchi et al., 2005). Elle y induit, au moins chez la souris et le poulet, la spécification des structures antérieures de l'œil à savoir corps ciliaire et iris (Liu et al., 2007) ; (Cho and Cepko, 2006). Chez le poulet, elle y semble en outre requise pour le maintien d'une activité proliférative périphérique transitoire dans une région appelée « zone marginale ciliaire » que nous détaillerons au paragraphe 2.2.6 (Kubo et al., 2003) ; (Kubo et al., 2005) ; (Kubo and Nakagawa, 2009).

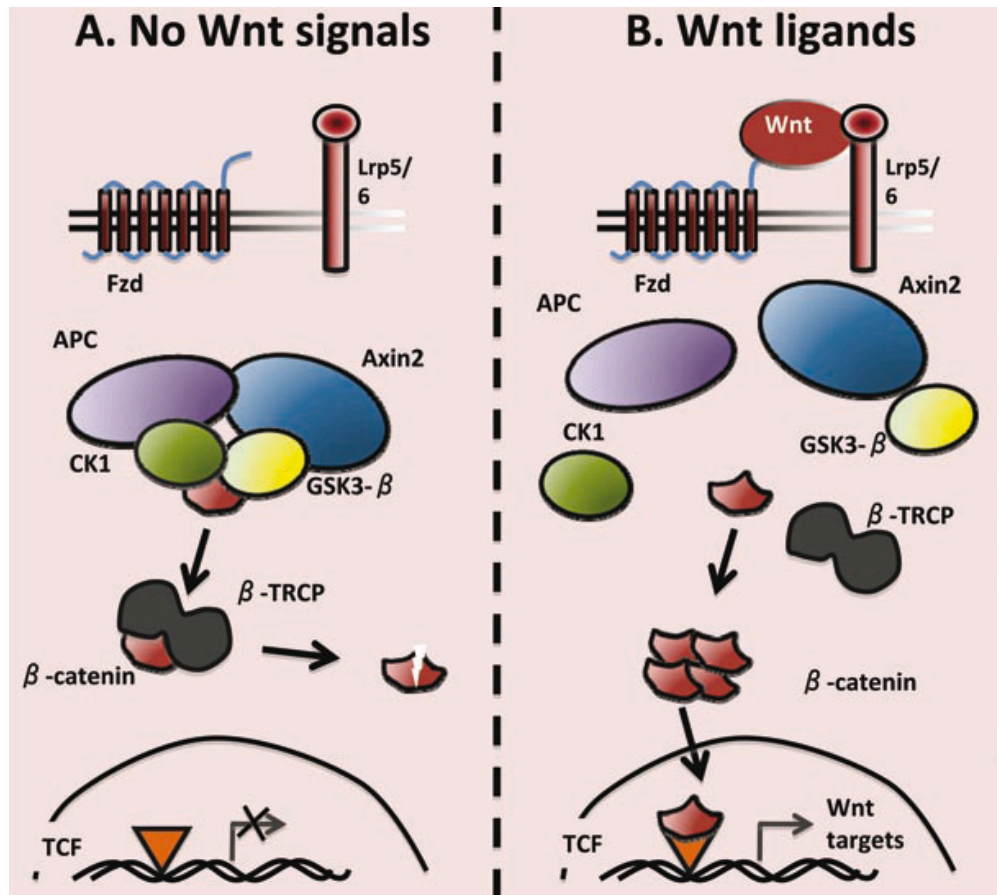


Figure 10 : La voie de signalisation Wnt chez les Vertébrés.

A. En l'absence des ligands Wnt, la protéine β -caténine est maintenue dans le cytoplasme, phosphorylée par les kinases CK1 et GSK3 β et dirigée ensuite vers le protéasome par la protéine β -TRCP. **B.** Lorsque les ligands Wnt se lient aux récepteurs Frizzled (Fzd) et LRP5/6, la β -caténine est stabilisée, s'accumule et migre vers le noyau où elle s'associe avec le répresseur TCF, transformant ce dernier en un activateur transcriptionnel des gènes cibles de la voie. D'après (De Sousa and Medema, 2012).

Le statut (actif ou inactif) de la voie canonique Wnt dans les précurseurs de la rétine centrale n'est pas clair et les résultats varient en fonction des transgènes rapporteurs utilisés. Cela dit une étude chez la souris y décrit son activité au stade cupule optique, bien qu'à moindre niveau qu'en périphérie (Liu et al., 2006), mais en bonne adéquation avec le profil d'expression de certains récepteurs de la voie (Liu et al., 2003). Chez le poisson zèbre, le poulet et le xénope, plusieurs études montrent qu'elle est suffisante et/ou nécessaire pour maintenir les précurseurs de la rétine centrale en prolifération (Yamaguchi et al., 2005) ; (Kubo et al., 2003) ; (Agathocleous and Harris, 2009). Enfin une étude récente suggère que ce rôle pourrait être conservé chez les mammifères. Elle indique en effet que les mutants trialléliques $Fz5^{-}/Fz8^{+/-}$ développent, entre autres défauts, des rétines microphthalmiques et que ce phénotype est lié à une sortie de cycle prématurée des progéniteurs (Liu et al., 2012).

(iii) Implication de la voie Notch dans la prolifération des précurseurs rétiniens embryonnaires

Comme évoqué dans le paragraphe 2.2.4.4, le modèle de l'inhibition latérale médiée par l'interaction Notch/Delta propose l'existence d'un environnement mosaïque où les cellules présentent des niveaux variables d'activation de la voie et adoptent en conséquence des comportements différents : celles où l'activité Notch est élevée demeurent à l'état de précurseurs prolifératifs, tandis que celles où elle est faible se différencient. En accord avec ce modèle, l'activation de la signalisation Notch chez la souris maintient les précurseurs rétiniens en prolifération et empêche leur différenciation (Nelson et al., 2007) ; (Nelson et al., 2006) ; (Alexson et al., 2006) ; (Henrique et al., 1997) ; (Bao and Cepko, 1997). À l'inverse, son invalidation accélère la différenciation neuronale (Austin et al., 1995) ; (Silva et al., 2003). Ainsi, au fur et à mesure que les progéniteurs produisent les différents types cellulaires rétiniens, en fonction de leur état de compétence, Notch assure qu'une partie du pool prolifératif se maintient pour produire les dérivés différenciés suivants.

Notons que les mécanismes qui relient la voie Notch au cycle cellulaire sont largement méconnus, varient probablement en fonction du contexte cellulaire et présentent des différences interspécifiques. Ainsi, chez le xénope comme chez le poisson zèbre, les effets de la voie en terme de prolifération semblent opposés à ceux observés chez la souris. En effet, son activation constitutive au moment de la genèse des cellules ganglionnaires, *via* la surexpression d'un dominant positif de son médiateur Su(H) (également appelé RBP-J ; Figure 8) ou celle d'un récepteur Notch constitutivement actif, biaise les précurseurs vers un destin glial (type cellulaire tardif) et les pousse à sortir prématurément du cycle cellulaire

(Ohnuma et al., 2002a) ; (Scheer et al., 2001). Ces effets d'induction de la sortie de cycle permettent également à Notch de potentialiser l'effet de gènes proneuraux comme *Atoh7*: lorsque la voie Notch est activée en contexte de surexpression de ce dernier, les précurseurs sortent massivement du cycle cellulaire, mais génèrent cette fois un excès de cellules ganglionnaires (type cellulaire précoce), très supérieur à celui observé après surexpression d'*Atoh7* seul (Ohnuma et al., 2002a). Sur la base de ces résultats, les auteurs proposent que la voie Notch participe aux interactions entre régulateurs du cycle cellulaire et facteurs de détermination, permettant de cette manière la genèse progressive des différents types cellulaires de la rétine. Ainsi, *via* son effet sur la sortie du cycle cellulaire, elle contribuerait à la naissance des cellules neuronales dans un contexte de forte expression des proneuraux au cours de la rétino-genèse précoce, puis à l'induction de la gliogenèse à des stades plus tardifs, quand le taux des proneuraux diminue.

2.2.5.3. *Les mécanismes de couplage entre prolifération et détermination*

Il est connu de longue date que la neurogenèse et le cycle cellulaire sont intimement couplés mais ce n'est qu'assez récemment que les bases moléculaires de ce couplage ont commencé à être élucidées (Andreazzoli, 2009) ; (Bilitou and Ohnuma, 2010). L'orchestration de la prolifération et de la différenciation est indispensable pour contrôler à la fois la taille définitive de l'organe mais également la genèse en proportion adéquate et au bon moment des différents types cellulaires.

(i) Contrôle de régulateurs du cycle par les facteurs de détermination et *vice-versa*

De nombreuses études montrent que des facteurs de détermination, comme Chx10 et *Atoh7* par exemple, affectent aussi la prolifération cellulaire en régulant l'expression de composants du cycle cellulaire comme les cyclines et les inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (CDKI). Ces derniers influencent à leur tour la détermination cellulaire (Bilitou and Ohnuma, 2010). Ainsi, le CDKI p27Xic1, qui inhibe la transition G1-S, favorise la gliogenèse chez le xénope (Ohnuma et al., 1999). De même, le CDKI p57Kip2 intervient dans la spécification des cellules amacrines chez la souris (Dyer and Cepko, 2000). Le suppresseur de tumeur Rb est quant à lui requis pour la sortie du cycle cellulaire et de façon concomitante pour la différenciation des bâtonnets, probablement *via* la régulation de l'expression du gène *Nrl*, qui code un facteur de transcription essentiel au développement de ces cellules (Zhang et

al., 2004). Ces régulateurs du cycle jouent donc un rôle crucial dans la coordination de la sortie du cycle, de la détermination et de la différenciation.

(ii) Durée du cycle cellulaire et changement de compétence au cours du temps

Ceci n'explique cependant pas comment les précurseurs rétiniens changent de compétence au cours du temps, permettant ainsi la genèse ordonnée des différents types cellulaires. Une hypothèse attractive est que la vitesse de division des cellules influe sur leurs potentialités (Pitto and Cremisi, 2010). Il est connu depuis longtemps que la durée du cycle cellulaire s'allonge au cours de la rétinogenèse chez les vertébrés (Alexiades and Cepko, 1996) ; (Morris and Cowan, 1995) ; (Li et al., 2000) ; (Decembrini et al., 2006). Un phénomène similaire est observé dans d'autres parties du système nerveux central, notamment dans le cortex, et semble nécessaire et suffisant à la transition entre divisions prolifératives et divisions neurogéniques (Gotz and Huttner, 2005) ; (Lange et al., 2009). Comment la longueur du cycle cellulaire peut-elle influencer l'expression de facteurs impliqués dans la détermination cellulaire ? Des travaux effectués dans la rétine du xénope suggèrent un mécanisme possible. Les gènes *Otx2* et *Vsx1* sont nécessaires à la génération des cellules bipolaires, le dernier type neuronal à naître dans la rétine. Decembrini et collaborateurs ont pu montrer que leurs ARNm sont exprimés mais non traduits dans les précurseurs précoces (Decembrini et al., 2006), grâce à une inhibition traductionnelle exercée par quatre micro-ARN (Decembrini et al., 2009). L'expression de ces derniers diminue au cours du développement de la rétine parallèlement au ralentissement des divisions et peut être expérimentalement inhibée par un allongement de la durée du cycle cellulaire. Ainsi, au cours de la rétinogenèse chez le xénope, ces micro-ARN couplent durée du cycle cellulaire et destin neuronal en contrôlant la traduction de facteurs de détermination clefs. Par ailleurs, la stabilité ou l'activité de certains facteurs de détermination est strictement contrôlée en fonction des phases du cycle cellulaire (Cisneros et al., 2008) ; (Ali et al., 2011). Leur délai d'action peut donc être directement dépendant de la durée de ces dernières : « Cell fate determinants may or may not induce cell fate change depending on whether or not G1 length provides enough time to do it » (Calegari and Huttner, 2003). Notons que la durée de la phase G2 peut également être importante puisque certains facteurs comme *Atoh7* et *Prox1* semblent être exprimés au cours de cette phase lors du dernier cycle (Dyer et al., 2003) ; (Matter-Sadzinski et al., 2005) ; (Poggi et al., 2005).

2.2.6. Rétinogenèse post-embryonnaire chez les poissons et les amphibiens

Chez les mammifères, le développement de l'épithélium pigmenté rétinien et de la rétine neurale s'achève peu après la naissance. Aucune addition de nouvelles cellules ne se produira au niveau de ces deux tissus pendant toute la vie de l'individu. Par conséquent, les yeux des mammifères étaient considérés, depuis longtemps comme dépourvus de cellules souches. Nous verrons plus loin que cette idée a été bouleversée dans les années 2000.

Contrairement aux mammifères, la rétine des amphibiens et des poissons continue à croître toute la vie de l'animal et possède des propriétés de régénération après lésion ou ablation (Reh and Constantine-Paton, 1983) ; (Perron et al., 1998) ; (Yoshii et al., 2007) ; (Vergara and Del Rio-Tsonis, 2009). L'addition de nouvelles cellules se fait grâce à l'activité de cellules souches qui se trouvent à l'extrême périphérie de la rétine dans une région de neurogenèse continue appelée « zone marginale ciliaire » (ZMC) ; (Wetts and Fraser, 1988) ; (Wetts et al., 1989) ; (Centanin et al., 2011). Les cellules de la ZMC sont organisées spatialement en fonction de leur stade de développement qui récapitule les étapes de la rétinogenèse embryonnaire : cellules souches à l'extrême périphérie, suivies des progéniteurs en division active, et enfin des cellules post-mitotiques en cours de différenciation (Figure 11) (Perron et al., 1998).

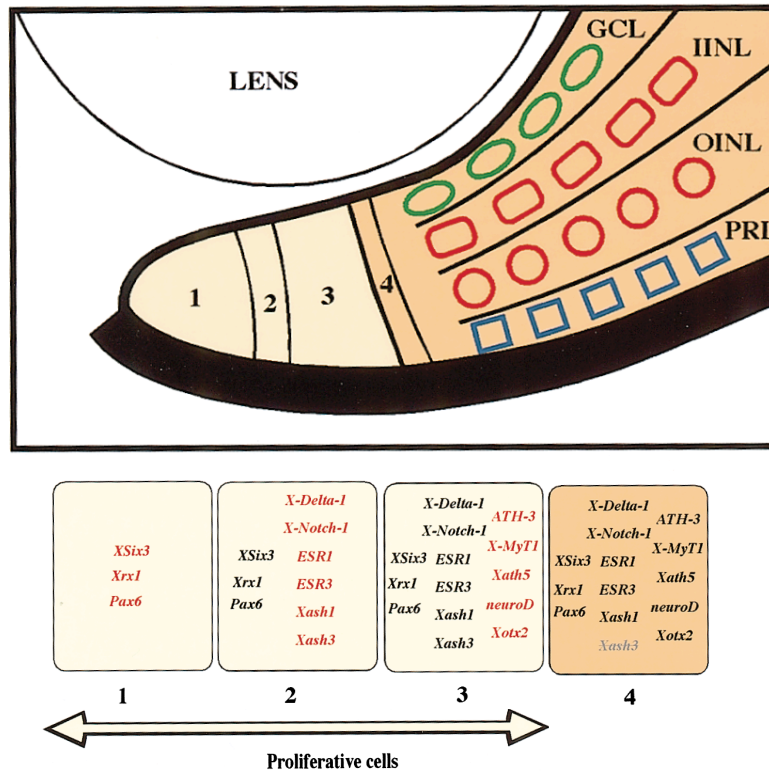


Figure 11 : Organisation de la ZMC.

Représentation schématique des différentes zones (1 à 4) de la ZMC, distinguables par l'expression des gènes indiqués dans le tableau. Les cellules souches sont confinées dans la zone 1. Les précurseurs sont dans les zones 2 et 3. La zone 4 contient des cellules post-mitotiques. GCL : couche des cellules ganglionnaires ; IINL/OINL : couches interne et externe de la couche nucléaire interne (INL) ; PRL : couche des photorécepteurs. D'après (Perron et al., 1998).

L'analyse comparative de la ZMC chez différents vertébrés a révélé que l'activité de cette région s'est progressivement réduite au fur et à mesure de l'évolution (Perron and Harris, 2000). Chez le poussin après éclosion, une ZMC est présente mais elle possède un potentiel de prolifération transitoire et une activité neurogénique limitée comparée aux poissons et aux amphibiens (Fischer and Reh, 2000). Une ZMC est également observée chez les nouveaux-nés des marsupiaux mais elle ne comprend que quelques cellules mitotiques et comme chez les oiseaux, elle ne persistera pas (Locker et al., 2010). Enfin, la ZMC est totalement absente chez les mammifères.

3. Les cellules souches rétiniennes chez les Vertébrés

Nombre des données présentées ci-après ont fait l'objet d'une revue à la rédaction de laquelle j'ai participé, publiée dans *Archives of Italian Biology* en 2010 (voir ANNEXE I, Article n°1):

A decade of mammalian retinal stem cell research ; M. Locker, W. El Yakoubi, N. Mazurier, J.-P. Dullin, M. Perron

3.1. DES CELLULES SOUCHES RETINIENNES ADULTES CHEZ LES MAMMIFERES ?

3.1.1. Un dogme bouleversé par la découverte de cellules souches dans le corps ciliaire de la rétine des mammifères

En 2000, il a été mis en évidence la présence de cellules souches rétiniennes dans le corps ciliaire (« ciliary body », CB) des mammifères. Cette structure, située entre l'iris et la rétine neurale, est formée par un épithélium ciliaire (« ciliary epithélium », CE), composé de deux couches : une pigmentaire et l'autre non pigmentaire (Figure 12). Deux équipes indépendantes ont démontré que quelques cellules de la partie pigmentaire du CE chez la souris pouvaient proliférer *in vitro* et étaient capables de générer clonalement des neurosphères primaires puis secondaires (après dissociation et remise individuelle des cellules en culture), démontrant leur capacité d'auto-renouvellement (Tropepe et al., 2000) ; (Ahmad et al., 2000). Par ailleurs, ces cellules sont capables, après culture dans des milieux induisant la différenciation, d'exprimer des marqueurs de photorécepteurs, de cellules bipolaires ou de cellules gliales de Müller, ce qui suggère leur multipotence. En revanche, *in vivo*, elles sont quiescentes et ne présentent pas de capacités neurogéniques. Quelques années plus tard, des cellules similaires ont été identifiées chez d'autres mammifères y compris chez l'homme (Coles et al., 2004) ; (Mayer et al., 2005) ; (MacNeil et al., 2007) ; (Gu et al., 2007).

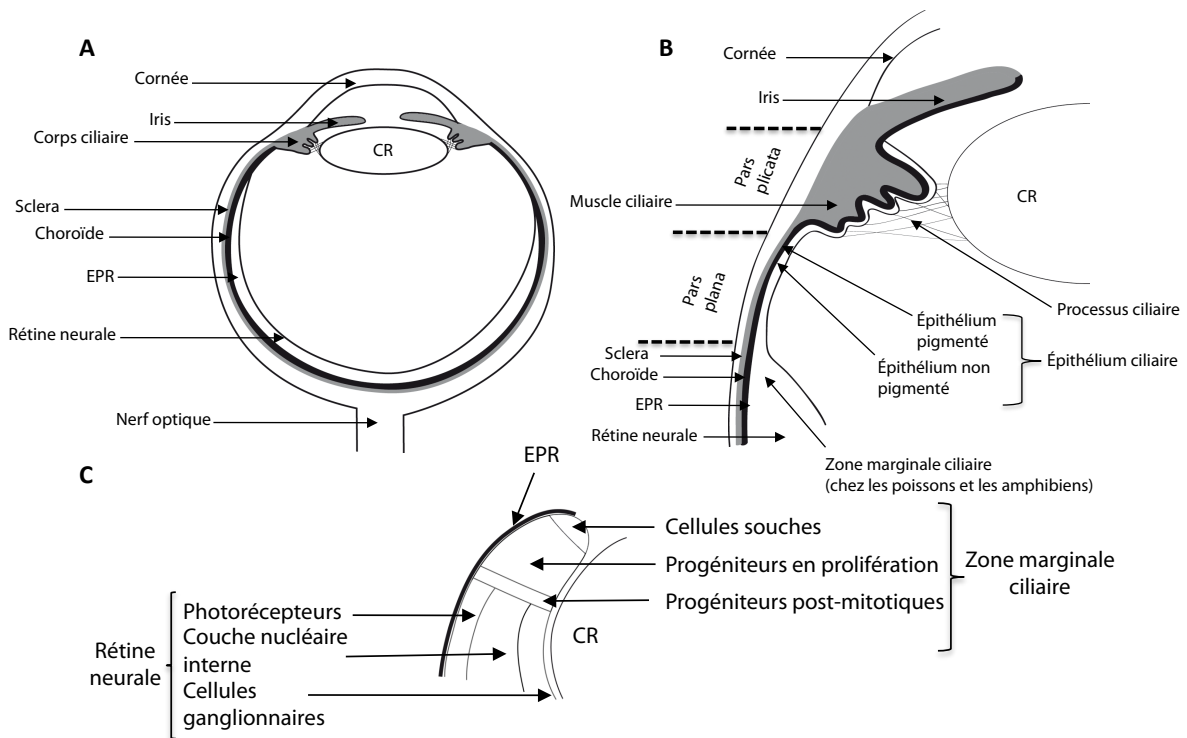


Figure 12 : **A.** Représentation schématique d'un œil de vertébré adulte (section transversale). **B.** Agrandissement de la région contenant le corps ciliaire. Des cellules souches quiescentes ont été identifiées dans la couche pigmentée de l'épithélium ciliaire. Chez les poissons et les amphibiens, une neurogenèse continue a lieu dans la ZMC. **C.** Représentation schématique de la ZMC d'un têtard. À ce stade le corps ciliaire n'est pas encore formé. CR: cristallin; EPR: épithélium pigmenté rétinien. D'après (Locker et al., 2010).

La caractérisation moléculaire de ces cellules souches putatives a révélé qu'elles expriment *in vitro* les EFTFs *Rx*, *Chx10*, *Pax6*, *Six3*, *Six6* et *Lhx2*, soit des gènes exprimés très précocement dans les cellules souches/précurseurs rétiniens embryonnaires (Tropepe et al., 2000) ; (Ahmad et al., 2004) ; (Das et al., 2005) ; (Lord-Grignon et al., 2006) ; (Xu et al., 2007b) ; (Gu et al., 2007). En plus, l'expression des quatre premiers facteurs a également été observée *in vivo* dans le CE des rongeurs, des singes et de l'homme (Das et al., 2005) ; (Lord-Grignon et al., 2006) ; (Xu et al., 2007a) ; (Martinez-Navarrete et al., 2008). Par ailleurs, des comparaisons transcriptomiques montrent 80% de similitude entre les jeunes précurseurs rétiniens et ces cellules du CE (Ahmad et al., 2004) ; (Das et al., 2005).

Le caractère « souche » de ces dernières a cependant été soumis à une récente controverse. L'équipe de M. Dyer a en effet proposé qu'il s'agirait plutôt de cellules pigmentaires différenciées capables d'un certain degré de reprogrammation *in vitro* mais incapables de réellement transdifférencier spontanément en cellules rétiniennes fonctionnelles (Moe et al., 2009) ; (Cicero et al., 2009). Une étude d'un autre groupe est concordante avec ce

constat (Gualdoni et al., 2010). Il a néanmoins été démontré que ces cellules, si elles ne sont pas « souches » à proprement parler *in vivo*, sont pourtant capables de générer des photorécepteurs fonctionnels après manipulations géniques. En outre, elles améliorent la vision de modèles murins de pathologies dégénératives rétiniennes après transplantation (Inoue et al., 2010). Le débat se porte donc plus sur des aspects sémantiques et il est possible que la définition de « cellule souche » (qui repose sur la démonstration d'une double propriété d'auto-renouvellement et de multipotence) soit amenée à évoluer au vu de la plasticité et du potentiel de dédifférenciation désormais démontré de nombreuses populations cellulaires (Locker et al., 2009). En tout cas, l'existence, dans le CB, de cellules qui présentent, une fois cultivées *in vitro*, les mêmes caractéristiques que des cellules souches est prometteuse pour le développement de stratégies de thérapie cellulaire.

3.1.2. Les autres sources de cellules souches neurales potentielles

3.1.2.1. Des cellules souches neurales dans l'iris ?

L'iris (Figure 12) est aussi considéré comme une source potentielle de cellules souches dans l'œil des mammifères. Comme le CE, il s'agit un épithélium qui dérive de la cupule optique mais ne génère pas de neurones. Il a été démontré que les cellules de l'iris ont la capacité d'exprimer des marqueurs neuronaux *in vitro* et que ce tissu pourrait contenir de rares cellules au caractère de cellules souches/précurseurs neuraux (Haruta et al., 2001) ; (Asami et al., 2007) ; (MacNeil et al., 2007) ; (Akagi et al., 2004).

3.1.2.2. Les cellules de Müller comme cellules souches potentielles

La zone ventriculaire germinative du cortex cérébral contient des cellules gliales radiaires qui sont impliquées dans la neurogenèse embryonnaire et adulte. Comme ces dernières, les cellules gliales rétiniennes des mammifères semblent dotées d'un potentiel de cellules souches (Lamba et al., 2008) ; (Locker et al., 2009) ; (Karl and Reh, 2010) ; (Fischer and Bongini, 2010), bien qu'elles restent dormantes chez les individus sains. Des expériences réalisées *in vivo* et *in vitro* ont en effet démontré que certaines cellules de Müller étaient multipotentes et capables de s'auto-renouveler (Das et al., 2006) ; (Monnin et al., 2007). Par ailleurs, en cas de lésion rétinienne, elles peuvent se réactiver et générer des précurseurs rétiniens. Ce potentiel régénératif est conservé chez plusieurs espèces de vertébrés à savoir le poisson zèbre (Fausett and Goldman, 2006) ; (Yurco and Cameron, 2005) ; (Fimbel et al., 2007), le poussin (Fischer and Reh, 2002) ; (Fischer and Reh, 2003) et les rongeurs (Das et

al., 2006) ; (Ooto et al., 2004). Cependant, chez les mammifères et les oiseaux, la capacité régénérative des cellules de Müller est limitée puisqu'elles ne sont pas capables de générer tous les types cellulaires de la rétine (Das et al., 2006) ; (Ooto et al., 2004) ; (Fischer and Reh, 2001) ; (Wan et al., 2008). Ceci peut toutefois être surmonté grâce à la surexpression de gènes à domaines bHLH et à homéoboîte appropriés, ou *via* un traitement avec des facteurs solubles spécifiques (Ooto et al., 2004) ; (Osakada et al., 2007) ; (Karl et al., 2008). Ceci suggère que les cellules gliales de Müller pourraient être stimulées pour produire des cellules rétiniennees spécifiques, à condition d'un apport exogène de facteurs qui sont limitants *in vivo*.

3.1.3. Les enjeux nés de la découverte de cellules souches neurales rétiniennees chez les mammifères

3.1.3.1. Les maladies neurodégénératives de la rétine

Plusieurs rétinopathies conduisent à la dégénérescence d'un ou plusieurs types cellulaires. Les lésions induites sont souvent irréversibles, ce qui conduit à une perte permanente de la capacité visuelle, en particulier lorsque la macula (la région de la rétine humaine où se concentrent les photorécepteurs cônes) ou le nerf optique sont concernés. Ces rétinopathies peuvent être d'origine génétique, être la conséquence de pathologies comme le diabète, ou survenir progressivement au cours du vieillissement. Chaque pathologie affecte initialement un type cellulaire particulier, mais une dégénérescence secondaire d'autres types de cellules advient généralement. En raison de leur prévalence et de la perte de la vue qu'elles causent, la rétinite pigmentaire (RP) et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) ont attiré beaucoup d'attention en médecine et en recherche clinique. La forme la plus typique de la RP se caractérise par une perte progressive des bâtonnets (mort par apoptose ou par d'autres mécanismes non apoptotiques) qui compromet la vision latérale et nocturne des patients (Berson, 1993) ; (Chang et al., 1993) ; (Hartong et al., 2006) ; (Sancho-Pelluz et al., 2008) ; (Djojsubroto and Arsenijevic, 2008). La DMLA se caractérise quant à elle initialement par la présence de gros agrégats de nature lipidique et protéique qui s'accumulent entre l'EPR et la choroïde. L'EPR devient moins pigmenté et finit par dégénérer, entraînant secondairement la perte des photorécepteurs.

3.1.3.2. Une stratégie de traitement envisageable : la thérapie cellulaire

Étant donné les répercussions sociales et économiques de la perte de vision, beaucoup d'efforts ont été engagés pour mettre au point des stratégies de thérapie cellulaire visant à

remplacer les photorécepteurs. De grandes espérances sont placées dans les cellules souches, comme source de cellules à transplanter, puisqu'elles sont capables de migrer et sont théoriquement dotées de la plasticité nécessaire à leur intégration et différenciation dans la zone lésée. De nombreux essais de transplantation ont été tentés à partir de cellules rétiniennes embryonnaires, fœtales ou post-natales. Les résultats obtenus sont variables mais démontrent les limites de ces cellules à s'intégrer et à se différencier en photorécepteurs (MacLaren and Pearson, 2007) ; (Pellegrini et al., 2007) ; (Djojosebroto and Arsenijevic, 2008) ; (Lamba et al., 2008). D'autres chercheurs ont transplanté des cellules souches neurales adultes provenant de l'hippocampe, mais bien qu'elles manifestent une migration efficace dans les différentes couches de la rétine hôte, elles ne génèrent pas correctement les types cellulaires rétiniens (Takahashi et al., 1998) ; (Young et al., 2000).

La découverte en 2000 de cellules souches rétiniennes adultes dans le CB des mammifères a incité de nombreux chercheurs à tester leur pertinence thérapeutique. Deux groupes ont confirmé leur capacité à adopter des phénotypes rétiniens lorsqu'elles sont greffées dans des rétines malades, contrairement à des rétines saines (Chacko et al., 2003) ; (Coles et al., 2004). Ceci montre l'existence probable dans les rétines lésées de facteurs favorisant la différenciation. En outre, le stade de différenciation auquel les cellules sont greffées semble primordial (MacLaren et al., 2006). Ainsi, des cellules souches rétiniennes génétiquement modifiées pour s'engager vers un destin de photorécepteurs s'intègrent-elles beaucoup mieux que des cellules immatures (Inoue et al., 2010). De toute évidence, de telles cellules transgéniques ne sont pas appropriées pour les essais cliniques et le prochain défi sera de générer des précurseurs de photorécepteurs avec des procédures qui ne modifient pas l'intégrité génomique des cellules du donneur.

Une autre difficulté se fonde sur la disponibilité limitée des cellules souches rétiniennes adultes et sur leur potentiel prolifératif réduit (Locker et al., 2010). Ce problème pourrait être contourné par l'utilisation des cellules souches embryonnaires (ES, « Embryonic Stem cells »). En effet, parce qu'elles sont pluripotentes et peuvent proliférer indéfiniment, elles représentent une source inépuisable pour la production de cellules rétiniennes (Haruta, 2005) ; (Lamba et al., 2009). De plus, la découverte des cellules souches pluripotentes induites (iPS, « Induced Pluripotent Stem cells »), chez la souris (Takahashi and Yamanaka, 2006) et chez l'homme (Takahashi et al., 2007) ; (Yu et al., 2007), offre également de nouvelles opportunités pour élargir les perspectives de la médecine régénérative (Jin et al., 2009) ; (Comyn et al., 2010). Toutefois, plusieurs problèmes tels que leur potentiel

oncogénique doivent encore être réglés avant qu'ES ou iPS puissent être considérées comme une option pour le traitement des maladies neurodégénératives rétiniennes.

Une deuxième alternative pour traiter ces maladies serait de stimuler des processus de réparation endogène (Karl and Reh, 2010) ; (Locker et al., 2010). Pour cela, il est essentiel d'éclaircir les mécanismes qui sous-tendent leur activité, leur maintenance et leur différenciation.

3.2. ÉTAT DE L'ART DES CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LES MECANISMES CONTROLANT LA MAINTENANCE ET LA PROLIFERATION DES CELLULES SOUCHES RETINIENNES ADULTES

Parmi les questions critiques qui ont, sans aucun doute, besoin d'être abordées sont la signature moléculaire précise des cellules souches rétiniennes adultes, les différences qui peuvent les distinguer de leurs homologues embryonnaires, la nature de leur niche et celle des signaux moléculaires qui régulent leur maintenance et leur activité. L'étude de ces questions est compliquée chez les mammifères. La plupart des données proviennent d'expériences réalisées *in vitro* ou *ex vivo*, dans des conditions où les cellules ont été retirées de leur microenvironnement naturel. Contrairement au cas mammifères, la ZMC des amphibiens et des poissons représente un modèle de choix pour étudier *in vivo* les mécanismes qui sous-tendent l'activité, la prolifération et la multipotence des cellules souches rétiniennes adultes (Figure 11). Ces modèles se sont déjà révélés utiles dans la compréhension de plusieurs aspects de la rétino-genèse post-embryonnaire (Cerveny et al., 2011). La ZMC des poussins, en dépit de son activité transitoire et plus limitée, s'est également révélée être un bon modèle pour disséquer les bases moléculaires de la régénération de la rétine (Haynes et al., 2007) ; (Spence et al., 2004) ; (Spence et al., 2007a) ; (Spence et al., 2007b).

3.2.1. Principales voies de signalisation impliquées

3.2.1.1. Facteurs de croissance

La prolifération des cellules souches/précurseurs rétiniens de la ZMC est stimulée par des facteurs de croissance. Chez le poisson rouge adulte ou le jeune poussin, elle est augmentée en réponse à l'injection intraoculaire d'EGF (Epidermal Growth Factor) ou d'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1), mais pas de FGF2 (Fischer and Reh, 2000) ; (Fischer et al., 2002) ; (Boucher and Hitchcock, 1998). Ces facteurs stimulent aussi la neurogenèse dans

l'épithélium du CB chez le poussin (Fischer et al., 2002). En ce qui concerne la rétine des mammifères, la voie de signalisation FGF induit la prolifération *de novo* des cellules épithéliales du CB *in vivo* (Abdouh and Bernier, 2006). Cependant, bien que ces cellules réactivées acquièrent des caractéristiques neuroépithéliales (expression de *Chx10*, *Pax6*, *Nestin*), elles n'arrivent pas à générer des neurones (Abdouh and Bernier, 2006). Ceci pourrait être dû à la présence de facteurs intrinsèques limitants ou à un manque de facteurs permissifs (Locker et al., 2009). Par exemple, il a été démontré que l'administration de TGFβ1/2 (Transforming Growth Factor β1/2) inhibe la prolifération dans le CB du nouveau-né de rat. À l'inverse, son inhibition maintient plus longtemps la prolifération dans cette zone (Close et al., 2005). L'hypothèse selon laquelle la neurogenèse serait intrinsèquement inhibée dans la rétine des mammifères adultes est également renforcée par le fait que les cellules du CB sont capables *in vitro* de proliférer et de former des neurosphères en l'absence de sérum et d'apport exogène en facteurs de croissance (Tropepe et al., 2000).

3.2.1.2. La voie Hedgehog

D'autres facteurs, comme le morphogène Hedgehog dont nous avons déjà parlé dans le cadre de la rétino-genèse embryonnaire, appartiennent au réseau de signalisation impliqué dans la régulation de la prolifération des cellules souches/précurseurs rétiniens adultes. En effet, il a été démontré chez le poussin et le têtard que la surexpression de Shh stimule la prolifération des cellules de la ZMC, tandis que son inhibition, par un traitement à la Cycloppamine (antagoniste du récepteur Smoothed ; Figure 9), provoque l'effet inverse (Moshiri et al., 2005) ; (Locker et al., 2006). De plus, dans les souris hétérozygotes *Patched^{+/-}*, chez lesquelles la voie Hedgehog est constitutivement activée, des précurseurs en prolifération persistent en périphérie de la rétine, semblant former une ébauche de ZMC (Moshiri and Reh, 2004). J'ai précédemment souligné que la voie Hedgehog affecte à la fois la cinétique du cycle cellulaire et la sortie du cycle cellulaire des précurseurs rétiniens embryonnaires chez le xénope, promouvant ainsi simultanément leur prolifération et leur différenciation (Locker et al., 2006). Sur cette base, et compte tenu de l'expression des ligands de la voie dans la rétine, il a été proposé qu'un gradient de signalisation Hedgehog dans la ZMC favoriserait la transition des cellules d'un état « souche » (prolifération lente) à un état « progéniteur amplificateur de transit » (cellules à cycle cellulaire rapide et proches de leur sortie de cycle ; Figure 13A) (Locker et al., 2006) ; (Agathocleous et al., 2007) ; (Borday et al., 2012).

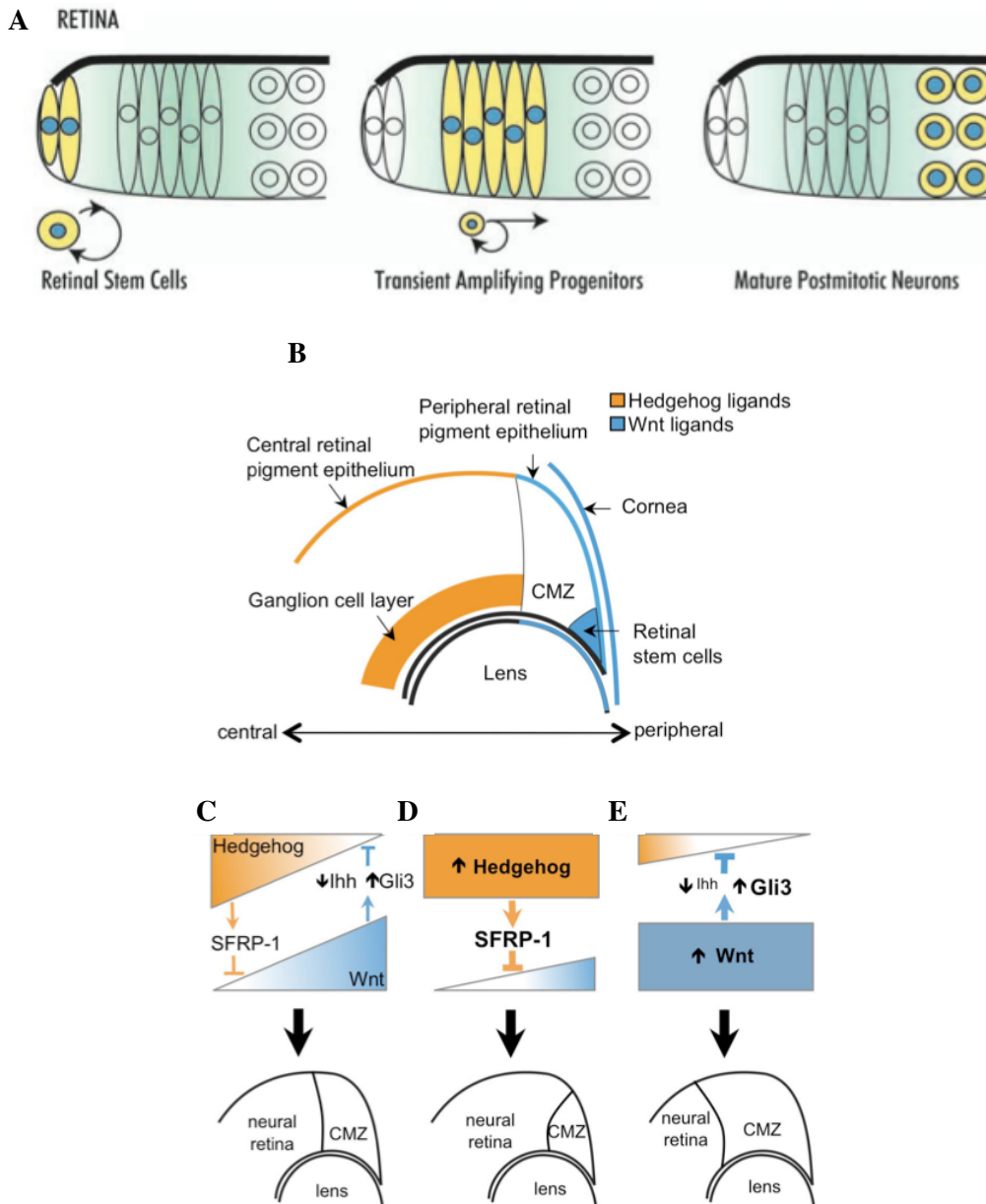


Figure 13 : A. Modèle du rôle de la voie Hedgehog dans la ZMC. Les cellules souches, peu soumises à l'influence d'Hedgehog prolifèrent lentement. L'augmentation de la signalisation Hedgehog (en vert) les convertit en progéniteurs amplificateurs de transit qui finissent par sortir du cycle et donner des cellules différenciées. D'après (Agathocleous et al., 2007). **B-E. Modèle d'interaction des voies Wnt and Hedgehog dans la ZMC post-embryonnaire.** (B) Schéma montrant les patrons mutuellement exclusifs des ligands Wnt (en périphérie) et Hedgehog (plus centraux) dans la région de la rétine post-embryonnaire. (C-E) Illustration schématique des activités Wnt et Hedgehog dans la ZMC (on suppose l'existence de gradients d'activité opposés) et des interactions qu'elles établissent pour se réguler négativement mutuellement. (C) représente la situation d'équilibre, (D) montre la diminution de la prolifération (symbolisée par une ZMC plus petite) engendrée par l'activation expérimentale d'Hedgehog et (E) l'augmentation de la prolifération (symbolisée par une ZMC plus grande) engendrée par l'activation expérimentale de la voie Wnt. D'après (Borday et al., 2012).

Enfin, la voie de signalisation Hedgehog semble également réguler le potentiel « souche » des cellules gliales de Müller dans la rétine des mammifères. En effet, la surexpression de Shh augmente non seulement la prolifération des cellules de Müller mais aussi considérablement la production de cellules exprimant le marqueur *rhodopsine*. Ceci suggère qu'elle peut spécifiquement diriger les précurseurs dérivés des cellules de Müller vers un destin photorécepteur de type bâtonnet (Wan et al., 2007).

3.2.1.3. La voie Wnt

La voie de signalisation Wnt régule une grande variété de comportements cellulaires, parmi lesquels la prolifération (van Amerongen and Nusse, 2009). Nous avons vu au paragraphe 2.2.5.2, que cette voie est active dans la zone périphérique de la rétine embryonnaire des vertébrés. C'est également le cas en période post-natale et chez l'adulte (Denayer et al., 2008); (Liu et al., 2006); (Kubo and Nakagawa, 2008), suggérant un rôle possible dans les cellules souches/précurseurs rétiniens post-embryonnaires. En accord avec cette hypothèse, la voie Wnt maintient la prolifération et l'état indifférencié des précurseurs de la ZMC du poussin (Kubo et al., 2003); (Kubo et al., 2005). Chez les mammifères, Wnt3a stimule *in vitro* la prolifération et l'auto-renouvellement des cellules souches rétiniennes adultes (Inoue et al., 2006). Des travaux récents de mon équipe d'accueil sont en faveur d'un tel rôle *in vivo* dans la rétine du xénope (Denayer et al., 2008). En effet, l'activation de la voie Wnt, à l'aide de constructions inductibles chez des têtards transgéniques, augmente le nombre de divisions cellulaires dans la ZMC, alors que son inhibition provoque une déplétion du pool de cellules prolifératives (Denayer et al., 2008).

Une question qui se pose est de savoir si les mécanismes par lesquels la voie Wnt contrôle la prolifération sont différents ou similaires dans les cellules souches embryonnaires et post-embryonnaires. Le récepteur Frizzled5 est impliqué dans la prolifération des précurseurs rétiniens embryonnaires chez le xénope (Van Raay et al., 2005). Il est également impliqué dans celle des cellules de la ZMC post-embryonnaire (Denayer et al., 2008). Bien qu'il soit possible que d'autres récepteurs Frizzled soient impliqués, ces données suggèrent que cellules souches/précurseurs rétiniens embryonnaires et post-embryonnaires sont sous contrôle des mêmes composants de la voie canonique Wnt.

La plupart des études portant sur les cellules souches rétiniennes adultes ont abordé l'influence individuelle des voies de signalisation sur leur comportement. Un défi majeur est maintenant de comprendre les interactions que ces voies établissent entre elles pour orchestrer

le maintien et la prolifération de ces cellules. Des résultats récents du laboratoire montrent que les voies Hedgehog et Wnt s'antagonisent mutuellement et que le taux de prolifération des cellules souches/précurseurs rétiniens post-embryonnaires repose sur leurs influences opposées respectives (Figure 13 B, C) (Borday et al. 2012).

Enfin, en cas de lésions rétiniennes, la voie Wnt est impliquée dans le processus de régénération à partir des cellules gliales de Müller puisqu'elle active leur conversion en cellules souches et leur potentiel prolifératif (Das et al., 2006) ; (Osakada and Takahashi, 2009) ; (Locker et al., 2009) ; (Ramachandran et al., 2011) ; (Del Debbio et al., 2010).

3.2.1.4. La voie Notch

Alors que la voie Notch est très étudiée dans les cellules souches neurales du cerveau (Chapouton et al., 2010) ; (Imayoshi et al., 2010) ; (Basak et al., 2012) ; (Imayoshi and Kageyama, 2011) ; (Schwarz et al., 2012) ; voir paragraphe 4.2.2.3), très peu d'équipes ont examiné son rôle dans les cellules souches/précurseurs rétiniens adultes. L'une d'entre elles montre que des cellules dérivées du CE de souris déficientes pour la préséniline-1, dans lesquelles l'activité de la voie Notch est réduite, génèrent moins de neurosphères comparées aux sauvages (Alexson et al., 2006). Cela suggère que la voie Notch est requise pour le maintien des cellules souches à l'intérieur du CB.

Enfin, comme les voies Hedgehog et Wnt, la voie de signalisation Notch, pourrait être impliquée dans la conversion des cellules gliales de Müller en cellules souches neurales en cas de lésions (Cameron et al., 2005) ; (Yurco and Cameron, 2007) ; (Del Debbio et al., 2010).

3.2.2. Les facteurs intrinsèques

Beaucoup de facteurs de transcription influencent de manière autonome cellulaire la prolifération des cellules souches/précurseurs rétiniens au cours de l'embryogenèse mais peu de données sont disponibles quant à leur implication potentielle ou celle d'autres facteurs dans la rétine post-natale. Il a été montré que la perte conditionnelle de *Pax6* chez la souris ou son inactivation *in vitro* engendrait une diminution du nombre de neurosphères formées par les cellules du CB (Xu et al., 2007b). *Pax6* semble donc requis pour la prolifération et l'expansion des cellules souches rétiniennes adultes. Sur la base de ces résultats, il serait intéressant de tester le rôle éventuel d'autres EFTFs dans la maintenance de ces cellules.

Un crible à grande échelle effectué chez le poisson zèbre a permis d'identifier 18 lignées mutantes présentant potentiellement un dysfonctionnement des cellules souches de la ZMC. De façon surprenante, seule la croissance larvaire de l'œil est affectée alors que le développement embryonnaire semble normal (Wehman et al., 2005). En outre, l'analyse de ces mutations n'a révélé aucune correspondance avec les gènes candidats connus pour réguler la rétino-genèse, la biologie des cellules souches ou la croissance. Ces résultats suggèrent donc que de nombreux gènes contrôlant l'activité des cellules souches rétiniennes adultes restent à identifier.

3.3. LA ZMC DU XENOPE POUR TROUVER DES NOUVEAUX MARQUEURS DES CELLULES SOUCHES RETINIENNES

3.3.1. Les marqueurs connus des cellules souches de la ZMC

L'étude de la biologie des cellules souches rétiniennes est actuellement limitée par le manque de marqueurs spécifiques qui pourraient permettre leur identification et leur distinction vis à vis des cellules progénitrices. L'organisation de la ZMC permet la distinction spatiale de ces deux types de cellules : les cellules souches sont confinées à la région la plus périphérique, tandis que les progéniteurs sont situés plus centralement. Malgré cet avantage, très peu de gènes exprimés spécifiquement dans les cellules souches ont été découverts jusqu'à présent dans ce modèle.

Les facteurs de transcription *Rx*, *Chx10*, *Pax6*, *Six3*, *Optx2*, et *Lhx2* sont exprimés dans les cellules souches de la ZMC (Perron et al., 1998) ; (Raymond et al., 2006) ; (Zuber et al., 1999) ; (Vicgian et al., 2006) mais également dans les cellules progénitrices et, pour certains d'entre eux, dans des neurones différenciés au sein de la rétine centrale. C'est aussi le cas de *Musashi1*, un gène considéré comme un marqueur spécifique des cellules souches neurales du cerveau adulte (Amato et al., 2005) ; (Wilson et al., 2007). Les premiers marqueurs décrits comme étant spécifiques de la région la plus périphérique de la ZMC et exclus de la zone des précurseurs et de la rétine centrale sont les composants de la voie de signalisation Hedgehog, *Gli2*, *Gli3* et *X-Smoothened* (Perron et al., 2003). L'expression de *Gli3* est également limitée à la périphérie de la rétine post-embryonnaire chez le poulet (Moshiri et al., 2005). Des composants de la voie Wnt chez le xénope (*Wnt2b* et *Wnt8b* ; Borday et al. 2012) ou Notch chez le poisson zèbre (ligands de Notch et un effecteur de la voie *Her6*, orthologue de *Hes1* chez les mammifères) ; (Raymond et al., 2006) semblent aussi préférentiellement exprimés

dans les cellules souches. Enfin, il a récemment été montré que ces dernières peuvent être distinguées sur la base de l'expression des oncogènes *n-myc* et *c-myc* (*c-myc*⁺/*n-myc*⁻) ; (Xue and Harris, 2011).

Pour mieux comprendre la signature moléculaire des cellules souches rétiniennes adultes, nous avons recherché de nouveaux marqueurs en effectuant un crible à grande échelle par hybridation *in situ* (Parain et al., 2011). Dix-huit gènes exprimés spécifiquement à la pointe de la ZMC ont été retrouvés.

3.3.2. Principe du crible à grande échelle

L'objectif principal de cette étude a été d'isoler des marqueurs de cellules souches rétiniennes en criblant une banque d'ADNc par hybridation *in situ* et en recherchant les gènes exprimés spécifiquement dans la zone la plus périphérique de la rétine. Pour ce faire, des sondes ARN de *Xenopus tropicalis* ont été conçues à partir de deux sources : (i) des séquences partielles d'ADNc choisies arbitrairement dans une banque d'EST provenant de têtes et rétines embryonnaires (Fierro et al., 2007) et (ii) des séquences d'ADNc putativement complètes et entièrement séquencées (données non publiées). Ces sondes ont ensuite été testées par hybridation *in situ* sur des têtards de *Xenopus tropicalis*. Les embryons présentant un marquage dans la rétine (n=485, 44%) ont été coupés pour une analyse plus fine de leur profil d'expression.

Afin de retrouver aisément les marqueurs identifiés dans ce crible, nous avons tiré profit de l'outil Web d'annotation XenMARK, qui constitue une banque de données de profils d'expression de gènes chez le xénope (Gilchrist et al., 2009). Nous y avons créé un nouveau module permettant d'annoter manuellement des profils d'expression sur un diagramme de rétine. Nous avons ainsi pu intégrer l'ensemble des données d'expression sur les clones issus du crible à la banque de données (Parain et al., 2011).

Ce travail, auquel j'ai participé en annotant les clones dans XenMARK a fait l'objet d'un article, publié dans *Developmental Neurobiology* en 2012 (voir ANNEXE I, Article n°2):

A Large Scale Screen for Neural Stem Cell Markers in Xenopus Retina; Karine Parain, Nicolas Mazurier, Odile Bronchain, Caroline Borday, Pauline Cabochette, Albert Chesneau, Gabriele Colozza, Warif El Yakoubi, Johanna Hamdache, Morgane Locker, Michael J. Gilchrist, Nicolas Pollet, Muriel Perron

3.3.3. Les nouveaux marqueurs identifiés

Parmi les 485 clones qui s'expriment dans la rétine, 18 présentent un marquage spécifique dans les cellules souches de la ZMC. Ces gènes codent pour différents types de protéines impliquées dans la transduction des signaux, l'expression génique, le contrôle du cycle cellulaire ou le métabolisme. Parmi eux, le gène *Hes4* (anciennement appelé *XHairy2*), présente un profil d'expression très restreint à la pointe de la ZMC. Ce gène code un inhibiteur transcriptionnel à domaine bHLH-O et nous l'avons déjà identifié comme marqueur des cellules souches dans le cadre d'une analyse comparative du profil d'expression de divers gènes de la même famille : *Hes4*, *Hes1* (anciennement appelé *XHairy1*), *Hrt1*, *Esr9* et *Hes2*. Nous avons alors constaté que seuls *Hes1* et *Hes4* étaient exprimés spécifiquement dans les cellules souches, les autres étant exprimés dans les progéniteurs et exclus des cellules souches (Figure 14). Ces deux gènes constituent donc des candidats potentiels pour réguler l'auto-renouvellement ou la multipotence des cellules souches rétinienne et leur analyse fonctionnelle a fait l'objet de mon travail de thèse.

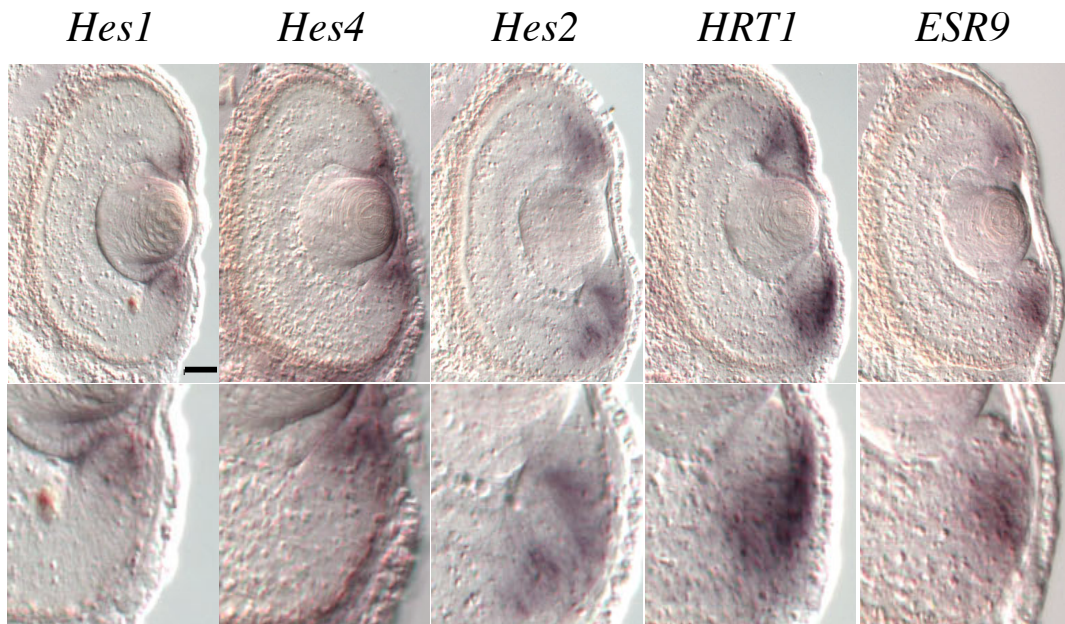


Figure 14 : Analyse comparative de l'expression de gènes bHLHO dans la ZMC.

Coupes transversales de rétines au stade 41 après hybridation *in situ* avec les sondes antisens *Hes1*, *Hes4*, *Hes2*, *HRT1* et *ESR9*. Les panels du bas montrent les grossissements des ZMC ventrales des panels du haut. Les pointillés bleus et blancs délimitent respectivement la zone des cellules souches et celle des progéniteurs. Échelle : 50 μ m.

L'étude phylogénétique de ces gènes a montré qu'ils sont très conservés et qu'ils possèdent des orthologues chez les vertébrés comme chez les invertébrés (Tableau 1) (Davis and Turner, 2001). Cette étude a révélé aussi que *Hes4* est présent chez *Xenopus laevis* sous deux formes alloalléliques *Hes4a* et *Hes4b*. De plus, elle montre qu'il est absent chez la souris et que sa séquence est très proche de celle de *Hes1*.

<i>Human</i>	<i>Mouse</i>	<i>Rat</i>	<i>Chicken</i>	<i>Frog</i>	<i>Zebrafish</i>	<i>Sub-family</i>
HES1/HRY	HES1	HES1	hairy2	hairy1	her6	hairy
HES2	HES2	HES2				E(spl)
HES3	HES3	HES3			her3	E(spl)
HES4			hairy1	hairy2a/b	hairy1	hairy
HES5	HES5	HES5		ESR1		E(spl)
HES6	HES6			HES6		E(spl)
HES7	HES7			ESR5	her1	E(spl)
Hey1	Hey1		Hey1	Hesr1/Hey1		Hey
Hey2	Hey2		Hey2		gridlock	Hey
HeyL	HeyL					Hey
Stra13/DEC1	Stra13	SHARP2				Stral3
DEC2	DEC2	SHARP1				Stral3

Tableau 1 : Orthologues probables de diverses protéines bHLHO humaines chez d'autres vertébrés d'après une analyse phylogénétique. D'après (Davis and Turner, 2001).

4. Les facteurs HES : inhibiteurs transcriptionnels de type bHLH-O

4.1. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION HAIRY AND ENHANCER OF SPLIT

4.1.1. Structure et domaines conservés des facteurs Hairy and Enhancer of Split

4.1.1.1. Structure générale

Les gènes *Hes* sont les homologues des gènes *Hairy* and *Enhancer of split* (*E(spl)*) de la drosophile (Davis et Turner 2001). Ils codent des protéines nucléaires qui se fixent sur l'ADN et agissent comme des répresseurs transcriptionnels (Fischer and Gessler, 2007) ; (Kageyama et al., 2007) ; (Iso et al., 2003) ; (Davis and Turner, 2001). Ces facteurs possèdent

trois domaines très conservés : les domaines bHLH, Orange et WRPW (Figure 15). L'agencement en tandem des domaines bHLH et Orange est une structure caractéristique partagée par ces protéines et qui leur vaut leur appartenance à la famille des protéines bHLH-Orange (bHLH-O). Le domaine bHLH se compose de deux régions : la région basique (b), impliquée dans la liaison à l'ADN, et la région hélice-boucle-hélice (HLH) impliquée dans la dimérisation. Contrairement aux autres facteurs bHLH, les facteurs Hes ont un résidu proline très conservé au milieu du domaine basique dont l'importance fonctionnelle n'a pas encore été mise à jour. Le domaine Orange (appelé aussi hélice III/IV) possède deux hélices amphipathiques et semble impliqué dans la sélection des partenaires à domaine bHLH (Dawson et al., 1995) ; (Taelman et al., 2004). Jusqu'à présent, ce domaine n'a pas été identifié dans des protéines non-bHLH. Enfin, un motif C-terminal WRPW (térapeptide Trp-Arg-Pro-Trp) réprime la transcription des gènes cibles et constitue également un site de poly-ubiquitylation (Kang et al., 2005). Les facteurs Hes sont ubiquitinés et dégradés par le protéasome : ils ont de fait une demi-vie très courte (~20 minutes) (Hirata et al., 2002). Le domaine C-terminal confère donc à la fois aux facteurs Hes des caractéristiques de répresseurs et d'oscillateurs (ce que nous verrons plus loin).



Figure 15 : Structure et domaines conservés des facteurs Hes.

Ces facteurs se lient à l'ADN grâce à leur domaine basique (b, bleu). Les domaines HLH (mauve) et Orange (orange) sont respectivement nécessaires à la dimérisation et au choix des partenaires. L'extrémité C-terminale contient le térapeptide WRPW (rose) qui interagit avec des co-répresseurs et contient un signal de poly-ubiquitination. D'après (Kageyama et al., 2007).

4.1.1.2. Les différentes familles des facteurs à domaines bHLH-O

L'analyse phylogénétique des facteurs à domaine bHLH-O montre l'existence de 4 sous-familles distinctes, appelées par le nom de leur protéine prototype: Hairy, E(spl), Hey, et Stra13 (Figure 16). À l'exception de cette dernière, chacune d'entre elles comprend des membres depuis la drosophile jusqu'à l'homme (Tableau 1). Bien que toutes ces protéines soient des répresseurs transcriptionnels, les différences conservées de structure primaire entre les sous-familles impliquent qu'elles possèdent des fonctions et/ou des régulations post-

traductionnelles distinctes. Ainsi, elles peuvent être distinguées notamment sur la base de leur extrémité C-terminale : présence du térapeptide WRPW pour les sous-familles Hairy et E(spl), du motif YXXW pour la sous-famille Hey et absence de motif chez Stra13. Les protéines de la sous-famille Hairy se caractérisent en outre par la présence d'une courte séquence (Boucher and Hitchcock) située entre le domaine Orange et l'extrémité C-terminale, conservée chez tous les invertébrés et les vertébrés. Les facteurs bHLH-O varient également dans leur affinité de fixation à des séquences consensus appelées boîte E (CANNTG) ou boîte N (CACNAG), présentes dans les promoteurs de leurs gènes cibles (Davis and Turner, 2001).

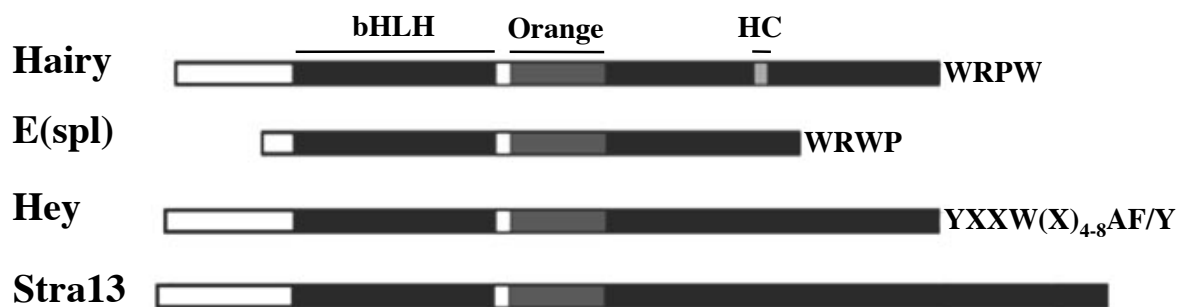


Figure 16 : Schéma des structures des sous-familles de facteurs bHLH-O.

Les domaines bHLH et Orange sont présents dans tous les membres de la famille. Le domaine HC est spécifique à la sous-famille Hairy. Cette sous-famille et la plupart des membres de la sous-famille E(spl) contiennent à leur extrémité C-terminal le térapeptide WRPW, alors que les protéines de la sous-famille Hey possèdent le motif YXXW, avec généralement une extension de 6 à 10 acides aminés conservés. D'après (Davis and Turner, 2001).

La nomenclature des facteurs bHLH-O est très complexe car, comme c'est le cas pour d'autres familles multigéniques, ils ont été isolés et donc nommés et numérotés dans des laboratoires indépendants. Chez le xénope et le poulet, les facteurs Hairy et E(spl) ont conservé des appellations fondées sur leur appartenance aux sous-familles du même nom, alors qu'ils ont été regroupés sous le nom de Hes (Hairy and enhancer of split) chez les mammifères et Her (Hairy and enhancer of split related) chez le poisson zèbre. Les protéines Hey ont été nommées HRT ou Hesr, ou dans le cas de Hey2, Gridlock ou CHF1, tandis que les protéines Stra13 ont également été nommées SHARP, DEC, Clast, ou BHLHB2 (Davis and Turner, 2001).

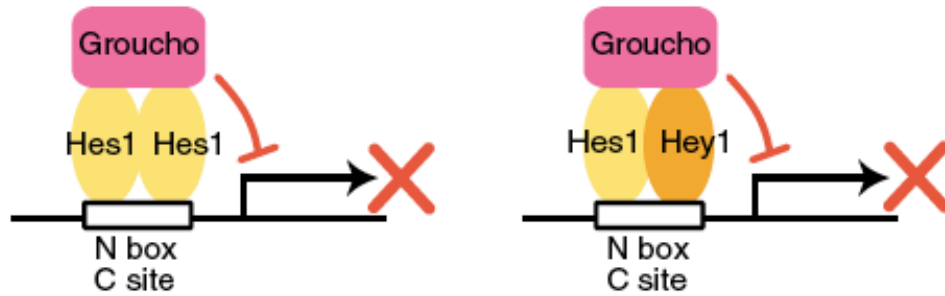
La complétion du séquençage des génomes de la drosophile et de l'homme a permis de comparer la complexité de leur famille bHLH-O à chacun. Contrairement à de nombreuses

familles de facteurs de transcription (à domaine homéoboîte ou à domaine bHLH par exemple) dont le nombre de membres a augmenté chez l'homme par rapport à la drosophile, la famille des protéines bHLH-O ne s'est pas significativement étendue. La drosophile possède 13 protéines bHLH-O (Moore et al., 2000), dont trois appartenant à la sous-famille Hairy (Hairy, Deadpan et Side), huit à la sous-famille E(spl) (sept m-type et Her) et deux à la sous-famille Hey (Hesr-1 et sticky/ch1). L'homme semble quant à lui posséder douze protéines bHLH-O, parmi lesquelles deux protéines Hairy (HES1 et HES4), également retrouvées chez le poisson zèbre et le poulet, ce qui suggère qu'il s'agit du nombre commun de membres chez les vertébrés. Notons que le gène *Hes4* est cependant absent chez la souris. Enfin, l'homme possède aussi cinq protéines de type E(spl) (HES2, 3, 5, 6, 7), trois protéines Hey (1, 2, L) et deux protéines Stra13 (Stra13/DEC1, DEC2).

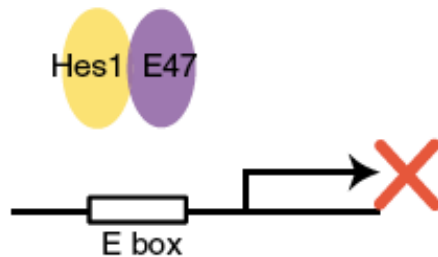
4.1.2. Mécanismes de répression transcriptionnelle

Les Facteurs Hes répriment la transcription par deux types de mécanismes: la répression active et passive (Figure 17) (Sasai et al., 1992). La répression active implique le domaine WRPW, qui interagit avec les co-répresseurs TLE (transducine-like E(spl)), homologues de la protéine Groucho chez la drosophile (Figure 17A, B) (Davis and Turner, 2001). Les protéines TLE/Groucho semblent fonctionner en partie *via* le recrutement d'histones désacétylases (HDACs). Ainsi, il est probable que le complexe Hes-TLE/Groucho réprime la transcription par modification de l'état chromatinien. La répression passive repose quant à elle sur la capacité des facteurs Hes à former des hétérodimères avec des facteurs de transcription à domaine bHLH. Ces hétérodimères ne peuvent pas se lier à l'ADN (Figure 17C). Les facteurs Hes ont donc ainsi un effet dominant négatif sur les activateurs transcriptionnels bHLH.

A. Répression active



B. Répression passive



C. Activateurs bHLH

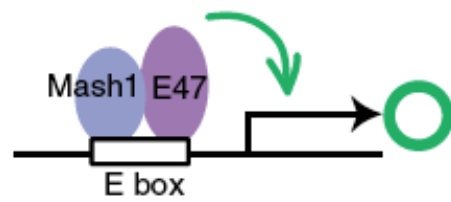


Figure 17 : Modes de répression des facteurs Hes.

A. Répression active : les facteurs Hes forment des homodimères ou des hétérodimères avec les protéines Hey, se lient à des séquences spécifiques (boîte N ou site C) et répriment activement la transcription des gènes cibles en interagissant avec des corépresseurs, tels que la protéine Groucho. **B. Répression passive** : les facteurs Hes forment des hétérodimères non fonctionnels avec des facteurs de transcription de type bHLH tels que E47, et inhibent leur activité. **C. Les activateurs bHLH** tels que Mash1 et E47 s'hétérodimérisent et se lient à la boîte E pour activer la transcription de leurs gènes cibles. D'après (Kageyama et al., 2007).

4.2. ROLES MULTIPLES DES GENES *HES* AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

4.2.1. Des cibles de la voie Notch

Comme je l'ai déjà évoqué, la voie de signalisation Notch joue des rôles fondamentaux dans divers processus développementaux chez les vertébrés et les invertébrés, dont le choix du destin cellulaire (Schwanbeck et al., 2011). Elle est initiée par la liaison des ligands Delta ou Jagged aux récepteurs Notch. Le domaine intracellulaire de Notch (NICD) est alors clivé par protéolyse et transloqué dans le noyau où il s'associe avec le facteur de transcription RBP-J (également appelé selon les espèces CBF1, Su(H), Lag-1 ou CSL), entraînant la transcription de gènes bHLH-O (Figure 8).

Il a été démontré que le promoteur du gène *Hes1* contient des sites de liaison à RBP-J sensibles à une surexpression de Notch (Jarriault et al., 1995) ; (Jarriault et al., 1998), positionnant *Hes1* comme une des cibles directes de cette voie. L'expression de *Hes1* est notamment dépendante de la voie Notch pendant la segmentation du mésoderme (Jouve et al., 2000). Cependant, ce n'est pas toujours le cas. Ainsi, il a été montré que l'expression de *Hes1* n'est pas significativement altérée par l'inactivation de *Notch1* ou de *RBP-J* au cours du développement du système nerveux chez la souris (de la Pompa et al., 1997). La situation est plus complexe dans la rétine. L'expression endogène de *Hes1* comme celle d'un gène rapporteur de son activité semblent sensibles à des modulations de la voie Notch (Ohtsuka et al., 1999) ; (Nelson et al., 2006) ; (Nelson et al., 2007). Cependant, plusieurs études effectuées sur la rétine des rongeurs convergent vers l'idée que *Hes1* posséderait à la fois des fonctions indépendantes de la voie Notch (dans la prolifération des précurseurs rétiniens) ; (Wall et al., 2009) ; (Wallace, 2008) et d'autres dépendantes (dans la différenciation des cellules de Müller notamment) ; (Furukawa et al., 2000). Nous reviendrons sur ce point ultérieurement. Il semble donc que *Hes1* constitue un effecteur de la voie Notch dans certains contextes cellulaires et pas dans d'autres.

L'expression du gène *Hes5* est quant à elle fortement dépendante de la voie de signalisation Notch. En effet, elle est réduite ou abolie chez les souris KO pour *Notch1*, *RBP-J* ou *presenilin1/2* (protéines nécessaires à l'activation protéolytique de Notch) (de la Pompa et al., 1997) ; (Barrantes et al., 1999) ; (Donoviel et al., 1999) ; (Handler et al., 2000). Chez le xénope, plusieurs gènes *E(spl)* peuvent aussi être activés par la voie Notch, parmi lesquels *Esr1* et *Esr7*, très proches du gène mammalien *Hes5*, ainsi que *Esr4*, *Esr5* et *Esr6e* (Wettstein et al., 1997) ; (Deblandre et al., 1999) ; (Jen et al., 1999) ; (Koyano-Nakagawa et al., 2000) ; (Lamar and Kintner, 2005).

De nombreux autres gènes *Hes* de vertébrés ont été identifiés comme des cibles probables de la voie Notch et il serait trop long d'en fournir la liste exhaustive. En revanche, quelques uns ne sont pas des cibles de la voie Notch. C'est le cas par exemple de *Hes6* chez la souris et le xénope (Bae et al., 2000) ; (Koyano-Nakagawa et al., 2000). Chez la drosophile, l'expression de la plupart des gènes *E(spl)* dépend de la voie Notch, tandis que celle des gènes *Hairy* ne semble pas impliquer la fonction de cette dernière (Bier et al., 1992) ; (Langeland and Carroll, 1993) ; (Jennings et al., 1994) ; (Bailey and Posakony, 1995). Cette distinction apparente n'a cependant pas été évolutivement conservée chez les vertébrés, puisque, comme mentionné précédemment, on trouve des cibles de la voie Notch parmi les membres de ces deux sous-familles (par exemple *Hes1* et *Hes5*).

4.2.2. Une implication dans des processus développementaux divers

Les gènes *Hes* sont impliqués dans de très nombreux processus développementaux (Kageyama et al., 2007) ; (Kageyama et al., 2010). Je me contenterai ici de ne développer que les exemples du développement pancréatique, de la somitogenèse et de la différenciation des cellules ES. Nous reviendrons ultérieurement et plus longuement sur le rôle de *Hes1* dans la neurogenèse.

4.2.2.1. *Hes1* et développement pancréatique

Pendant le développement du pancréas, le gène *Ptf1a*, qui code une protéine à domaine bHLH, favorise la différenciation des cellules exocrines, alors que le gène *Ngn3* favorise la différenciation des quatre types de cellules endocrines (Murtaugh, 2007). Chez la souris, l'inactivation de *Hes1* conduit à l'augmentation de l'expression de *Ngn3*, à la différenciation prématurée des cellules endocrines et à une sévère hypoplasie pancréatique (Jensen et al., 2000). Des défauts similaires ont été observés suite à l'inactivation du ligand de Notch, *delta-like1* (*DLL1*) ou du gène *RBP-J*, ou après surexpression de *Ngn3* (Apelqvist et al., 1999). Ceci suggère que la voie DLL1-Notch-RBP-J-Hes1 régit le timing de différenciation des cellules pancréatiques endocrines. *Hes1* réprime également l'expression de *Ptf1a* en se liant directement à son promoteur et plusieurs études ont montré que la voie Notch inhibait aussi la différenciation des cellules exocrines (Murtaugh, 2007). Ainsi, chez les souris nulles pour *Hes1*, les gènes *Ptf1a* et *Ngn3* sont exprimés de façon ectopique dans le canal cholédoque, dans l'estomac et dans le duodénum, ce qui conduit à la formation d'un pancréas ectopique (Sumazaki et al., 2004) ; (Fukuda et al., 2006). En accord avec de récentes études de lignage montrant que *Hes1* marque les précurseurs pancréatiques multipotents (Kopinke et al., 2011), il a donc été proposé que la voie Notch-Hes1 favorisait le maintien de ces derniers à l'état indifférencié en réprimant à la fois les gènes *Ptf1a* et *Ngn3* (Figure 18). Ces effets sont cependant dépendants du niveau d'activation de la voie Notch. Il a en effet été très récemment montré que la voie Notch est nécessaire pour conférer aux précurseurs pancréatiques leur compétence à différencier en cellules ductales et endocrines. Cette étude confirme que lorsque Notch est maintenu à niveau élevé, la différenciation est bloquée *via* l'activation de *Hes1*, mais suggère qu'un niveau plus faible est requis pour la différenciation des cellules ductales et endocrines (Shih et al., 2012).

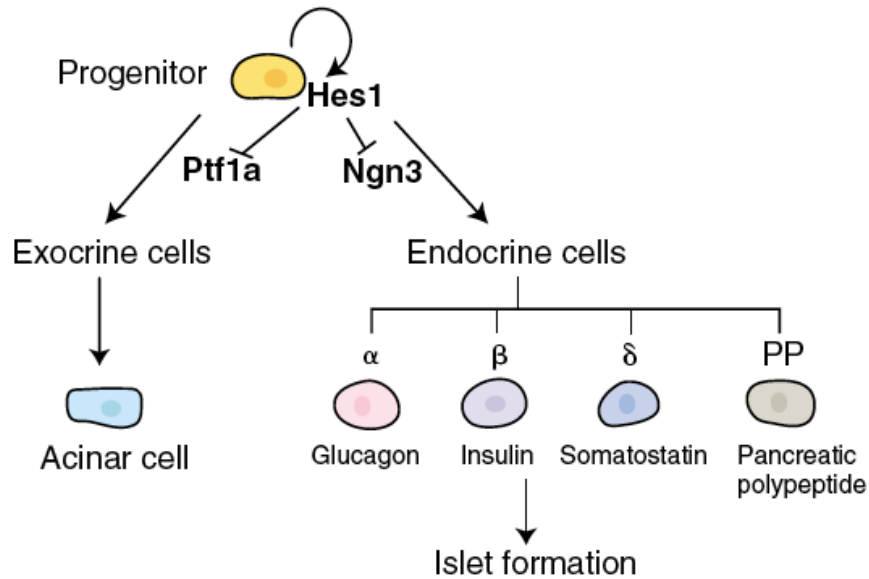


Figure 18 : Hes1 régule la différenciation des cellules pancréatiques.

Au cours du développement, l'épithélium pancréatique donne naissance à la fois aux cellules exocrines et endocrines. Le gène *Ptf1a* régule la différenciation des cellules exocrines, alors que *Ngn3* favorise la différenciation des quatre types de cellules endocrines. Hes1 contrôle le maintien des précurseurs en inhibant l'expression de *Ptf1a* et *Ngn3*. D'après (Kageyama et al., 2007).

4.2.2.2. Le rôle des gènes *Hes* dans la somitogenèse

Certains facteurs *Hes*, comme *Hes1* et *Hes7* sont connus pour réguler leur propre expression en se liant directement à leur promoteur, formant ainsi des boucles de rétro-inhibition (Figure 19A). Ce processus, associé à la demi-vie très courte des ARNm et protéines correspondantes engendre l'expression cyclique de ces facteurs (Hirata et al., 2002) ; (Hirata et al. 2002) ; (Bessho et al., 2003). Ce mode d'expression est requis dans divers contextes développementaux et notamment dans la formation des somites, la différenciation des cellules ES et la neurogenèse.

Les somites, unités segmentaires à l'origine des vertèbres, des côtes, des muscles striés du squelette axial et du derme, sont formées par la segmentation périodique de la région antérieure du mésoderme présomitique (PSM) (Dubrulle and Pourquie, 2004). La formation d'une nouvelle paire se répète toutes les 2 heures chez les embryons de souris, chaque 90 minutes chez le poulet et chaque 30 minutes chez le poisson zèbre. Cette périodicité est contrôlée par une horloge biologique, appelée l'horloge de la segmentation. Il a d'abord été montré chez le poulet que l'expression de *c-Hairy1* était périodiquement propagée comme une

vague de l'extrémité postérieure vers la région antérieure du PSM, chaque onde d'expression conduisant à la génération d'une paire de somites (Palmeirim et al., 1997). Chez la souris, *Hes1*, *Hes5* et *Hes7* présentent le même patron d'expression dans le PSM. D'un point de vue fonctionnel, l'expression périodique de *Hes7* semble être le facteur le plus important pour la segmentation (Figure 19B). En absence de *Hes7*, les somites fusionnent ce qui conduit à la fusion des vertèbres et des côtes (Bessho et al., 2001). Un phénotype similaire est observé quand l'expression de *Hes7* est artificiellement maintenue à niveau élevé (Hirata et al., 2004). Chez le poisson zèbre, les orthologues de *Hes7*, *Her1* et *Her7*, ont aussi des expressions oscillatoires et jouent un rôle semblable (Henry et al., 2002); (Holley et al., 2002); (Choorapoikayil et al., 2012).

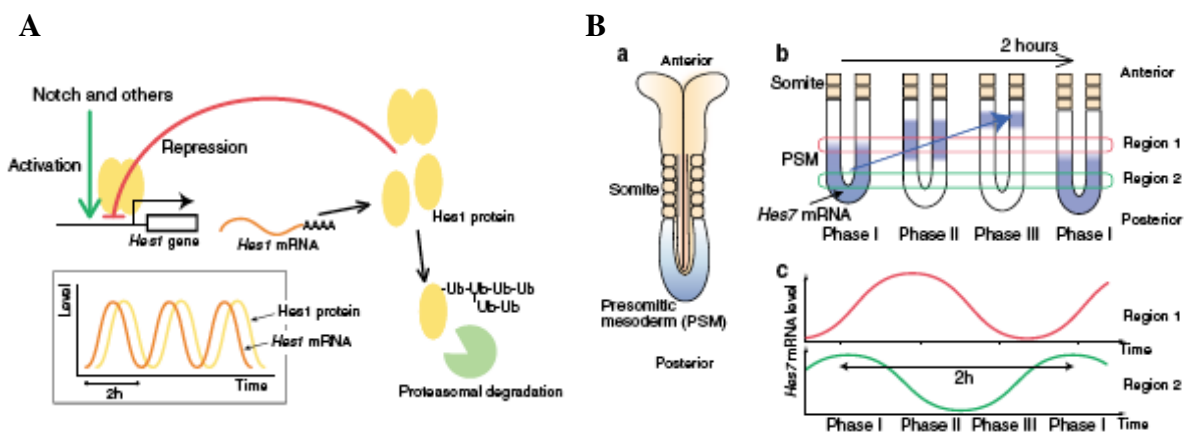


Figure 19 : Les gènes Hes sont des oscillateurs moléculaires.

A. L'expression cyclique de *Hes1* est régulée par une boucle de rétroaction négative. Une fois produit (en aval de la voie Notch par exemple), Hes1 réprime sa propre transcription. Puis, l'ARNm et la protéine disparaissent rapidement à cause de leur demi-vie très courte, autorisant la vague d'expression suivante. Ceci permet à l'expression de *Hes1* d'osciller de manière autonome. **B.** Le gène *Hes7* oscille pendant la somitogenèse. (a) Vue ventrale d'un embryon de souris au stade cinq somites. Les somites se forment périodiquement par la segmentation de la région antérieure du mésoderme présomitique (PSM, représenté en bleu). (b) L'expression de *Hes7* est périodiquement propagée, comme une vague, de l'extrémité postérieure vers la région antérieure du PSM (flèche bleue, phases I, II, III), et chaque cycle conduit à la formation d'une paire de somites (marron). (c) Cette dynamique d'expression est permise par l'oscillation de *Hes7* dans chaque cellule du PSM avec un léger retard de la région postérieure par rapport à la région antérieure. D'après (Kageyama et al., 2007)

Le maintien et la synchronisation de la formation des somites repose sur des boucles de rétro-inhibition complexes. Le gène *Lfng* (lunatic fringe) est l'une des cibles de Hes7. Il code pour une glycosyl-transférase qui module par modification post-traductionnelle l'activité

de Notch (Moloney et al., 2000) ; (Bruckner et al., 2000). *Lfng* est une cible directe de Hes7 et oscille donc en phase avec ce dernier (Bessho et al., 2003). Cette oscillation est également cruciale pour la somitogénèse, puisque la perte comme le maintien de l'expression de *Lfng* conduisent à la fusion des somites. Enfin, *Lfng* inhibe périodiquement le récepteur Notch et donc génère une activité cyclique de cette voie, qui à son tour influence la périodicité de Hes7 (Kageyama et al., 2007) ; (Saga, 2012).

Notons que la somitogénèse repose également sur l'expression périodique de membres d'autres voies de signalisation, comme les voies FGF et Wnt (Saga Y. 2012). L'interaction de tous ces facteurs a fait l'objet de récentes simulations informatiques permettant de modéliser le comportement du PSM (Hester et al., 2011) ; (Tiedemann et al., 2012).

4.2.2.3. *Le rôle de Hes1 dans les cellules ES*

Les cellules souches embryonnaires ES se caractérisent par leur capacité à proliférer indéfiniment et à générer tous les types cellulaires de l'organisme (pluripotence). Elles représentent donc une source très prometteuse de cellules pour la médecine régénérative. Cependant, elles constituent une population de cellules hétérogènes et il est très difficile de diriger leur différenciation de façon univoque vers un type cellulaire d'intérêt, en partie car les bases moléculaires qui sous-tendent leur hétérogénéité ne sont pas claires.

Hes1 est fortement exprimé dans les cellules ES sous le contrôle des voies de signalisation BMP et LIF. Des expériences d'imagerie en temps réel ont révélé que son expression oscille dans les ES avec une période de 3 à 5h (Kobayashi et al., 2009). Cette expression de *Hes1* conduit à des changements dynamiques dans l'expression de ses gènes cibles tels que le ligand de Notch *Dll1* ou *Gadd45γ*, un gène codant un inhibiteur du cycle cellulaire (Kobayashi et al., 2009). Enfin, l'expression cyclique de *Hes1* semble contrôler le lignage des cellules ES. Kobayashi et collaborateurs ont pu classer ces cellules en deux catégories suivant leur taux d'expression de *Hes1*, élevé ou bas. Après induction de la différenciation, ces deux types de cellules adoptent des lignages différents : les cellules ES à forte expression de *Hes1* ont tendance à se différencier en cellules mésodermiques tandis que celles présentant un faible niveau d'expression tendent à se différencier en cellules neurales. En accord avec ceci, l'inactivation de *Hes1* pousse les cellules ES vers une destinée neurale (Kobayashi et al., 2009) ; (Kobayashi and Kageyama, 2010). Ceci suggère que les oscillations de *Hes1* contribuent à la diversification des types cellulaires à partir des cellules ES.

Ces données semblent cependant en contradiction avec de précédents travaux rapportant que l'inactivation de la voie Notch dans les cellules ES favorise la différenciation du mésoderme cardiaque (Jang et al., 2008) ; (Nemir et al., 2006) ; (Schroeder et al., 2003), alors que son activation favorise une destinée neurale (Lowell et al., 2006). Ce paradoxe apparent a été récemment levé puisque, de façon étonnante, *Hes1* s'avère inactiver la voie Notch en réprimant l'expression des ligands *Dll1* et *Jag1* (Kobayashi and Kageyama, 2010). Ainsi, il est probable que l'expression cyclique de *Hes1* modifie dynamiquement l'activité de la signalisation Notch et régule ainsi le choix du destin des cellules ES (Kageyama et al., 2010).

4.2.3. Rôles dans les cellules souches adultes, la quiescence et l'oncogénèse

4.2.3.1. Les gènes Hes dans les cellules souches adultes

Parmi les populations de cellules souches adultes les plus étudiées figurent les cellules souches hématopoïétiques, intestinales, et neurales et je me limiterai à l'exemple de ces deux dernières dans le paragraphe qui suit. De façon intéressante, la voie Notch-Hes a été montrée comme essentielle pour générer les cellules souches hématopoïétiques au cours de l'embryogenèse mais semble dispensable pour leur maintenance chez l'adulte (Bigas and Espinosa, 2012).

(i) Voie Notch-Hes et cellules souches intestinales adultes

Dans l'épithélium intestinal embryonnaire et adulte, les cellules souches donnent naissance à quatre types de cellules : entérocytes (fonction d'absorption), cellules caliciformes (« goblet cells » ; sécrétant le mucus intestinal), cellules entéro-endocrines (sécrétant des hormones) et cellules de Paneth (sécrétant des enzymes digestives et des peptides antimicrobiens). Chez l'adulte, ces cellules souches sont situées près du fond des cryptes des villosités intestinales (Takashima and Hartenstein, 2012) et la voie Notch y est active (Pellegrinet et al., 2011). Le facteur de transcription *Math1* favorise la différenciation des cellules caliciformes, entéro-endocrines et de Paneth. La sur-activation de la voie Notch-Hes1 réprime *Math1* et inhibe en conséquence la formation de ces cellules. À l'inverse, son inactivation dans les souris *RBP-J^{-/-}* entraîne la perte de l'expression de *Hes1*, une surexpression de *Math1* et la différenciation de pratiquement toutes les cellules des cryptes en cellules caliciformes (van Es et al., 2005). Ainsi, la voie Notch-Hes1 régule le maintien à l'état indifférencié des cellules souches/précurseurs intestinaux adultes *via* la répression de

Math1. D'autres analyses ont également montré que la prolifération dans les cryptes intestinales était dramatiquement diminuée dans les souris double KO *Notch1^{-/-}/Notch2^{-/-}* et *Dll1^{-/-}/Dll4^{-/-}* ou triple KO *Hes1^{-/-}/13^{-/-}/15^{-/-}* (Riccio et al., 2008) ; (Pellegrinet et al., 2011) ; (Ueo et al., 2012). Enfin, une étude récente a pu directement mettre en évidence que la cohorte des cellules souches était déplétée après inhibition pharmacologique de la voie Notch, démontrant un rôle crucial de cette dernière dans leur auto-renouvellement et leur survie (VanDussen et al., 2012). Encore une fois cependant, le rôle de cette voie ne s'arrête pas là et elle contrôle également d'autres aspects de l'homéostasie intestinale et notamment les choix de destinée des progéniteurs (Takashima and Hartenstein, 2012).

(ii) Voie Notch-Hes et cellules souches neurales adultes

Le rôle de la voie Notch dans les cellules souches/progéniteurs neurales a été principalement étudié au cours de l'embryogenèse mais des données en nombre croissant suggèrent également son implication dans les cellules souches neurales adultes. Des composants de la voie y sont en effet exprimés et des études récentes utilisant des transgènes rapporteurs montrent son activité dans la zone sous ventriculaire du ventricule latéral (SVZ/LV) et la zone subgranulaire du gyrus denté (SGZ/DG), les deux niches principales de cellules souches neurales du cerveau des mammifères adultes. Plus précisément, les cellules présentant une activité Notch semblent être majoritairement des cellules souches quiescentes et seul un nombre restreint d'entre elles prolifèrent (Imayoshi et al., 2010) ; (Lugert et al., 2010). L'inactivation de *RBP-J* entraîne une augmentation brutale de la prolifération suivie d'une neurogenèse accrue et de la déplétion du pool de cellules souches de la SVZ/LV. Ce phénotype est dû à la conversion prématurée des cellules souches à division lente en progéniteurs amplificateurs de transit (Imayoshi et al., 2010). Des effets similaires sont observés dans la SGZ/DG (Ehm et al., 2010).

Un tel rôle de la voie Notch dans la balance quiescence /neurogenèse n'est pas sans rappeler des données observées chez le poisson zèbre adulte. Dans cette espèce, des niches de neurogenèse constitutive sont maintenues tout au long de la vie animal dans l'ensemble du cerveau. L'activation de la voie Notch y maintient les cellules souches à l'état quiescent alors que son inhibition réinitie leurs divisions cellulaires et leur engagement conséquent vers la neurogenèse (Chapouton et al., 2010). L'activation de la voie Notch dans les cellules souches neurales semble principalement induite par un mécanisme d'inhibition latérale exercé par les progéniteurs nouvellement recrutés. Enfin, il a pu être récemment montré, grâce à des analyses clonales, que la signalisation Notch avait probablement comme effet principal de

limiter le taux de prolifération des cellules souches neurales plutôt que de contrôler leur mode de division (Rothenaigner et al., 2011).

En accord avec ces données, la plupart des gènes *Her* chez le poisson zèbre sont spécifiquement exprimés dans les cellules souches quiescentes, alors que seuls quelques-uns sont exprimés dans les précurseurs engagés dans la prolifération active ou dans la neurogenèse (Chapouton et al., 2011). De façon intéressante, ce profil d'expression des gènes *Her* chez l'adulte contraste avec la situation observée au cours du développement embryonnaire, au cours duquel on les détecte dans les précurseurs en prolifération active. Bien que leurs rôles chez l'adulte et leur dépendance/indépendance vis à vis de la voie Notch restent à déterminer, ceci suggère néanmoins qu'ils exercent des fonctions distinctes dans la neurogenèse embryonnaire et adulte.

4.2.3.2. *Rôle du gènes Hes1 dans la quiescence et l'oncogénèse*

Outre certaines populations de cellules souches, de nombreuses cellules de notre corps comme les fibroblastes, les lymphocytes, les hépatocytes et les cellules germinales sont également en état de quiescence, c'est à dire en dehors du cycle cellulaire mais de façon réversible. Ainsi, contrairement aux autres cellules non prolifératives (cellules sénescents et la plupart des cellules différenciées), seules les cellules quiescentes conservent une capacité à ré-entrer dans le cycle cellulaire en réponse à des signaux appropriés. Elles doivent par conséquent veiller à ne pas s'engager dans des processus irréversibles tels que la sénescence, l'apoptose ou la différenciation. Ces propriétés sont partagées par les « cellules souches cancéreuses », une sous-population cellulaire rare identifiée dans un nombre croissant de tumeurs. Ces cellules sont responsables de l'initiation, de la récurrence tumorale et de la formation des métastases et sont généralement résistantes aux agents chimiothérapeutiques classiques, souvent conçus pour tuer les cellules en prolifération active (Lathia et al., 2011). En période de dormance, elles supportent de faibles taux d'oxygène, de nutriments et un pH acide (Karantza-Wadsworth et al., 2007) ; (White and DiPaola, 2009). Puis, pour des raisons qui demeurent obscures, elles peuvent s'activer, proliférer et former une tumeur secondaire. Ainsi, la capacité à survivre dans un état de repos réversible, hors du cycle cellulaire, est au centre des deux processus de quiescence et de cancer.

Plusieurs études suggèrent que la quiescence, loin d'être un état par défaut, est maintenue par des mécanismes moléculaires spécifiques. En utilisant des puces à ADN, les signatures transcriptomiques de l'état de quiescence des cellules souches hématopoïétiques,

des lymphocytes et des fibroblastes ont été identifiées (Sang et al., 2010). Par ailleurs, Coller et collaborateurs ont pu mettre en évidence qu'il existait en réalité plusieurs programmes de quiescence dépendants du signal initiateur (perte d'adhérence, inhibition de contact ou carence en mitogènes) mais qu'un petit groupe de gènes communs à ces programmes, parmi lesquels *Hes1*, définissait l'état de quiescence *per se* (Coller et al., 2006). La même équipe a pu montrer que *Hes1* était nécessaire et suffisant à la prévention de la sénescence et de la différenciation des cellules quiescentes (Sang et al., 2008). Ils proposent en outre que cette fonction serait permise par la capacité d'*Hes1* à empêcher les modifications chromatiniques nécessaires à la différenciation, *via* le recrutement d'HDACs (Sang and Coller, 2009).

Dans les rhabdomyosarcomes, des tumeurs des muscles squelettiques, le niveau d'expression de *Hes1* est 5 à 50 fois plus élevé que dans les muscles squelettiques sains et l'expression d'un dominant négatif de *Hes1* force les cellules tumorales à cesser de proliférer et à se différencier en muscles (Sang et al., 2008). De même, l'expression de *Hes1* est très élevée dans les adénomes intestinaux et un traitement des souris au DBZ (un inhibiteur de la γ -Sécrétase, enzyme responsable du clivage protéolytique de NICD), conduit à la surexpression de *Math1* et à la différenciation des adénomes en cellules caliciformes (van Es et al. 2005). De plus, dans des souris mutantes pour le gène *Apc*, un modèle d'adénome intestinal, l'inactivation de *Hes1* est suffisante pour réduire la prolifération des tumeurs et induire leur différenciation (Ueo et al., 2012). Tumeurs et cellules quiescentes pourraient donc partager des stratégies similaires de prévention de leur différenciation (Sang et al., 2010).

Enfin, il a été suggéré qu'une expression élevée de *Hes1* pourrait être une caractéristique partagée des cellules souches cancéreuses (Klonisch et al., 2008). Cibler *Hes1* ou les voies de signalisation qui régulent son expression pourrait donc représenter une stratégie thérapeutique prometteuse. Parmi les voies connues pour activer *Hes1* dans les cellules tumorales figurent bien sûr la voie Notch, mais également les voie Hedgehog (Ingram et al., 2008), TGF α /Ras/MAPK (Stockhausen et al., 2005) et c-Jun (Curry et al., 2005) toutes connues pour leur suractivation dans de nombreux cancers et/ou leur rôle dans la maintenance des cellules souches tumorales (Sang et al., 2010).

4.3. ROLES DES GENES *HES1/4* DANS LES CELLULES SOUCHES ET PRECURSEURS NEURAUX EMBRYONNAIRES

4.3.1. *Hes1* et maintenance des précurseurs neuraux au cours du développement du système nerveux

4.3.1.1. Régulation du timing de différenciation au cours du développement du cerveau et de la moelle épinière

(i) Un inhibiteur de la différenciation neuronale

Chez les vertébrés, les gènes *Hes* et la voie Notch jouent un rôle majeur dans le développement neural en permettant l'expansion du pool de progéniteurs *via* l'inhibition de leur différenciation (Kageyama et al., 2008a). Dans le système nerveux embryonnaire des mammifères, l'expression et l'activité de *Hes1* (respectivement suivies par hybridation *in situ* ou grâce à un gène rapporteur) sont principalement limitées à des régions contenant des cellules indifférenciées (cellules neuroépithéliales ou glie radiaire) ; (Sasai et al., 1992) ; (Ohtsuka et al., 2006). Sa surexpression dans le cerveau de souris inhibe la différenciation neuronale et maintient les cellules à l'état de précurseurs (Ohtsuka et al., 2001) ; (Ishibashi et al., 1994). À l'inverse, son invalidation entraîne une augmentation de l'expression de gènes proneuraux tels que *Ascl1* et une différenciation neuronale prématurée (Ishibashi et al., 1995).

Le phénotype n'est cependant pas dramatique et suggère des redondances fonctionnelles entre gènes *Hes*. En accord avec cette hypothèse, une expression compensatoire de *Hes5* est observée chez les souris KO *Hes1*^{-/-} (et *vice-versa*) et les doubles mutants présentent des défauts beaucoup plus sévères que les simples mutants (Hatakeyama et al., 2004). Ainsi, chez les doubles KO, la glie radiaire est très fortement réduite dans la moelle épinière. Elle est en outre virtuellement absente dans le triple KO *Hes1*^{-/-}/*Hes5*^{-/-}/*Hes3*^{-/-}. Par ailleurs, dans ces mutants, la différenciation prématurée de la glie radiaire génère des cellules neuronales mais pas les types cellulaires plus tardifs que sont les astrocytes et les cellules épendymaires. Ces données montrent donc le rôle essentiel des gènes *Hes* dans la maintenance de la glie radiaire et, conséquemment, dans la production en proportion appropriée des types cellulaires précoces et tardifs.

(ii) Expression oscillante de *Hes1* dans les précurseurs neuraux et nouveau modèle de l'inhibition latérale

Les gènes proneuraux et les gènes codant les ligands de Notch sont exprimés de manière « poivre et sel » dans le système nerveux en développement. En outre le niveau d'expression de *Hes1* dans les cellules souches/précurseurs neuraux est variable (Shimojo et al. 2008). Comme évoqué dans le paragraphe 2.2.4.4., il a longtemps été pensé que l'inhibition latérale médiée par la voie Notch/Delta permettait un tel pattern *via* l'amplification de différences stochastiques dans l'expression de ces gènes : certaines cellules exprimant un peu plus *Delta* activent plus fortement la voie Notch dans les cellules voisines qui expriment alors moins de *Delta* et exercent en conséquence un effet inhibiteur moindre sur les premières. Celles-ci peuvent alors se différencier en neurones alors que leurs voisines sont maintenues indifférenciées (Figure 20A). Ce modèle a cependant été récemment révisé suite à la mise en évidence par des expériences d'imagerie en temps réel d'une expression cyclique de *Hes1* dans les cellules souches/précurseurs neuraux embryonnaires. La période (environ 2-3h) ainsi que l'amplitude d'expression sont variables d'une cellule à l'autre et d'un cycle cellulaire à l'autre, suggérant que les oscillations ne sont pas synchronisées (Shimojo et al. 2008). De plus, des oscillations en opposition de phase par rapport à *Hes1* sont observées pour les gènes *Ngn2* et *Delta1*. Ces résultats suggèrent que l'expression cyclique de *Hes1* entraîne celle de *Ngn2* et de *Delta1*. Le pattern « poivre et sel » semble donc juste être un « arrêt sur image » de l'expression oscillante de ces gènes.

Ces résultats ont conduit à l'élaboration d'un nouveau modèle de l'inhibition latérale qui prévoit que seules les cellules où les proneuraux sont exprimés de façon persistante peuvent s'engager dans la différenciation neuronale alors que celles où ils oscillent sont maintenues indifférenciées (Figure 20B); (Kageyama et al., 2008b) ; (Shimojo et al., 2011). Une raison pour laquelle ces deux modes d'expression conduisent à des résultats opposés a été évoqué pour *Ngn2* et tiendrait au fait que nombre de ses gènes cibles répondent lentement à son expression (Castro et al., 2006) ; (Heng et al., 2008). Ainsi, lorsque l'expression de *Ngn2* est cyclique, seule l'expression de quelques gènes à réponse précoce tels que *Delta1* serait induite, sans induction des gènes de différenciation. Ceci favorise alors le maintien des cellules souches/précurseurs neuraux (Figure 20C).

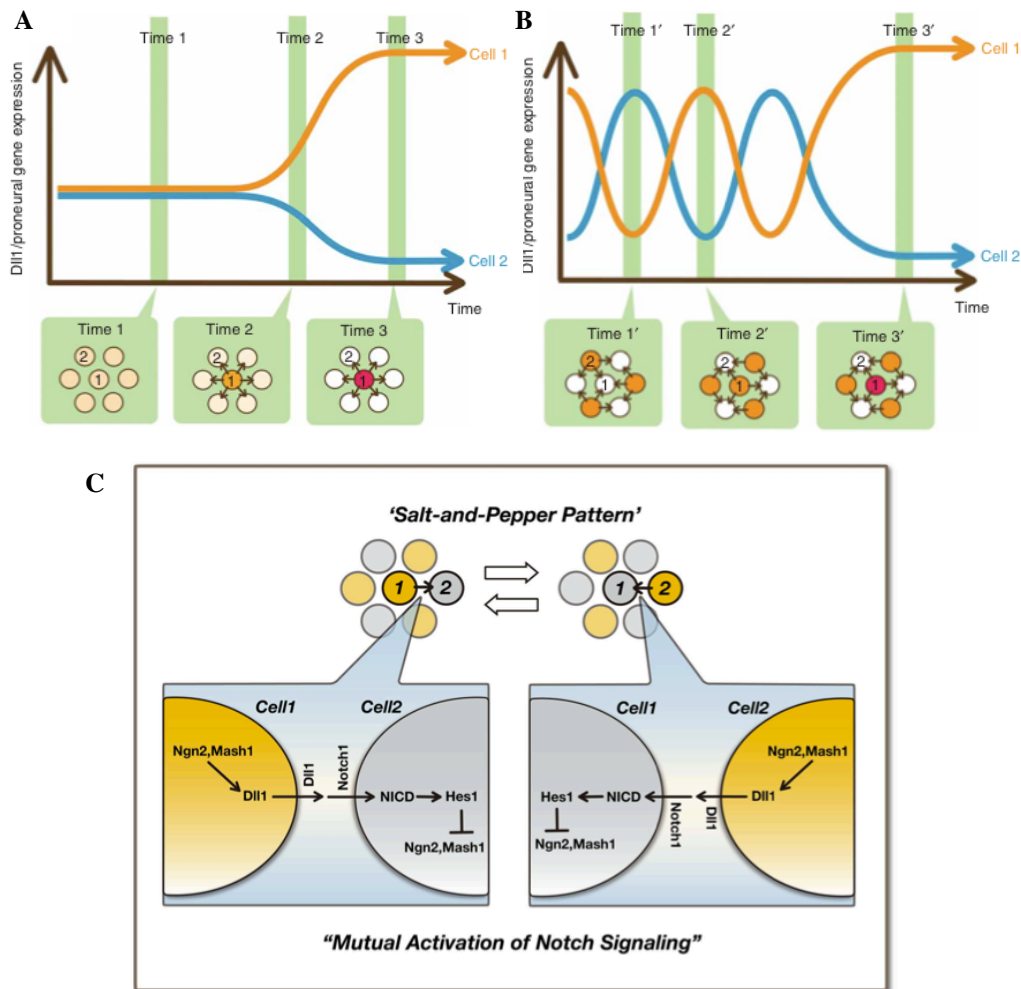


Figure 20 : L'oscillation de la voie Notch régule la maintenance des cellules souches neurales.

A, B. Ancien et nouveau modèle d'inhibition latérale. (A) Dans la vue classique de l'inhibition latérale, tous les progéniteurs neuraux expriment initialement des niveaux équivalents de *Delta* (*Dll1*) et des gènes proneuraux (temps 1). L'inhibition latérale amplifie une différence stochastique d'expression de ces gènes entre les cellules (temps 2). Cette amplification génère un patron d'expression « poivre et sel » qui aboutit à la différenciation neuronale des cellules exprimant les plus forts taux (cellule 1, temps 3). Ces dernières activent la voie Notch chez leur voisines, qui deviennent négatives pour *Dll1* et les proneuraux, restant donc à l'état de progéniteurs (cellule 2). (B) Dans la version révisée de l'inhibition latérale, l'expression « poivre et sel » des gènes *Dll1* et proneuraux est liée à leur oscillation, entraînée par celle de *Hes1*. Ce patron d'expression change de façon dynamique et ne prédit en rien quelle cellule sera sélectionnée pour devenir un neurone. Par exemple la cellule 2 est positive au temps 1' mais devient négative au temps 2' et restera positive au temps 3'. À l'inverse la cellule 1 verra son niveau d'expression d'*Hes1* baisser et celui des proneuraux stabilisée, autorisant sa différenciation. D'après Kageyama 2008. **C.** Les oscillations de *Ngn2* constituent un avantage pour la maintenance des cellules souches/précurseurs neurales car elles induisent l'expression de *Dll1* sans induire la différenciation. D'après (Shimojo et al., 2011).

Enfin, les mécanismes permettant à *Hes1* de s'éteindre pour autoriser l'expression soutenue des proneuraux et donc la différenciation neuronale étaient jusqu'à présent inconnus. Une étude très récente apporte cependant un début d'explication en montrant que le micro-ARN miR-9, qui régule la stabilité des ARNm de *Hes1* (Bonev et al., 2011) ; (Coolen et al., 2012), contribue dans un premier temps aux oscillations de ce dernier mais s'accumule au cours du temps et finit par les supprimer, autorisant alors les cellules à s'engager dans la différenciation (Bonev et al., 2012).

4.3.1.2. Rôle dans la formation des frontières

(i) Un mode d'expression différent dans les frontières et les compartiments

Le système nerveux embryonnaire est subdivisé en plusieurs compartiments par des frontières telles que la zona limitans intrathalamica (Zli ; séparant le thalamus et le préthalamus) et l'isthme (séparant le cerveau moyen du cerveau postérieur ; également appelé MHB pour « Midbrain/Hindbrain Boundary ») (Figure 21). Ces frontières contiennent des cellules neuroépithéliales ayant des caractéristiques particulières : prolifération lente et activité neurogénique absente ou réduite. Elles constituent aussi des centres organisateurs qui spécifient le devenir des compartiments voisins *via* la sécrétion de morphogènes tels que Shh et FGF (Kiecker and Lumsden, 2005). Dans le système nerveux embryonnaire des mammifères, *Hes1* est exprimé à la fois dans les compartiments et dans les frontières, mais son mode d'expression y est différent. Dans les compartiments, son expression est variable d'une cellule à l'autre, suggérant un mode oscillatoire. En revanche elle est maintenue à niveau élevé dans les cellules neuroépithéliales des frontières, comme le sont également celles de *Hes3* et *Hes5* (Figure 21) (Baek et al., 2006) ; (Hatakeyama et al., 2004) ; (Hirata et al., 2001). L'expression forcée de *Hes1* réprime la neurogenèse dans les cellules des compartiments et, à l'inverse, sa perte de fonction entraîne l'expression ectopique des gènes proneuraux dans les frontières, conduisant à leur différenciation et à la perte conséquente de leur activité d'organisateur (Hirata et al., 2001) ; (Baek et al., 2006). Le mode d'expression d'*Hes1* est donc un élément crucial dans la maintenance des cellules frontières à l'état indifférencié.

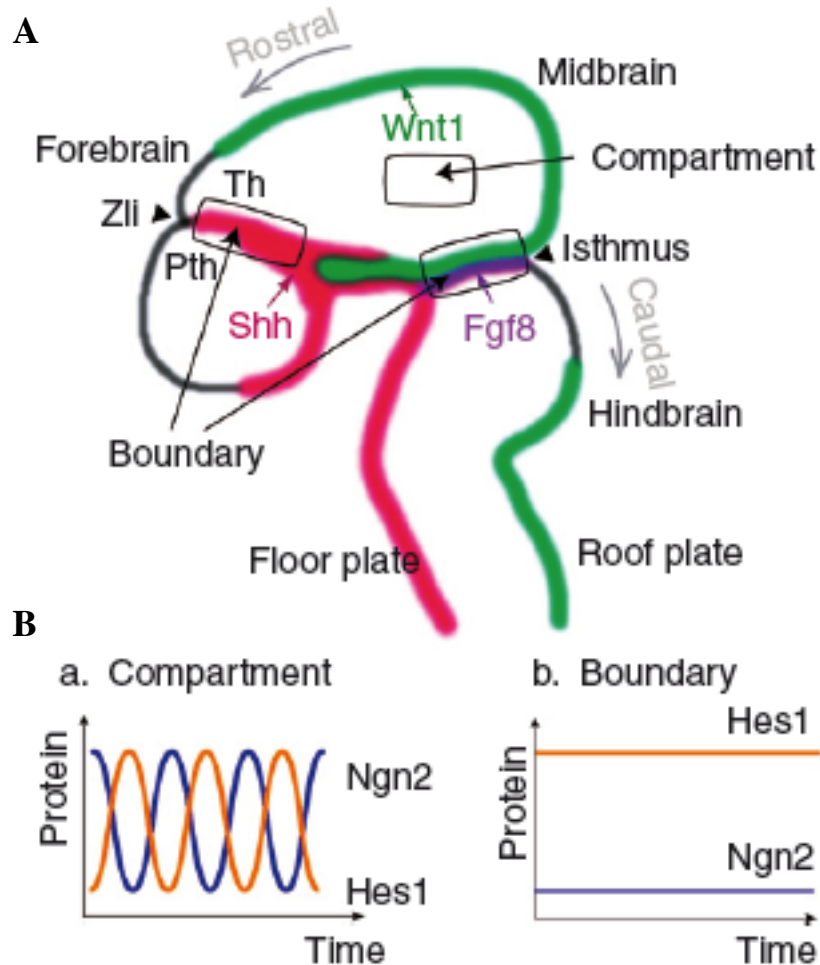


Figure 21 : Les différents modes d'expression de *Hes1* pendant le développement du système nerveux.

A. Le système nerveux est divisé en plusieurs compartiments séparés par des frontières comme l'isthme et la Zli. Dans ces frontières, les cellules expriment des morphogènes tels que Shh et FGF8 qui régulent la spécification régionale des compartiments adjacents. En outre, elles prolifèrent lentement et ne génèrent pas de neurones, à l'inverse de leurs consœurs des compartiments qui prolifèrent rapidement et finissent par se différencier en neurones. Pth : préthalamus; Th : thalamus ; Zli : zona limitans intrathalamica. **B.** L'expression de *Hes1* oscille dans les cellules des compartiments alors qu'elle est maintenue à des niveaux élevés dans les cellules des frontières. En conséquence, l'expression des gènes proneuraux tels que *Ngn2* oscille également dans les cellules des compartiments, mais est constitutivement réprimée dans les cellules frontières. Le mode d'expression (oscillant par rapport à persistant) de *Hes1* régule les caractéristiques propres de prolifération et de différenciation cellulaires des cellules des compartiments et des frontières. D'après (Kageyama et al., 2010).

Comment expliquer par ailleurs les différences de vitesse de prolifération observées entre les cellules des compartiments et celles des frontières ? Outre son rôle dans l'inhibition des gènes proneuraux, *Hes1* réprime divers composants du cycle cellulaire parmi lesquels le

facteur E2F-1 et des cyclines, qui permettent la progression du cycle cellulaire, mais également des inhibiteurs des CDKI, comme p21 et p27, qui antagonisent ce processus (Baek et al., 2006) ; (Shimojo et al., 2011) ; (Kageyama et al., 2008a). Il est donc possible que de faibles niveaux d'expression de *Hes1* dans les cellules des compartiments permettent la prolifération cellulaire en inhibant l'expression de CDKI mais que de forts taux dans les cellules frontières ralentissent la progression du cycle, *via* la répression d'E2F-1 et de diverses cyclines (Kageyama et al., 2008a).

Enfin, les mécanismes qui contrôlent le mode d'expression d'*Hes1* (oscillatoire ou soutenue) restent à déterminer. La voie Stat3-Socs3, dont l'activité oscille également, a été proposée comme candidate pour le maintien de l'expression oscillatoire de *Hes1* (Kageyama et al., 2008a) ; (Kageyama et al., 2009). Le niveau soutenu d'expression de *Hes1* dans les cellules frontières pourrait quant à lui être permis par des protéines de la famille Id (« Inhibitor of Differentiation » ; facteurs à domaine HLH, dépourvus de domaine de fixation à l'ADN). Il a en effet été montré que ces protéines pouvaient interagir directement avec *Hes1*, empêchant sa fixation à son propre promoteur uniquement (Bai et al., 2007). Ces facteurs empêchent donc la rétro-inhibition de *Hes1* sur lui-même sans affecter sa capacité à réguler ses autres gènes cibles.

(ii) Cas des gènes *Her* chez le poisson zèbre

Chez le poisson zèbre au stade plaque neurale, deux types de progéniteurs peuvent également être distingués sur la base de l'expression de gènes de la famille *Hes*. Il s'agit d'une part des pools de précurseurs neuraux (exprimant les gènes *Her4*, *Her2*, *Her12*, *Her15*) et d'autre part des pools de progéniteurs à neurogenèse différée qui sont transitoirement réfractaires à la différenciation (exprimant *Her3*, *Her5*, *Her9*, *Her11* et *Her8a*) (Bae et al., 2005) ; (Webb et al., 2011) ; (Stigloher et al., 2008). Des études principalement menées dans la MHB, montrent que les gènes *Her3/5/9/11* sont essentiels à la maintenance des progéniteurs de cette région à l'état indifférencié, rappelant les propriétés d'*Hes1* dans les frontières des mammifères (Tallafuss and Bally-Cuif, 2003) ; (Geling et al., 2003) ; (Geling et al., 2004) ; (Ninkovic et al., 2005) ; (Ninkovic et al., 2008). De façon intéressante, ces gènes ne sont pas sous la dépendance de la voie Notch, comme c'est le cas de *Hes1* au niveau de la MHB chez la souris (Stigloher et al., 2008). La question de savoir s'ils préfigurent, outre la MHB, les futures frontières du cerveau du poisson zèbre et en contrôlent leurs propriétés (vitesse de prolifération, mode de division...) reste cependant à être investiguée.

4.3.1.3. *Hes1* et rétino-genèse

Chez la souris, le gène *Hes1* est exprimé dans toute la rétine neurale au stade vésicule optique (comme *Pax6*) puis son expression décline au fur et à mesure de l'histogenèse rétinienne. Il s'exprime aussi au niveau du cristallin en formation, de la tige optique et de l'EPR présomptif (Tomita et al., 1996) ; (Lee et al., 2005). Son invalidation perturbe fortement la morphogenèse de l'œil, entraînant la formation de cupules optiques de taille réduite et malformées. Le développement du cristallin et de la cornée est également sévèrement affecté (Tomita et al., 1996). L'analyse des souris KO *Hes1*^{-/-} a révélé au moins deux rôles d'*Hes1* dans la formation de la rétine : (i) un rôle dans la morphogenèse précoce de la vésicule optique en coopération avec *Pax6* (Lee et al., 2005) et (ii) un rôle dans le contrôle du timing de différenciation des cellules rétiniennes (Tomita et al., 1996) ; (Lee et al., 2005) ; (Takatsuka et al., 2004). Une neurogenèse prématurée est en effet observée chez les souris mutantes suite à l'augmentation de l'expression de *Atoh7*, *Ngn2* et *Ascl1*. À l'inverse, la surexpression de *Hes1* provoque le maintien des précurseurs à l'état indifférencié (Tomita et al., 1996) ; (Takatsuka et al., 2004).

En plus de réguler la différenciation neuronale, *Hes1* semble également impliqué dans la spécification du destin glial aux dépens du destin neuronal (Figure 8C) (Furukawa et al., 2000) ; (Muranishi et al., 2011). Chez la souris, *Hes1*, comme *Notch1*, est exprimé dans les précurseurs des cellules de Müller et la surexpression d'un dominant négatif diminue le nombre des cellules gliales de Müller dans la rétine (Furukawa et al., 2000). Un phénotype similaire est observé chez les souris KO *Hes5*^{-/-} (Hojo et al., 2000), suggérant des redondances fonctionnelles entre les deux gènes. En accord avec cette idée, la surexpression dans des explants rétiniens d'une forme constitutivement active de Notch bloque la différenciation neuronale des précurseurs *Hes1*^{-/-} ou *Hes5*^{-/-} mais pas des précurseurs *Hes1*^{-/-}/*Hes5*^{-/-} (Ohtsuka et al., 1999).

Enfin, outre ces rôles dans la différenciation probablement dépendants de la voie Notch, *Hes1* contrôle également la prolifération des précurseurs rétiniens murins indépendamment de cette voie et en aval de Shh. Il a en effet été montré qu'il constituait une cible transcriptionnelle directe de l'effecteur d'Hedgehog Gli2 et qu'il était nécessaire aux effets de la voie sur la régulation du nombre de progéniteurs prolifératifs (Wall et al., 2009).

4.3.2. Le cas de *Hes4*

Contrairement à *Hes1*, le gène *Hes4* (appelé également *XHairy2* chez le xénope, *c-Hairy1* chez le poulet ou *Her9* chez le poisson zèbre) n'a pas été fonctionnellement caractérisé chez les mammifères faute d'être présent dans le génome des rongeurs (il existe chez l'homme cependant).

Chez le xénope, plusieurs études suggèrent ou démontrent son implication dans divers processus développementaux. Ceci comprend la régionalisation du mésoderme (Yamaguti et al., 2005) ; (Murato et al., 2006) la neurogenèse primaire (Andreazzoli et al., 2003), la segmentation des somites (Davis et al., 2001), le développement du pronéphros (Taelman et al., 2006), les étapes précoces du développement du cristallin (Murato et al. 2009) et le devenir des cellules des crêtes neurales (Tsuji et al., 2003) ; (Nagatomo and Hashimoto, 2007) ; (Nichane et al., 2008a) ; (Nichane et al., 2008b). Dans ce dernier contexte, il a pu être montré son rôle essentiel dans la survie et le maintien à l'état prolifératif et indifférencié des précurseurs de la crête neurale (Nagatomo and Hashimoto, 2007) ; (Nichane et al., 2008a). À des stades plus tardifs cependant, il semble également réguler la spécification des dérivés de la crête en favorisant un destin glial aux dépens des destinées mélanocytaires et chondrocytaires (Nichane et al., 2008a).

Chez le poisson zèbre, outre son rôle déjà évoqué dans les pools de progéniteurs à différenciation différée (paragraphe 4.3.1.2), *Her9/Hes4* est requis pour la spécification du plancher neural (Latimer et al., 2005) et dans le patterning de la vésicule otique (Radosevic et al., 2011). Dans ce tissu, son rôle est très similaire à celui observé dans la plaque neurale puisqu'il maintient un groupe de cellules non-neurogéniques à l'état prolifératif et indifférencié en réprimant notamment l'expression de gènes proneuraux et de *cdkn1bl* (gène codant un CDKI).

Enfin, dans l'œil du poussin, *c-Hairy1/Hes4* joue un rôle crucial comme médiateur de la voie Wnt dans la maintenance des cellules de la ZMC (Kubo and Nakagawa, 2009). Sa surexpression inhibe la neurogenèse dans la rétine centrale et y induit l'expression ectopique de marqueurs de la ZMC. À l'inverse, celle d'un dominant négatif provoque une déplétion du pool de progéniteurs de la CMZ.

Notons que dans les cellules des crêtes neurales chez le xénope (Nichane et al, 2008a), le plancher neural et les progéniteurs otiques chez le poisson zèbre (Latimer et al., 2005) (Radosevic et al., 2011) ou les cellules de la ZMC chez le poulet (Kubo and Nakagawa, 2009), l'expression de *Hes4* s'est avérée indépendante de la voie Notch.

5. Objectifs de mon travail de thèse

La découverte des cellules souches adultes dans l'œil des mammifères a donné beaucoup d'espoirs aux chercheurs, afin de guérir les maladies neurodégénératives et restituer la vision. La compréhension des mécanismes qui sous-tendent leur maintenance et leur différenciation est devenue un enjeu majeur et constitue une première étape fondamentale en vue de l'établissement de protocoles de thérapie cellulaire. La rétine du xénope, de ce fait, est un excellent modèle pour étudier les cellules souches neurales *in vivo* et identifier des facteurs et voies de signalisation qui moduleraient leur activité. Beaucoup de progrès ont été réalisés ces dernières années dans la caractérisation des cellules souches de la ZMC. Cela inclut la démonstration de leur capacité d'auto-renouvellement et de multipotence (Centanin et al., 2011) ; (Xue and Harris, 2011), un certain progrès dans la description de leur niche (Locker et al., 2009) ; (Raymond et al., 2006) et l'identification de gènes candidats et de voies de signalisation régulant leur activité post-embryonnaire (Wehman et al., 2005) ; (Moshiri et al., 2005) ; (Locker et al., 2006) ; (Denayer et al., 2008) ; (Kubo and Nakagawa, 2009) ; (Cervený et al., 2010) ; (Cervený et al., 2011) ; (Locker et al., 2010) ; (Parain et al., 2011) ; (Borday et al., 2012). L'ontogenèse des cellules souches adultes et les mécanismes moléculaires qui permettent leur maintenance à l'état indifférencié durant la rétino-genèse embryonnaire demeurent cependant des questions ouvertes et ont été au cœur de mon travail de thèse *via* l'analyse des gènes *Hes1/4*.

Objectif n°1 : Analyse de l'ontogenèse des cellules souches rétiniennes adultes

Comme je l'ai déjà mentionné, le profil spatial des marqueurs des différents types cellulaires au sein de la CMZ reflète leur séquence temporelle d'expression au cours du développement de la rétine (Casarosa et al., 2005) ; (Ohnuma et al., 2002a) ; (Perron et al., 1998). Autrement dit, les gènes qui s'expriment de façon très précoce sont actifs à l'extrême périphérie de ZMC alors que ceux qui s'expriment plus tardivement sont exprimés plus centralement (Figure 11). Nous avons donc émis l'hypothèse que l'établissement des profils d'expression des facteurs *Hes1/4* au cours de la rétino-genèse pourrait rétrospectivement donner des indices sur l'ontogenèse des cellules souches adultes. Notre premier objectif était donc d'étudier leur expression à des stades clefs du développement de la rétine.

Les gènes *Hes1/4* offrent aussi l'opportunité d'utiliser leurs séquences régulatrices pour des études de lignage. Dans ce but, nous avons donc décidé de cloner la séquence promotrice

de *Hes4a* (Davis et al., 2001) et de tester sa potentielle validité dans des animaux transgéniques en tant qu'outil pour des études de lignage.

Objectif n°2 : Analyse fonctionnelle des gènes Hes1/4 au cours de la rétino-genèse embryonnaire

Mon deuxième objectif était de caractériser le rôle des gènes *Hes1/4* au cours du développement de la rétine par le biais d'expériences de gain (injection d'ARNm) et perte de fonction (injection de morpholinos ou de constructions antimorphes). Partant de l'hypothèse d'une fonction éventuelle de ces gènes dans la maintenance des cellules souches au cours du développement, je me suis focalisé sur l'analyse des effets de leur perturbation sur la prolifération et la différenciation des cellules rétinienne embryonnaires.

Objectif n°3 : Analyse fonctionnelle des gènes Hes1/4 dans la rétine post-embryonnaire

Les gènes *Hes1/4*, du fait de leur expression restreinte aux cellules périphériques de la ZMC, sont deux candidats potentiels pour réguler la multipotence et l'auto-renouvellement des cellules souches rétinienne adultes. Pour tester cette hypothèse, mon troisième objectif était de mettre au point des constructions inductibles permettant de réaliser des expériences de gain et de perte de fonction à des stades post-embryonnaires chez des têtards transgéniques.

Objectif n°4 : Régulation des gènes Hes1/4

Des résultats récents du laboratoire montrent que les cellules souches de la rétine du xénope expriment des composants des voies de signalisation Notch (Jang et al., 2008), Wnt (*Wnt8b*, *Wnt2b*), et Hedgehog (*Gli2*, *Gli3*, *Smo*) (Perron et al., 2003) ; (Denayer et al., 2008) ; (Borday et al., 2012). De plus, ces voies régulent la maintenance des cellules souches dans différents tissus dont la rétine (Locker et al., 2009). Mon dernier objectif était donc de déterminer si ces voies régulent l'expression de *Hes1/4* au cours de la rétino-genèse ainsi que dans la rétine adulte afin de positionner ces gènes dans le réseau de voies de signalisation contrôlant les cellules souches rétinienne.

II. MATERIELS ET METHODES

1. Embryons et lignée transgénique

Au cours de ma thèse, j'ai majoritairement utilisé des embryons de *Xenopus laevis* obtenus par fécondation *in vitro* dont le protocole est décrit en annexe II protocole n°1.

La lignée transgénique *Xenopus tropicalis* rapportrice de l'activité de la voie canonique Wnt (Tran et al., 2010) contient la séquence codante d'une eGFP déstabilisée, en amont de laquelle se trouve un promoteur synthétique portant 8 copies d'une séquence de liaison au facteur de transcription TCF (TOP). De plus, ce transgène est encadré par deux séquences insultrices. Les embryons transgéniques ont été obtenus par croisement d'un mâle portant une seule copie du transgène avec une femelle sauvage, nous assurant une descendance transgénique homogène présentant également une unique copie (Borday et al., 2012).

2. Traitements pharmacologiques

Des traitements pharmacologiques ont été utilisés afin d'activer ou d'inhiber les voies de signalisation Wnt, Hedgehog et Notch. Les inhibiteurs sont respectivement : l'IWR-1 (50 μM ; Sigma), la cyclopamine (20 μM ; LC laboratories) et le DAPT (100 μM ; Sigma). La voie Hedgehog peut être activée par la purmorphamine (100 μM ; Calbiochem). Les embryons sont directement traités par addition de ces différentes drogues dans leur milieu d'incubation (MBS 0,1%) pendant 24 heures à 18°C, du stade 25 au stade 35 ou du stade 39 au stade 41. L'activateur de la voie Wnt, BIO (« 6-3'-oxime-bromoindirubin » ; 20 μM ; Sigma), est appliqué pendant une heure sur des embryons au stade 25 ou 39, qui sont ensuite rincés et maintenus dans le milieu d'incubation dépourvu de drogue pendant 15h ou 24h (Borday et al., 2012). Les agents pharmacologiques ayant été dissouts dans du DMSO ou de l'éthanol, les embryons utilisés comme contrôles sont donc incubés en MBS 0,1X contenant la même quantité de solvant que la condition pharmacologique correspondante. L'efficacité de chaque drogue est systématiquement évaluée par hybridation *in situ* contre des gènes cibles connus de la voie considérée : *Gli1* ou *Patched1* (*Ptc1*) pour Hedgehog (Locker et al., 2006), *CyclinD1* pour Wnt (Denayer et al., 2008), *HRT1* (Taelman et al., 2006) ou *Atoh7* pour Notch.

3. Oligonucléotides Morpholinos

Les oligonucléotides morpholinos suivants, générés par Genetools, ont été utilisés afin d'interférer avec le transcrit correspondant:

Mo Hes1 : 5'-AGTTCTTCTCCATCACATCAGCCGG-3'

Mo Hes4a : 5'-ATGGTATCTGCGGGCATGTTTCAGTT-3'

Mo Hes4b : 5'-GGCATGTTTCAGATGTTGTATCCGGA-3'

Mo contrôle standard : 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTAT-3'

La spécificité et l'efficacité des oligonucléotides morpholinos Mo Hes4a et Mo Hes4b avaient précédemment été vérifiées (Nichane et al., 2008a). Afin de vérifier l'efficacité du Mo Hes1, j'ai réalisé une construction contenant sa séquence complémentaire en amont de la séquence codante de la GFP (*Hes1c-GFP* ; Figure 26). Pour cela, j'ai amplifié la séquence codante de la GFP au moyen des amorces suivantes :

- Amorce « forward » :

5'-GATCGGATCCCGGCTGATGTGATGGAGAAGAAGTCCATGAGTAAAGGAGAAGAA-3'

En bleu : introduction d'un site de restriction BAMH1. En rouge : séquence complémentaire du Morpholino. En vert, séquence complémentaire de la GFP.

- Amorce « reverse »:

5'-ACTCACTATAGTTCTAGAGGCT-3'

En bleu : site de restriction XBA1.

Les étapes suivantes ont consisté à digérer le produit de la PCR et le plasmide pCS2 par BAMH1 et XBA1, puis à effectuer une ligation, et enfin à transformer des bactéries compétentes. Les protocoles utilisés sont décrits en annexe II protocole n°2.

4. Vecteurs d'expression

Les plasmides d'expression suivants ont été utilisés : *pCS2-Flag-Hes1* et *pCS2-Flag-Hes4* (anciennement appelés *XHairy1* et *XHairy2* respectivement) ; (Taelman et al., 2006), *pCS2-Hes1-GR* (construction réalisée par Massimo Nichane), *pCS2-Hes4-myc-GR* (Nichane et al., 2008a), *pCS2-Hes2* (Solter et al. 2006), *pCS2-Xgadd-45γ* (Decembrini et al., 2006), *pCS2-GFP* et *pCS2-LacZ*. *pCS2-myc-Hes4-VP16-GR* code pour une forme antimorphe de Hes4 où le domaine de transactivation de la transcription VP16 est fusionné au domaine carboxyl-terminal de Hes4 (construction réalisée par Massimo Nichane ; non publiée).

Afin d'obtenir les constructions *promHes4a-eGFP* et *promHes4a-TurboGFP*, le promoteur Hes4a a été amplifié par PCR à partir d'une préparation d'ADN génomique, grâce aux amorces suivantes qui contiennent les sites de restriction EcoRI (en bleu) et XmaI (en rouge) :

Forward EcoRI : **5'-CGCGAATTCTCTGTCTGGTGCAAAGCGCTA-3'**

Reverse XmaI : **5'-GCGGCCCGGCCAAGTTCAGTTGCTGGTACAG-3'**

Le produit de la PCR ainsi que les vecteurs *pEGFP-1* (Genbank accession : #:55761) et *pTurboGFP-PRL-dest1* (evrogen) ont été digérés avec les enzymes de restriction précédemment citées puis la ligation des produits de digestion a été réalisée.

Les constructions *Hsp70-Hes1/4*, *Hsp70-Hes1/4-GR* et *Hsp70-Hes4-VP16-GR* sont détaillées en annexe III.

5. Micro-injection et lipofection *in vivo*

Les ARNm sont synthétisés à l'aide du kit mMessage mMachine™ SP6 selon le protocole du fournisseur (Ambion).

Les embryons sont placés dans une solution de ficoll 5% en MBS 0,1X. Les ARNm *Hes1-GR* et *Hes4-GR* (250 pg et 500 pg, respectivement) sont injectés au niveau du pôle animal d'embryons au stade 2 cellules, dans un ou les deux blastomères. L'injection de L'ARNm *Hes4-Myc-VP16-GR* est réalisée au stade 4 cellules en ciblant au pôle animal l'un des deux blastomères à l'origine de l'épiderme. Les ARNm codant la β-galactosidase ou la GFP servent de traceur et sont donc co-injectés avec les ARNm pré-cités. Les embryons sont ensuite transférés en MBS 0,1X. L'activité des protéines fusionnées au récepteur des glucocorticoïdes (GR) est induite par ajout de dexaméthasone (4 μg/ml) dans le milieu d'incubation des embryons au stade 12.

Les oligonucléotides morpholinos (8 à 20 ng) sont injectés dans un blastomère au stade 4 ou 8 cellules. Mo Hes4a et Mo Hes4b sont co-injectés pour inhiber l'activité des deux alloallèles de *Hes4*.

Les lipofections (Ohnuma et al., 2002b) sont réalisées aux stades 17/18 dans les territoires présomptifs des rétines. Le mélange injecté contient 2 μg d'ADN plasmidique d'intérêt, 1,5 μg du plasmide *pCS2-GFP* et 3 μl de DOTAP (agent lipofectant ; Roche) par μg d'ADN.

6. Hybridation *in situ*

Les embryons sont fixés au stade choisi en MEMFA (MEM 1X, formaldéhyde 3,7%). L'activité de la β -galactosidase est révélée grâce à son substrat, la Red-Gal, et permet de visualiser les territoires embryonnaires transfectés.

Après linéarisation des plasmides d'intérêt, les sondes antisens marquées à la digoxygénine sont synthétisées grâce à l'ARN polymérase T3, T7 ou SP6 en utilisant le protocole standard de transcription *in vitro* (Roche). Les hybridations *in situ* sont réalisées sur embryons *in toto* en suivant le protocole décrit par N. Pollet (Pollet et al., 2003) et détaillé en annexe III protocole n°3. À la fin de l'hybridation *in situ* les embryons sont inclus en agarose 4% puis coupés au vibratome (50 μ m) transversalement. Les sections de rétines sont visualisées au microscope (Zeiss, Imager M2) et photographiées à l'aide du logiciel AxiovisionREL 7.8. La surface de marquage dans les CMZ dorsale et ventrale est manuellement délimitée et mesurée en pixel² à l'aide du logiciel Adobe photoshop CS4.

7. Marquages au BrdU ou à l'EdU

Les embryons sont anesthésiés dans du MS222 à 0,4 g/L. Le BrdU (10 mM, Sigma) ou l'EdU (1 mM, Invitrogen) est injecté dans leur abdomen. La durée d'incorporation avant fixation des embryons dépend du type d'expérience. Pour les expériences de "birthdating", visant à analyser le timing de sortie du cycle cellulaire des progéniteurs rétiniens, les embryons sont injectés toutes les 10-12 heures, du stade 32/34 au stade 41. Pour les expériences d'EdU cumulatif, visant à suivre la progression des précurseurs rétiniens dans le cycle cellulaire et ainsi à analyser les paramètres de celui-ci, les embryons sont fixés après des durées croissantes d'incorporation d'EdU.

8. Immunocytochimie sur coupes cryostat et paraffine

Les embryons destinés à être coupés au cryostat sont fixés en PFA 4% pendant 2h à température ambiante, puis incubés 2h dans une solution de sucrose 30% avant d'être inclus en OCT, congelés et enfin sectionnés (épaisseur de 12 μ m). Les embryons destinés à être coupés au microtome sont fixés en PFA 4% toute la nuit à 4°C, puis déshydratés en éthanol et, après une nuit en butanol, inclus en paraffine. Les détails de ce protocole ainsi que celui de l'immunomarquage sont détaillés en annexe III protocole n°4 et n°5. Les anticorps utilisés sont listés dans la table supplémentaire 1 de mon article El Yakoubi *et al.* 2012. La détection de l'EdU incorporé s'effectue avec le kit Click-iT® EdU Imaging (Molecular Probes).

Ma participation à la mise au point des techniques de marquage à l'EdU chez le xénope, m'a valu d'être co-auteur d'un chapitre du livre *Xenopus Protocols*, 2nd edn, sous presse dans *Methods Mol. Biol.* en 2012 (voir ANNEXE I, Article n°3):

A Bromodeoxyuridine (BrdU) based protocol for characterizing proliferating progenitors in Xenopus embryos ; Helene Auger, Raphael Thuret, Warif El Yakoubi and Nancy Papalopulu

9. Analyse des paramètres du cycle cellulaire

Cette analyse a été réalisée dans le neuroépithélium d'embryons au stade 22 ou 25. La proportion de cellules en prolifération (« Growth Fraction » ou GF), la durée totale du cycle cellulaire (T_C) et celle de la phase S (T_S) ont été déterminées grâce aux expériences d'EdU cumulatif, en utilisant une feuille de calcul Excel fournie par le Pr Richard Nowakowski (Nowakowski et al., 1989). L'indice mitotique, correspondant au pourcentage de cellules en phase M parmi les cellules prolifératives, a été calculé après évaluation de la proportion de cellules en mitose parmi les noyaux (%M) et correction après détermination de la GF suite aux expériences d'EdU cumulatif. Le pourcentage de cellules EdU⁺/pH3⁺ (cellules qui ont progressé de la phase S à la phase M du cycle cellulaire) a été évalué après différents temps d'exposition à l'EdU (Locker et al. 2006). La durée moyenne de la phase G2 (T_{G2}) correspond au temps requis pour atteindre 50% de cellules doublement marquées EdU⁺/pH3⁺ (Arai et al., 2011). La durée de la phase M (T_M) est calculée après détermination de %M, T_C et GF selon la formule suivante : $T_M = \%M * GF * T_C$. Enfin, la durée de la phase G1 (T_{G1}) est déduite grâce à la formule : $T_{G1} = T_C - (T_S + T_{G2} + T_M)$.

10. Rétro-transcription et PCR quantitative en temps réel

Les rétines d'embryons au stade 35, préalablement anesthésiés dans du MS222 à 0,4 g/L, sont disséquées et les ARNm totaux en sont extraits puis purifiés grâce au kit Nucleospin RNA XS (Macherey Nagel). La rétro-transcription est réalisée à l'aide du kit Iscript cDNA Synthesis (Biorad), et la PCR quantitative en temps réel (qPCR) en utilisant le kit SsoFastEvaGreenSupermix (Biorad). Le protocole est décrit en annexe III protocole n°5. Les résultats sont normalisés par rapport à l'expression des gènes de référence *ODC* et *RPL8* en utilisant le logiciel Biorad CFX Manager Software. Les séquences des amorces PCR sont listées dans la table supplémentaire 2 de mon article El Yakoubi *et al.* 2012.

11. Western Blot

Afin de valider la spécificité et l'efficacité du Mo Hes1, j'ai vérifié par western blot que la traduction de l'ARNm Hes1c-GFP était bloquée suite à l'injection du Morpholino. L'analyse en Western blot des embryons (n=8) a été réalisée à l'aide de l'anticorps primaire polyclonal anti-GFP (1:3000 ; Molecular Probe) et d'un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (1:10000 ; Sigma).

12. Quantification et tests statistiques

Toutes les expériences ont été réalisées au moins deux fois. Les résultats illustrés dans les figures correspondent à une expérience représentative. Dans chaque histogramme sont indiquées les valeurs moyennes \pm s.e.m. Les analyses statistiques de chaque expérience ont été réalisées soit par application du test t de Student (comparaison de deux conditions expérimentales), soit après analyse de la variance (One-way ANOVA), puis application du test Tukey's post hoc (comparaison de plus de deux conditions expérimentales). La significativité des résultats est indiquée comme suit : *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

13. Transgénèse

Les plasmides *promHes4a-eGFP* et *promHes4a-TurboGFP* sont linéarisés à l'aide de l'enzyme de restriction StuI, alors que les plasmides *Hsp70-GFP* et *Hsp70-Wnt8-Hsp-GFP* sont linéarisés respectivement par ApaI et ScaI. Ils sont ensuite ajoutés à un extrait spermatique et injectés dans des ovocytes par la méthode de transgénèse REMI (Chesneau et al., 2008) modifiée (sans l'utilisation d'enzymes de restriction).

III. RESULTATS

Au cours des deux premières années de ma thèse, j'ai mené en parallèle l'analyse fonctionnelle des gènes *Hes1* et *Hes4*. Comme le rôle de *Hes4* dans les cellules souches neurales est inconnu, j'ai finalement décidé de me focaliser plus précisément sur ce dernier qui a donc fait l'objet de l'article présenté ci-après. Je résumerai ensuite les principaux résultats concernant *Hes1* avant de présenter brièvement les autres sous-projets que j'ai entamés.

1. Expression, régulation et fonction du gène *Hes4* au cours de la rétino-genèse embryonnaire

1.1. RESUME DES PRINCIPAUX RESULTATS

1.1.1 Profil d'expression de *Hes4*

Le profil d'expression du gène *Hes4* au cours de la rétino-genèse embryonnaire a été établi (Figure 1 de l'article ci-après ; Figure 22) et s'est révélé très original par rapport aux profils de marqueurs de la ZMC comme *Pax6* ou *Rx* (gènes exprimés dans toute la ZMC, y compris dans les cellules souches). Comme ces derniers, son expression débute très précocement au niveau des champs optiques mais uniquement dans la région proximo-dorsale. Au stade vésicule optique, *Hes4* est détecté dans le territoire présomptif de l'épithélium pigmenté rétinien (EPR) ainsi qu'à la frontière EPR/rétine neurale mais il est absent de la rétine neurale qui exprime les gènes *Pax6* et *Rx*. Son expression s'éteint ensuite dans l'épithélium pigmenté en cours de différenciation pour se restreindre à la ZMC en formation avant d'être finalement confinée à l'extrême périphérie de cette dernière dans la rétine mature, zone où résident les cellules souches neurales.

Ce patron d'expression rappelle celui des gènes *Gli3* et *Smo*, décrits auparavant comme étant des marqueurs de cellules souches rétinienne (Perron et al., 2003). De plus, nous avons décrits deux autres gènes, *Id2* et *Wnt8b*, qui affichent le même profil d'expression (Figure S2 de l'article) ; (Borday et al., 2012).

Ces données suggèrent fortement que les cellules souches adultes proviennent d'une population de cellules situées à la frontière entre l'EPR et la rétine neurale.

1.1.2 Régulation de *Hes4*

Parmi les voies de signalisation candidates pour réguler l'expression du gène *Hes4* figurent la voie Wnt, connue pour être active dans la région périphérique de la rétine (Denayer et al., 2008) ; (Kubo and Nakagawa, 2008) ; (Van Raay and Vetter, 2004) ; Figure S3 de l'article), la voie Hedgehog qui régule directement l'expression du gène *Hes1* dans les précurseurs rétiniens chez la souris (Wall et al., 2009) et bien sûr la voie Notch. Nous avons donc testé les effets de perturbations pharmacologiques de ces voies sur l'expression de *Hes4* dans la ZMC. Les drogues utilisées sont le DAPT pour inhiber la voie Notch, BIO ou IWR1 qui permettent l'activation ou l'inhibition la voie Wnt et la purmorphamine ou la cyclopamine qui servent à activer ou à inhiber la voie Hedgehog (Figures 2 et S5 de l'article).

Nos résultats montrent que l'inhibition de la voie Notch pendant 24h n'affecte pas l'expression de *Hes4*. En revanche, cette dernière dépend de la voie Wnt puisqu'une diminution est observée après inhibition par l'agent IWR1. En gain de fonction Wnt, nous avons pu constater qu'un traitement par BIO activait comme attendu l'expression de *Hes4* après 15h mais la diminuait après 24h. Nos résultats suggèrent que ceci est probablement lié à une boucle de rétroaction négative exercée par *Hes4* sur sa propre transcription (Figure S4 de l'article). Enfin, l'activation de la voie Hedgehog réprime l'expression de *Hes4* alors que son inhibition l'augmente.

L'ensemble de ces données montre que l'expression de *Hes4* ne dépend pas de la voie Notch, qu'elle est activée par la voie Wnt et réprimée par la voie Hedgehog.

1.1.3 Analyse fonctionnelle de *Hes4*

Nous avons pu montrer par des expériences d'injection d'ARNm au stade 2 cellules que la surexpression conditionnelle de *Hes4* inhibait la différenciation des précurseurs de l'EPR et de la rétine neurale (Figure 4 de l'article). L'analyse par hybridation *in situ* de marqueurs précoces de la rétine neurale (*Pax6* et *Rx*), de l'EPR (*Mitf1a*) et de gènes proneuraux (*Atoh7*, *Neurog2*, *NeuroD4*) montrent que le facteur *Hes4* n'affecte pas l'identité rétinienne des précurseurs neuraux mais empêche leur engagement vers une destinée neuronale ou EPR.

Nous avons également pu mettre en évidence que ce blocage de la différenciation était associé à un maintien des précurseurs dans un état prolifératif (Figure 5 de l'article). Enfin, des analyses en condition clonale par la technique de lipofection *in vivo* (Ohnuma et al., 2002b) montrent que ces effets sont autonomes cellulaires (Figures 4 et 5 de l'article).

Les rétines des embryons surexprimant *Hes4* présentent un caractère microphtalmique (taille réduite), un phénotype contre-intuitif au vu du maintien prolongé des précurseurs en prolifération. Nous avons donc cherché à savoir si cela pouvait résulter d'un ralentissement de la vitesse des divisions cellulaires. Nos résultats démontrent en effet que la vitesse globale du cycle cellulaire est significativement diminuée après surexpression de *Hes4*, en raison principalement d'un allongement de la phase G1 (Figure 6 de l'article). *Hes4* semble donc réguler la cinétique du cycle cellulaire et maintenir les cellules en prolifération lente.

Enfin, nous avons pu montrer que les cellules *Hes4*⁺ situées à la frontière entre l'EPR et la rétine neurale présentent effectivement un cycle cellulaire plus long que leurs consœurs *Hes4* de la rétine neurale (Figure 6 de l'article). Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle *Hes4* contrôlerait la vitesse de divisions des cellules souches rétiniennes embryonnaires.

1.2. CONCLUSIONS

L'ensemble de ces résultats (i) nous permet de proposer que les cellules souches rétiniennes adultes trouvent leur origine dans une sous-population cellulaire située à la frontière EPR/rétine neurale et (ii) suggère que le facteur *Hes4* permettrait leur maintien au cours de la rétino-genèse embryonnaire dans un état indifférencié et prolifératif mais avec une vitesse de division lente. Ces données ont fait l'objet de la publication ci-après, sous press à *Stem Cells* : ***Hes4* controls proliferative properties of neural stem cells during retinal ontogenesis;** Warif El Yakoubi, Caroline Borday, Johanna Hamdache, Karine Parain, Hong Thi Tran, Kris Vleminckx, Muriel Perron and Morgane Locker



Hes4 controls proliferative properties of neural stem cells during retinal ontogenesis

Journal:	<i>Stem Cells</i>
Manuscript ID:	SC-12-0505.R1
Manuscript Type:	Original Research
Date Submitted by the Author:	22-Jul-2012
Complete List of Authors:	El Yakoubi, warif; Univ Paris-Sud, UPR CNRS 3294, Borday, Caroline; Univ Paris-Sud, UPR CNRS 3294, Hamdache, Johanna; Univ Paris-Sud, UPR CNRS 3294, Parain, Karine; Univ Paris-Sud, UPR CNRS 3294, Tran, Hong Thi; Dept. of Molecular Biomedical Research, VIB and Dept. Biomedical Molecular Biology, Ghent University, Vleminckx, Kris; Dept. of Molecular Biomedical Research, VIB and Dept. Biomedical Molecular Biology, Ghent University, Perron, Muriel; Univ Paris Sud, UPR CNRS 3294 Locker, Morgane; Univ Paris-Sud, UPR CNRS 3294,
Keywords:	Retina, Developmental biology, Transcription factors, Neural stem cell, Proliferation, Cell cycle

SCHOLARONE™
Manuscripts

view

Hes4 controls proliferative properties of neural stem cells during retinal ontogenesis

Warif El Yakoubi¹, Caroline Borday¹, Johanna Hamdache¹, Karine Parain¹, Hong Thi Tran^{2,3},
Kris Vleminckx^{2,3}, Muriel Perron^{1§} and Morgane Locker^{1§}

¹ Univ. Paris-Sud, UPR CNRS 3294, 91405 Orsay, France, ² Dept. of Molecular Biomedical Research, VIB and ³ Dept. Biomedical Molecular Biology, Ghent University, B-9052 Ghent, Belgium.

§ Authors for correspondence : morgane.locker@u-psud.fr, Tel. +331 69 15 50 04; muriel.perron@u-psud.fr, Tel. +331 69 15 72 02; Fax. +331 69 15 68 02

Author contribution:

Warif El Yakoubi: Conception and design, Collection and assembly of data, Data analysis and interpretation

Caroline Borday: Collection and assembly of data, Data analysis and interpretation

Johanna Hamdache: Collection and assembly of data

Karine Parain: Collection and assembly of data

Hong Thi Tran: Provided Wnt-responsive transgenic animals

Kris Vleminckx: Provided Wnt-responsive transgenic animals

Muriel Perron: Conception and design, Data analysis and interpretation, Manuscript writing

Morgane Locker: Conception and design, Collection and assembly of data, Data analysis and interpretation, Manuscript writing

Key words: Retina; Neural stem cells; *Hes4/XHair2*; Wnt and Hedgehog signalling; Cell cycle kinetics

Running title: *Hes4* and retinal stemness

Summary

The retina of fish and amphibian contains genuine neural stem cells located at the most peripheral edge of the ciliary marginal zone (CMZ). However, their cell-of-origin as well as the mechanisms that sustain their maintenance during development are presently unknown. We identified *Hes4* (previously named *XHair2*), a gene encoding a bHLHO transcriptional repressor, as a stem cell specific marker of the *Xenopus* CMZ that is positively regulated by the canonical Wnt pathway and negatively by Hedgehog signalling. We found that during retinogenesis, *Hes4* labels a small territory, located first at the pigmented epithelium (RPE)/neural retina (NR) border and later in the retinal margin, that likely gives rise to adult retinal stem cells. We next addressed whether *Hes4* might impart this cell subpopulation with retinal stem cell features: inhibited RPE or NR differentiation programs, continuous proliferation and slow cell cycle speed. We could indeed show that *Hes4* overexpression cell autonomously prevents retinal precursor cells from commitment towards retinal fates and maintains them in a proliferative state. Besides, our data highlight for the first time that *Hes4* may also constitute a crucial regulator of cell cycle kinetics. *Hes4* gain of function indeed significantly slows down cell division, mainly through the lengthening of G1 phase. As a whole, we propose that *Hes4* maintains particular stemness features in a cellular cohort dedicated to constitute the adult retinal stem cell pool, by keeping it in an undifferentiated and slowly proliferative state along embryonic retinogenesis.

Introduction

Contrasting with the mammalian situation, the retina of adult fish and amphibians contains a population of neural stem cells, which allow continuous tissue growth throughout the animal life, as well as regeneration following retinal damage [1]. These retinal stem cells (RSCs) reside in a permanently proliferating region located at the margin of the retina, known as the ciliary marginal zone (CMZ; [2]). The spatial organization of the CMZ mirrors the temporal sequence of retinal development with stem cells being found in its most peripheral part, successively followed more centrally by actively dividing progenitors and then by their post-mitotic progeny [3, 4].

Much progress has been made these past few years in the characterization of CMZ neural stem cells. This includes the formal demonstration of their multipotency and self renewal ability [5, 6], advance in the description of their niche [7, 8] and the identification of candidate genes and signalling pathways to regulate their post-embryonic activity [9-17]. However, several questions remain unresolved and in particular, that of their embryonic origin. Whether they arise from a discrete population of cells and how they escape from cell cycle exit and differentiation signals during retinal development is hitherto unknown. Comprehensive analysis of RSC ontogeny and properties necessitates reliable markers to formally identify these immature cells within proliferating heterogeneous cell populations *in vivo*. To gain insight into the molecular signature of RSCs, we recently performed a large-scale expression screen in the *Xenopus* CMZ [14]. Among identified RSC markers, we retrieved the *Hes4* gene (previously known as *XHairy2* in *Xenopus* and ortholog of zebrafish *Her9* and chick *cHairy1*) that encodes a transcriptional repressor of the bHLH-O family.

Hes family genes are well known as Notch transcriptional targets that can regulate cellular differentiation, cell fate decisions and embryonic patterning in various developmental

1
2
3 systems [18, 19]. Notably, several members of this family, including *Hes1*, which is closely
4
5 related to *Hes4* in terms of sequence similarity [18], have been intensively studied in the
6
7 developing vertebrate brain. In this context, several lines of evidence converge towards a role
8
9 in boundary formation and maintenance of neural stem/progenitor cells, mainly through
10
11 prevention of neuronal differentiation [20-27]. *Hes1* is expressed as well in the embryonic
12
13 retina, where it regulates distinct aspects of eye morphogenesis and is required for proper
14
15 timing of neurogenesis [28-30]. *Hes1* also emerged as a safeguard of cellular quiescence,
16
17 through protection against terminal differentiation and permanent cell cycle arrest [31, 32]. In
18
19 contrast to *Hes1*, the *Hes4* gene was largely ignored in mammalian studies, presumably due to
20
21 the absence of an ortholog in mouse. It is, however, expressed in humans and has been shown
22
23 to be involved in several aspects of other vertebrate species development. In particular, *Hes4*
24
25 proved to play a significant role in maintaining the undifferentiated state of *Xenopus* neural
26
27 crest cells [33-35] and zebrafish inner ear progenitors [36]. In addition, a recent publication
28
29 by Kubo and Nakagawa identified the chick *Hes4* ortholog, *cHairy1* [37], as highly expressed
30
31 in the CMZ and required for the maintenance of this structure downstream Wnt signalling
32
33 [38]. We thus decided to gain further insights into *Hes4* expression and function in the
34
35 developing *Xenopus* retina.
36
37
38
39

40 We found that in contrast to mouse *Hes1* [28, 30] and chick *cHairy1* [39], *Hes4* is not
41
42 expressed in the neural retina at any stage examined, but labels the presumptive retinal
43
44 pigmented epithelium (RPE) and forming CMZ before being restricted to stem cells of the
45
46 mature retina. Wnt and Hedgehog signalling pathways contribute to this dynamic expression
47
48 pattern through positive and negative regulation, respectively. Finally, functional analysis
49
50 revealed that *Hes4* imparts retinal cells with stem-like properties: inhibited commitment
51
52 towards RPE and neuronal fate, prolonged proliferative capacities and slow cell cycle
53
54 kinetics.
55
56
57
58
59
60

Materials and Methods

Embryo collection, transgenic line

Xenopus laevis embryos were obtained by conventional methods of *in vitro* fertilization. *Xenopus tropicalis* transgenic animals carrying the Wnt reporter pbin8Lef β GFP construct have previously been described [40] and were obtained by natural fertilization between a wild type female and a transgenic male carrying a single insertion of the transgene [41]. All experiments were approved by the Direction Départementale des Services Vétérinaires de l'Essonne, Evry, France.

Pharmacological treatments

Cyclopamine (20 μ M; LC Laboratories), purmorphamine (100 μ M; Calbiochem), DAPT (100 μ M; Sigma) and IWR-1 (50 μ M; Sigma) were applied to the embryo culture medium from stage 25 to stage 35. BIO (20 μ M; 6-bromoindirubin-3'-oxime, Sigma) was applied for one hour on stage 25 embryos, which were then rinsed and kept in drug-free medium for 15 or 24 hours [41]. Effectiveness of drug treatment was systematically assessed through whole mount *in situ* hybridization by checking the expression of known target genes of the considered pathway: *Gli1* or *Patched1* (*Ptc1*) for Hedgehog [12], *CyclinD1* for Wnt [10] and *HRT1* for Notch [42].

Expression constructs

pCS2-Flag-Hes4 (previously named *XHairy2*), *pCS2-Hes4-myc-GR* (inducible construct fused to the dexamethasone-responsive hormone-binding domain of the human glucocorticoid receptor (GR); referred as *Hes4-GR* in the text, [34]), *pCS2-Hes2* [43], *pCS2-Xgadd-45 γ* [44], *pCS2-GFP* (a gift from David Turner) and *pCS2-LacZ* (a gift from Nancy Papalopulu) were previously described. *pCS2-Hes4-myc-VP16-GR* encodes a Hes4 glucocorticoid-inducible antimorphic variant where the VP16 transactivation domain is fused to the carboxylterminus

of *Hes4*. It was generated by subcloning the *Hes4* ORF into a *pCS2-myc-VP16-GR* vector after PCR amplification. Details on the cloning procedure are available upon request.

Microinjections and *in vivo* DNA lipofection

Xenopus laevis *Hes4* gene exists as two alloalleles, *Hes4a* and *Hes4b*, and the later was used in all overexpression experiments. Capped sense RNAs were transcribed using the mMessage mMachin SP6 kit (Ambion). 500 pg of mRNAs were injected animally into one or two blastomeres at the two-cell stage, together with *GFP* or β -galactosidase mRNA (250 pg). Protein activity of GR chimeric constructs was induced by incubating the embryos in 4 μ g/mL dexamethasone (Sigma) from stage 12. Treating embryos before this stage lead to severe developmental defects and frequently to developmental arrest. Morpholino oligonucleotides against both alloalleles ("*Hes4* Mo"; [34]) were injected into one blastomere at the four- or eight-cell stage (8 to 20 ng). Lipofection experiments were performed at stage 17/18 as previously described [45].

***In situ* hybridization**

Digoxigenin-labelled antisense RNA probe synthesis and whole-mount *in situ* hybridization were performed as previously described [14]. Embryos were then vibratome sectioned (50 μ M). Following image capture, labelling area was manually delineated and quantified (in Pixel²) in both the dorsal and ventral CMZ using Adobe Photoshop CS4 software. Shown in graphs are percentage of staining area increase/decrease compared to the control.

BrdU/EdU incorporation and immunohistochemistry

Embryos were injected intra-abdominally with BrdU (10 mM; Sigma) or EdU (1 mM; Invitrogen) for various durations, depending on the experiment. For birthdating analyses, embryos were injected every 10-12 hours from stage 34 to stage 41. Immunohistochemistry was performed on 12 μ m-cryostat or -paraffin sections as previously described [12; 41].

1
2
3 Antibodies used are listed in Supporting Information Table 1. Cell nuclei were counterstained
4
5 with Hoechst (Sigma). Detection of EdU labelled cells was carried out with the Click-iT®
6
7 EdU Imaging Kit (Molecular Probes). Fluorescent staining was visualized with a M2 Zeiss
8
9 microscope. Images were captured using a digital AxioCam MRC camera and processed with
10
11 AxioVision REL 7.8 and Adobe Photoshop CS4 softwares. Retinal area was manually
12
13 delineated on transverse sections and quantified (in Pixel²) using Adobe Photoshop CS4
14
15 software.
16
17

18 19 **Analysis of cell-cycle parameters**

20
21 Growth fraction (GF; proportion of proliferative cells), total cell cycle length (T_C) and S-
22
23 phase length (T_S) were determined following EdU cumulative labelling using the Excel sheet
24
25 provided by Dr R. Nowakowski [46]. Mitotic index and percentages of EdU-labelled mitosis
26
27 were measured as previously described [12]. The time required for half-maximal appearance
28
29 of EdU labelling in the mitotic population was taken as an estimation of the average G2
30
31 length (T_{G2} ; [47]). M-phase duration (T_M) was calculated after determining the proportion of
32
33 cells that were in mitosis (%M), taking into account T_C and GF, as determined by cumulative
34
35 EdU labelling: $T_M = \%M * GF * T_C$. Finally, G1 duration (T_{G1}) was deduced from the above
36
37 values as $T_{G1} = T_C - (T_S + T_{G2} + T_M)$.
38
39
40
41
42

43 **Reverse transcription and quantitative real time PCR**

44
45 Reverse transcription of retinal mRNA and quantitative real time PCR (qPCR) were
46
47 performed as described previously [41]. PCR primer sequences are listed in Supporting
48
49 Information Table 2.
50
51

52 **Quantification and statistical analysis**

53
54
55 All experiments were performed at least in duplicate. Shown in figures are results from one
56
57 representative experiment. In each histogram, values are given as mean \pm s.e.m. In
58
59
60

1
2
3 experiments involving two conditions, statistical analysis was performed by Student's t-test,
4
5 while in those involving the comparison of more than 2 treatments one-way ANOVA
6
7 followed by Tukey's post hoc tests were performed (NS: not significant; *: $p < 0.05$, **: $p <$
8
9 0.01 ; ***: $p < 0.001$).

11 12 13 **Results**

14 15 16 ***Hes4* expression likely reveals the embryonic cell-of-origin of adult retinal stem cells**

17
18 The embryonic lineage that gives rise to adult retinal stem cells in *Xenopus* is
19
20 currently unknown. Gene expression profile within the CMZ has proved to mirror the
21
22 temporal genetic sequence of retinal development [3, 4, 48]. As *Hes4* labels the most
23
24 peripheral stem cell-containing part of the CMZ [14] and Fig. 1Q, 1R), we hypothesized that
25
26 establishing its expression profile during retinogenesis might retrospectively give clues about
27
28 RSC ontogenesis. We thus analyzed the distribution of its transcripts at key stages of eye
29
30 development and compared it with that of optic field (*Pax6*), neural retina (NR; *Rx*), optic
31
32 stalk (OS; *Pax2*) and retinal pigmented epithelium (RPE; *Mitf1A*) markers (Fig. 1 and
33
34 Supporting Information Fig. S1). At late neurula stage, *Hes4* expression was observed in a
35
36 restricted proximo-dorsal region of the optic field, clearly contrasting with that of *Pax6* (Fig.
37
38 1A, 1B). In line with this, analysis on retinal sections at the optic vesicle stage revealed that
39
40 *Hes4* stained the *Mitf1A*-expressing presumptive RPE and was not detected in the *Rx*-positive
41
42 retinal neuroepithelium, except in its most dorsal part at the border with the RPE (Fig. 1K,
43
44 1L). Of note, from stage 24-25, *Hes4* transcripts were additionally observed in the optic stalk
45
46 (coinciding with *Pax2* expression; Fig. 1L). During optic cup formation, *Hes4* expression
47
48 progressively declined in the differentiating central RPE while remaining high in its
49
50 peripheral part and in the NR margins (Fig. 1M-1O). Staining in the margin progressively
51
52 superimposed with the forming CMZ to finally get restricted to its most peripheral region
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 (Fig. 1P-1R). As a whole, *Hes4* expression delineates a territory clearly distinct from both the
4
5 differentiating NR and RPE that is first located in the dorsal part of the optic vesicle, then at
6
7 the peripheral margin of the optic cup, and that finally coincides with RSC location following
8
9 completion of embryonic retinogenesis. Importantly, such a dynamic expression pattern
10
11 strongly resembles that of *Gli3* and *Smo*, two previously described stem-cell specific markers
12
13 [49]. In addition, we found that the same held true for two other genes that we recently
14
15 identified as being expressed at the extreme tip of the CMZ, namely *Id2* and *Wnt8b*
16
17 (Supporting Information Fig. S2 and [41]). Altogether, these data thus suggest that adult
18
19 RSCs originate from a discrete population of cells located at the RPE/NR border of the optic
20
21 vesicle.
22
23

24 25 26 **Hes4 expression is positively regulated by Wnt signalling and negatively by the** 27 28 **Hedgehog pathway** 29

30
31 We then aimed at identifying the signalling pathways regulating *Hes4* embryonic
32
33 expression. A potential candidate is the canonical Wnt pathway since it proved to be active in
34
35 the peripheral retina of various species [10, 50, 51] and was shown to regulate CMZ
36
37 expression of *cHairy1*, the *Hes4* ortholog in chick [38]. However, the status of Wnt activity
38
39 during embryonic retinogenesis of *Xenopus* has never been investigated in details. Taking
40
41 advantage of a *Xenopus tropicalis* reporter line carrying a destabilized *eGFP* downstream a
42
43 synthetic Wnt-responsive promoter [40], we thus analyzed the profile of Wnt activity in the
44
45 developing retina. Except in the presumptive RPE and optic stalk of the optic vesicle where it
46
47 was not detected, *eGFP* staining strikingly superimposed with that of *Hes4* (Supporting
48
49 Information Fig. S3). Consistent with a role in promoting *Hes4* expression, we found that
50
51 pharmacological blockade of Wnt signalling from stage 25 to stage 35 (24-hour IWR-1
52
53 treatment) significantly lowered *Hes4* levels in the CMZ, as inferred from both *in situ*
54
55 hybridization and qPCR analyses (Fig. 2A, 2C, 2F). Unexpectedly, similar inhibition was
56
57
58
59
60

1
2
3 observed upon a 24-hour treatment with BIO, an activator of the Wnt pathway (Fig. 2A, 2C).
4
5 Shortening the treatment to 15 hours, however, led to a consistent increase of *Hes4* labelling
6
7 (Fig. 2B, 2C). As *Hes1* is known to repress its own expression [52], these results led us to
8
9 investigate whether this might also be the case for *Hes4*. In line with this, we found that
10
11 misexpression of the *Hes4* antimorphic variant *Hes4VP16-GR* (which transforms the *Hes4*
12
13 repressor into a transcriptional activator) led to ectopic *Hes4* staining in the epidermis of
14
15 injected embryos (Supporting Information Fig. S4A). Additionally, morpholino-mediated
16
17 *Hes4* knockdown significantly enhanced *Hes4* expression in its endogenous domain at the
18
19 neurula stage (Supporting Information Fig. S4B). As a whole, these results suggest that *Hes4*
20
21 levels in the forming CMZ are positively regulated by the Wnt pathway and modulated by a
22
23 negative feedback loop.
24
25
26

27
28 We next investigated the impact of Hedgehog signalling based on previous data in
29
30 mouse retinal explants showing that *Hes1* expression is stabilized by the Shh effector *Gli2*
31
32 [53]. As a first attempt to address this issue, we compared *Hes4* expression pattern during
33
34 retinogenesis with that of *Gli1* as a readout of Hedgehog signalling activity (Supporting
35
36 Information Fig. S3). As previously described [12, 49], *Gli1* transcripts were detected at high
37
38 levels in the presumptive RPE and optic stalk of stage 25 embryos and at low levels in the NR
39
40 and NR/RPE border. Strikingly, upon optic cup formation, *Gli1* and *Hes4* clearly exhibited
41
42 complementary expression patterns, with *Gli1* being mainly detectable in the differentiating
43
44 RPE and *Hes4* restricted to the peripheral margin of the retina. Finally, in the mature retina,
45
46 *Gli1* labelling was detected in the central CMZ and was faint in its most peripheral *Hes4*-
47
48 expressing part. These results suggest that in contrast to mouse *Hes1*, *Hes4* might be down-
49
50 regulated by Hedgehog signalling. In line with this, we found that Hedgehog pathway
51
52 inhibition with cyclopamine significantly enhanced *Hes4* expression in the CMZ (Fig. 2D-
53
54 2F). Conversely, Hedgehog activation with purmorphamine strongly reduced *Hes4* staining
55
56
57
58
59
60

1
2
3 (Fig. 2D, 2E). Altogether, it is likely that Hedgehog-mediated inhibition of *Hes4* contributes
4
5 to restrain its expression domain to the peripheral margin of the optic cup and to the stem cell
6
7 compartment of the CMZ.
8

9
10 Although *Hes* genes are recognized as canonical targets of Notch signalling, a growing
11
12 wealth of data indicates that they may function independently in several contexts, including
13
14 the retina [38, 53]. Considering the above data, we investigated whether this might be the case
15
16 for *Hes4* as well. We thus blocked the Notch pathway with DAPT, a chemical compound that
17
18 inhibits the γ -secretase-dependent release of the Notch intracellular domain and was shown to
19
20 repress *Hes1/5* expression in the chick retina [54]. Contrasting with the effects of Wnt and
21
22 Hedgehog signalling perturbations in the same time window, *Hes4* levels were not
23
24 significantly lowered by a 24-hour DAPT exposure (Supporting Information Fig. S5B, S5E,
25
26 S5F) and were only affected when treatment duration was extended to 48 hours (Supporting
27
28 Information Fig. S5D, S5E). Such a delay suggests that the Notch pathway does not directly
29
30 contribute to *Hes4* regulation in the forming CMZ.
31
32

33 34 35 ***Hes4* loss of function severely impairs eye formation**

36
37 We next aimed at addressing *Hes4* function during retinal development through a
38
39 knockdown experiment. Morphological analysis of stage 37 tadpoles injected with *Hes4*
40
41 Morpholinos (*Hes4* Mo) revealed severe dose-dependent eye defects ranging from a strong
42
43 reduction of eye size to a complete absence of eye (Fig. 3A). No discernable eye
44
45 malformations were observed upon injection of a standard Morpholino (Ctrl Mo; data not
46
47 shown). In order to exclude a potential toxicity of the *Hes4* Mo, we tested whether the eye-
48
49 absent morphant phenotype could be rescued upon co-injection of *Hes4* Mo with an inducible
50
51 *Hes4* construct (*Hes4-GR*) devoid of *Hes4* Mo target sequence. The percentage of eye-absent
52
53 embryos was scored in the different conditions and we found that it dropped from 78% in
54
55 *Hes4* Mo injected embryos to 12.5% in *Hes4* Mo plus *Hes4-GR* injected ones (Fig. 3B). Such
56
57
58
59
60

1
2
3 a rescue clearly suggests that the loss of eye is a specific phenotype of *Hes4* knockdown.
4
5 Consistent with this, severe eye defects were observed as well following overexpression in the
6
7 presumptive neurectoderm of the antimorphic *Hes4* variant *Hes4VP16-GR* (data not shown).
8
9

10 Since two previous studies in *Xenopus* reported increased apoptosis at neurula stages
11 following *Hes4* loss of function [33, 35], we wondered whether cell death might account as
12 well for the observed eye malformations. We thus performed anti-active caspase3
13 immunostaining on stage 25 retinal sections from *Hes4* Mo injected embryos. Massive
14 apoptosis was evident on the injected side (Fig. 3C). Thus, as previously proposed in neural
15 crest stem cells [33, 35], *Hes4* might be required for cell survival in the retina. Of note, cell
16 death was not restricted to *Hes4*-expressing tissues and spread in particular to the neural
17 retina, which might be a secondary consequence of the loss of surrounding tissues.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

28 ***Hes4* misexpression prevents RPE differentiation and neuronal commitment of retinal** 29 **precursor cells** 30 31

32 Since the dramatic phenotype of *Hes4* knockdown precludes any further functional
33 investigation, we turned to a gain of function strategy using the *Hes4-GR* inducible construct.
34 Morphological analysis at stage 37 revealed a defective RPE pigmentation (Fig. 3A) and a
35 slight reduction of retinal size in *Hes4-GR* injected embryos ($23\% \pm 2.5\%$ decrease of retinal
36 surface compared to controls, as measured on 19 and 37 sections respectively; $p < 0.001$).
37 Effects on retinal cell type differentiation were then monitored using specific markers (Fig.
38 4A). In line with the aforementioned defects in retinal pigmentation, *Hes4* overexpressing
39 retinas displayed a virtual absence of XAR-1 expression, a marker of the differentiated RPE.
40 In addition, substantial perturbations in laminar organization were observed in the central
41 retina (CR). In line with this, both rhodopsin (data not shown) and calbindin stainings were
42 severely reduced suggesting that rods and cones were profoundly missing. Syntaxin
43 expression was strongly decreased in the inner and outer plexiform layers as well as in the
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 optic nerve, consistent with defective interneuron and ganglion cell production. Thus, *Hes4*
4
5 misexpression drastically impairs both RPE and neuronal differentiation.
6

7
8 To get further insights into this phenotype, we checked the status of several markers at
9
10 earlier stages by *in situ* hybridization (Fig. 4B). We observed that *Rx* expression was not
11
12 affected suggesting that *Hes4*-overexpressing cells retain a retinal identity. However, *Mif1A*
13
14 staining was strongly reduced compared to controls, consistent with an impairment of RPE
15
16 determination. Besides, expression of the proneural genes *Neurog2*, *Atoh7* and *NeuroD4*
17
18 (previously called *XNgnr-1*, *Xath5* and *Xath3* respectively) was also decreased, suggesting
19
20 that *Hes4* inhibits neurogenesis by preventing commitment of precursor cells towards a
21
22 neuronal fate. Consistent with this, we found that the antimorphic *Hes4* variant *Hes4VP16-*
23
24 *GR* was able to induce ectopic neurogenesis, as inferred by *N-tubulin* staining following
25
26 mRNA injection in the presumptive epidermis (Supporting Information Fig. S4A).
27
28

29
30 We next followed the fate of *Hes4*-overexpressing cells in a clonal analysis using *in*
31
32 *vivo* lipofection. At stage 39, most cells in control clones were already differentiated into
33
34 neurons as judged by their position and morphology. In contrast, an important proportion of
35
36 *Hes4*-overexpressing cells still exhibited a neuroepithelial (NE) morphology characteristic of
37
38 undifferentiated neural precursors (Fig. 4C, 4D). Analysis at stage 41 revealed that this
39
40 delayed differentiation eventually ended up with an excessive production of Müller glial cells
41
42 at the expense of neurons (Fig. 4C, 4D). In addition to their typical morphology, Müller cell
43
44 identity was further confirmed by immunostaining using an anti-CRALBP antibody (data not
45
46 shown). These data indicate that *Hes4* overexpression cell autonomously delays
47
48 differentiation and reduces neurogenesis.
49
50

51
52 As a whole, these results suggest that *Hes4* maintain cells of the retinal margin in an
53
54 undifferentiated state during embryonic retinogenesis.
55
56
57
58
59
60

***Hes4* misexpression maintains retinal precursors in a proliferative state**

We next examined whether *Hes4*-dependent blockade of differentiation was accompanied by prolonged proliferative capacities. We first analyzed BrdU incorporation at stage 37 following *Hes4-GR* mRNA injection. At this point of retinal histogenesis, the majority of cells in the wild-type retina are post-mitotic and proliferation is restricted to the CMZ. In contrast, a dramatic increase in BrdU-positive cell number was observed in the central retina of *Hes4*-overexpressing embryos (Fig. 5A, 5B).

We next assayed in lipofection experiments whether these effects on proliferation were cell autonomous (Supporting Information Fig. S6). To challenge the specificity of the *Hes4* phenotype, transfection of another *Hes* family member, *Hes2*, was performed in a parallel batch of embryos. In contrast to *Hes4*, *Hes2* is not expressed in stem cells but restricted to retinal progenitors where it acts as a gliogenic factor. We previously showed that it does so at least in part by delaying cell cycle exit of late precursor cells, while having no effect on early progenitor cell proliferation [43]. In line with this, we found that *Hes2* overexpression increased the percentage of BrdU-positive cells among transfected cells at stage 35 but not at stage 32. In contrast, proliferation rates of *Hes4*-misexpressing cells were elevated at both stages with respect to the control situation (Supporting Information Fig. S6). This suggests that both early and late retinal precursors are maintained longer in the cell cycle upon *Hes4*-overexpression.

To examine the timing of cell cycle exit more directly, we performed birthdating experiments (Fig. 5C). BrdU was injected at regular intervals so that it would be constantly available from stage 34 to stage 41, and therefore mark all cells born in that period. We found that the proportion of BrdU-labelled cells among transfected cells was significantly increased following *Hes4* transfection, compared to the control situation (Fig. 5D). This clearly indicates that *Hes4* delays cell cycle withdrawal of precursor cells.

1
2
3 Finally, we wondered whether such prolonged proliferation might account for the
4
5 aforementioned imbalance between neuronal and glial cell production (Fig. 4D). We
6
7 addressed this issue by counteracting *Hes4*-dependent maintenance in the cell cycle through
8
9 co-lipofection with *Xgadd-45 γ* . This cell cycle inhibitor was previously shown to accelerate
10
11 retinal cell birthdate in similar assays [44]. We found that *Xgadd-45 γ* indeed concomitantly
12
13 rescued the *Hes4*-induced delayed cell cycle exit and the deficit in neuronal cells (Supporting
14
15 Information Fig. S7), strongly suggesting a tight coupling between differentiation and
16
17 proliferation defects.
18
19

20 21 ***Hes4* misexpression slows down cell cycle kinetics of retinal precursor cells**

22
23 As stated above, *Hes4* misexpression leads to a reduction of retinal size, an apparently
24
25 contradictory phenotype in view of the delayed cell cycle withdrawal of retinal precursor
26
27 cells. As no increase in apoptosis could be detected following *Hes4-GR* mRNA injection (data
28
29 not shown), we thus wondered whether this paradox might be explained by slower cell cycle
30
31 kinetics of *Hes4*-overexpressing progenitors compared to controls.
32
33

34
35 To address this possibility, we first evaluated the mitotic index in the retinal
36
37 neuroepithelium of stage 25 embryos, using the mitotic marker phospho-Histone H3 (P-H3;
38
39 [12]). P-H3 positive cell proportion was calculated among all nuclei and further corrected by
40
41 the growth fraction (GF; percentage of proliferative cells) as determined by EdU cumulative
42
43 labelling experiments (see below; Fig 6B and Supporting Information Table 3). We found a
44
45 significantly lower mitotic index in *Hes4-GR* injected optic vesicles compared to the control
46
47 (Fig. 6A), suggesting that *Hes4* overexpression slows down cell cycle speed of retinal
48
49 precursors.
50
51

52
53 We next aimed at directly measuring total cell cycle (T_C) and S-phase (T_S) lengths in
54
55 the neural retina through a cumulative EdU labelling assay. As shown in Fig. 6B and
56
57 Supporting Information Table 3, the duration of G2 + M + G1 ($T_C - T_S$), as inferred from the
58
59
60

1
2
3 time point at which the EdU labelling index reached the plateau, was longer in *Hes4*-
4
5 misexpressing cells compared to wild-type ones. Calculation of T_S and T_C using the
6
7 Nowakowski excel sheet [46] confirmed the hypothesis of extended cell cycle duration
8
9 following *Hes4-GR* overexpression (+39% compared to the control situation; 14.73 *versus*
10
11 10.62 hrs) and showed a slight increase of S-phase length (+13%; 7.94 *versus* 7.00 hrs;
12
13 Supporting Information Table 3).
14
15

16
17 Finally, in order to determine whether a specific phase of the cell cycle was
18
19 particularly affected, we individually estimated G2 (T_{G2}), M (T_M) and G1 (T_{G1}) durations. G2
20
21 length was evaluated using the percentage of labelled mitoses (PLM) paradigm [12].
22
23 Noticeably, the PLM was consistently lower in *Hes4-GR*-overexpressing retinas compared to
24
25 control ones, indicating a delayed S- to M-phase progression (Fig. 6C, 6D). Mean T_{G2} was
26
27 estimated at 1.6 hours and 1.2 hours respectively (+33%; Fig. 6D and Supporting Information
28
29 Table 3). Taking into account data gathered from the measurement of the mitotic index shown
30
31 previously (Fig. 6A), we next determined T_M (see materials and methods for calculation
32
33 details) and finally deduced T_{G1} as being equal to $T_C - (T_S + T_{G2} + T_M)$. This revealed that
34
35 increased time spent in G1 is the main parameter that accounts for the longer cell cycle
36
37 observed upon *Hes4* overexpression (+148%; 4.94 *versus* 1.99 hrs), S and G2 phases being
38
39 lengthened as well although to a lesser extent (Supporting Information Table 3).
40
41
42

43
44 The above data suggest that *Hes4* transcription factor acts as a regulator of cell cycle
45
46 speed. In line with this, the stem cell compartment of the CMZ where *Hes4* is expressed was
47
48 recently shown to exhibit slow cell cycle kinetics [6]. As stated above, *Hes4* expression at the
49
50 NR/RPE border of the optic vesicle likely prefigures the subpopulation of cells dedicated to
51
52 form the adult retinal stem cell cohort. We thus wondered whether cells in this territory might
53
54 be endowed with slow cell cycle kinetics as well. To address this issue, we performed EdU
55
56 cumulative labelling in stage 22-24 wild type embryos and analyzed EdU incorporation in
57
58
59
60

1
2
3 two distinct territories: the *Hes4*-negative NR and the *Hes4*-expressing NR/RPE border (Fig.
4
5 6E). Calculations of T_S and T_C at the NR/RPE border yielded values of 13.57 and 20.26 hours
6
7 compared to 7.47 and 11.47 hours in the NR (Fig. 6F, Supporting Information Table 3).
8

9
10 Altogether these results strongly suggest that *Hes4* contributes to the maintenance of
11
12 slow cell cycle kinetics at the NR/RPE border.
13

14 15 **Discussion**

16 17 **New insights into the embryonic cell-of-origin of adult *Xenopus* RSCs**

18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Elegant tracing experiments recently allowed to identify the offspring of a single CMZ stem cell during fish postnatal life [5]. However, the embryonic lineage of adult RSCs has never been investigated so far. Our retrospective analysis of *Hes4* expression pattern suggests that these cells originate from the RPE/NR border of the optic vesicle. This hypothesis is substantiated by our finding that other stem cell specific markers of the post-embryonic CMZ display similar expression dynamic during retinogenesis: first labelling the presumptive RPE at optic vesicle stage, then the retinal margin of the optic cup and finally the most peripheral stem-cell containing part of the CMZ in the mature retina. Importantly, it also fits with recent results from four dimensional manual cell tracking in zebrafish, suggesting that part of the optic vesicle medial layer (classically considered as prospective RPE) contributes to the CMZ [55]. Finally, such an early restricted expression of RSC markers challenges the classical schematic representation of retinal histogenesis, which implies that RSCs are initially found throughout the NR of the newly emerged optic vesicle and thereafter persist in its periphery as central cells differentiate. It rather suggests that a presumptive RSC cohort is already segregated from both the NR and RPE lineages as early as the optic vesicle stage (Fig. 7A).

Hes4 maintains presumptive RSCs in a proliferative and undifferentiated state

Our gain of function analysis revealed that *Hes4* misexpression prevents retinal precursors from committing towards retinal fates. Of note, *Hes4* ability to block neurogenesis is a function shared by many other *Hes* family members that are known to transcriptionally repress or functionally antagonize several proneural factors [24]. In particular, *cHairy1* has proved to be required to prevent CMZ cells from differentiating into neurons and to be sufficient to endow progenitor cells of the central retina with CMZ-like cell properties [38]. We found here that the role of *Hes4* during *Xenopus* retinal development may also extend to an inhibition of the RPE differentiation program. Besides, our results indicate that the *Hes4*-dependent blockade of neuronal and RPE determination is accompanied by maintenance in a proliferative state. Whether the former effect is a consequence of the latter or vice versa remains to be determined. However, both appear tightly coupled since *Hes4*-induced defective neurogenesis, as observed in lipofection experiments, can be rescued by forcing cells to exit the cell cycle. We thus conclude that the *Hes4* phenotype observed in our overexpression experiments reflects a function dedicated to maintain presumptive adult RSCs in an undifferentiated and proliferative state towards adulthood.

Hes4 regulates cell cycle kinetics

Our study highlights that *Hes4* might also constitute a crucial regulator of cell cycle kinetics. Cell cycle speed is known to vary during the time course of vertebrate retinogenesis [44, 56, 57], a phenomenon that has been associated with the transition from proliferative to neurogenic divisions in other parts of the central nervous system [58]. However, comparative analysis of proliferation kinetics between different retinal compartments at a given stage has not been performed so far. We found in the present study that *Hes4*-expressing cells at the NR/RPE border of the optic vesicle exhibit a much longer cell cycle compared to NR precursors. This likely constitutes a hallmark of neural stem cells as observed in adult RSCs

1
2
3 of the CMZ ([6] and our own unpublished data). How cell cycle speed is modulated in these
4
5 cells is poorly documented. We here demonstrated that *Hes4* prolongs cell cycle duration,
6
7 mainly through a lengthening of G1 phase. In line with this result, sustained overexpression of
8
9 *Hes1* in brain neural progenitors was previously shown to down-regulate expression of cell
10
11 cycle regulators such as *CyclinD1* and *CyclinE2* and to cause G1 phase retardation [26]. Our
12
13 data thus strongly support the hypothesis that *Hes4* regulates some aspects of RSC
14
15 homeostasis through the maintenance of slow cell cycle kinetics.
16
17

18 19 ***Hes4* is tightly regulated by multiple inputs**

20
21 We recently discovered that opposed and counterbalancing functions of Wnt and
22
23 Hedgehog signalling modulate neural stem/progenitor cell proliferation in the post-embryonic
24
25 CMZ and that the two pathways reciprocally regulate each other's activity [41]. In line with
26
27 this model we found that the two pathways exhibit opposite effects on *Hes4* expression in the
28
29 forming CMZ.
30
31

32
33 The *Hes4*-dependent maintenance in the cell cycle associated with slow cell cycle
34
35 kinetics is highly reminiscent of the phenotype resulting from Hedgehog signalling blockade
36
37 in the retina [12]. Consistent with this, but in sharp contrast with *Hes1* regulation in the
38
39 mouse retina [53], we found that the Hedgehog pathway negatively impacts on *Hes4*
40
41 expression in the forming CMZ. In line with our previously proposed model [12, 59], it would
42
43 thus be interesting to investigate whether Hedgehog-driven down-regulation of *Hes4* is
44
45 required for the transition from a slow cycling RSC phenotype to a fast cycling progenitor
46
47 state (Fig. 7B).
48
49

50
51 Our results also highlight that the canonical Wnt pathway (i) is active in the
52
53 presumptive RSC subpopulation and (ii) positively modulates *Hes4* levels in the forming
54
55 CMZ. These results suggest that Wnt signalling may function upstream *Hes4* in the
56
57 maintenance of RSCs in a proliferative and undifferentiated state during retinogenesis (Fig.
58
59
60

1
2
3 7B). This hypothesis is substantiated by the fact that the Wnt pathway is required for
4 proliferation in the post-embryonic *Xenopus* CMZ [10] and that Wnt-dependent prevention of
5 chick CMZ cell differentiation is mediated by cHairy1 [38]. A positive link between the Wnt
6 receptors frizzled 5/8 and *Hes1* gene has also recently been observed in the context of cell
7 proliferation in the mouse neuroretina [60]. Besides, activation of the Wnt pathway through
8 overexpression of stabilized β -catenin in mouse [61] or in the zebrafish *apc* mutant [62]
9 results in lower proliferation rates in the peripheral retina. It is therefore tempting to speculate
10 that Wnt signalling might control as well *Hes4*-driven slow cell cycle speed of neural stem
11 cells in the *Xenopus* retina.
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 In addition to these opposite influences of Wnt and Hedgehog signalling, we found
24 that *Hes4* is able to repress its own transcription. Such a negative feedback loop has
25 previously been reported for *Hes1* and is known to contribute to oscillations of its expression
26 in brain neural precursors [26, 63]. However, *Hes4*-expressing cells in the retina exhibit
27 features that are strikingly reminiscent of boundary cell properties (constitutive repression of
28 proneural genes and reduced proliferation rates). In these boundary cells *Hes1*, like other *Hes*-
29 related genes, does not oscillate and is rather persistently expressed at high levels [20, 27].
30 This sustained up-regulation is due to the action of Id factors that prevent *Hes1* from binding
31 to its own promoter [64]. As shown here, *Id2* and *Hes4* exhibit a similar expression pattern in
32 the developing retina. It would thus be interesting to determine whether a similar interaction
33 leading to sustained *Hes4* expression might be at work in RSCs.
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

49 Conclusion

50
51 Altogether, our study opens new avenue onto the cell-of origin of adult RSCs and the
52 involvement of the transcriptional repressor *Hes4* in their maintenance during embryonic
53 development. Our results indeed suggest that *Hes4* expression at the NR/RPE border of the
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 optic vesicle foreshadows the adult RSC pool of the CMZ. Besides, our functional analysis
4
5 converges towards a model whereby *Hes4* acts as a safeguard of neural stemness features in
6
7 this cell subpopulation by preventing its differentiation and maintaining it in a slowly
8
9 proliferative state.
10

11 12 13 14 15 **Acknowledgements**

16
17
18 We thank Eric Bellefroid and Massimo Nichane for providing the *Hes4* expressing constructs
19
20 and Federico Cremisi for the *pCS2-Xgadd-45γ* plasmid. We are very grateful to Pr. Richard
21
22 Nowakowski for providing the Excel sheet and for helpful discussions on EdU cumulative
23
24 labelling. We thank S. Ohnuma and L. Bally-Cuif for critical reading of the manuscript and
25
26 Gloria Luque for statistical advises. We are also grateful to C. de Meideros for animal care.
27
28 W.E.Y. was granted by MNERT and Retina France. C.B. is an ANR and Region Ile de France
29
30 fellow (DIM Stem Pole). This research was supported by grants to M.P. from the ANR (06-
31
32 JCJC-0108-01 and 056054), CNRS, Univ. Paris-Sud, Retina France, ARC (1108), IFR144.
33
34
35
36
37

38 39 40 **Disclosure of potential conflicts of interest**

41
42 The authors indicate no potential conflicts of interest.
43

44 45 46 **References**

- 47 1 Yoshii C, Ueda Y, Okamoto M, et al. Neural retinal regeneration in the anuran amphibian
48
49 *Xenopus laevis* post-metamorphosis: transdifferentiation of retinal pigmented epithelium
50
51 regenerates the neural retina. *Dev Biol.* 2007;303:45-56.
52
- 53 2 Wetts R, Serbedzija GN, Fraser SE. Cell lineage analysis reveals multipotent precursors in
54
55 the ciliary margin of the frog retina. *Dev Biol.* 1989;136:254-263.
56
57
58
59
60

- 3 Casarosa S, Leone P, Cannata S, et al. Genetic analysis of metamorphic and premetamorphic *Xenopus* ciliary marginal zone. *Dev Dyn*. 2005;233:646-651.
- 4 Perron M, Kanekar S, Vetter ML, et al. The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the *Xenopus* eye. *Dev Biol*. 1998;199:185-200.
- 5 Centanin L, Hoeckendorf B, Wittbrodt J. Fate restriction and multipotency in retinal stem cells. *Cell Stem Cell*. 2011;9:553-562.
- 6 Xue X, Harris W. Using myc genes to search for stem cells in the ciliary margin of the *Xenopus* Retina. *Dev Neurobiol*. 2011;DOI: 10.1002/dneu.20887.
- 7 Locker M, Borday C, Perron M. Stemness or not stemness? Current status and perspectives of adult retinal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2009;4:118-130.
8. Raymond PA, Barthel LK, Bernardos RL, et al. Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC Dev Biol*. 2006;6:36.
- 9 Cerveny KL, Cavodeassi F, Turner KJ, et al. The zebrafish flotte lotte mutant reveals that the local retinal environment promotes the differentiation of proliferating precursors emerging from their stem cell niche. *Development*. 2010;137:2107-2115.
- 10 Denayer T, Locker M, Borday C, et al. Canonical Wnt signaling controls proliferation of retinal stem/progenitor cells in postembryonic *Xenopus* eyes. *Stem Cells*. 2008;26:2063-2074.
- 11 Kubo F, Takeichi M, Nakagawa S. Wnt2b controls retinal cell differentiation at the ciliary marginal zone. *Development*. 2003;130:587-598.
- 12 Locker M, Agathocleous M, Amato MA, et al. Hedgehog signaling and the retina: insights into the mechanisms controlling the proliferative properties of neural precursors. *Genes Dev*. 2006;20:3036-3048.
- 13 Moshiri A, McGuire CR, Reh TA. Sonic hedgehog regulates proliferation of the retinal ciliary marginal zone in posthatch chicks. *Dev Dyn*. 2005;233:66-75.

- 1
2
3 14 Parain K, Mazurier N, Bronchain O, et al. A large scale screen for neural stem cell markers
4
5 in *Xenopus* retina. *Dev Neurobiol.* 2011;DOI: 10.1002/dneu.20973.
6
7 15 Wehman AM, Staub W, Meyers JR, et al. Genetic dissection of the zebrafish retinal stem-
8
9 cell compartment. *Dev Biol.* 2005;281:53-65.
10
11 16 Cervený KL, Varga M, Wilson SW. Continued growth and circuit building in the
12
13 anamniote visual system. *Dev Neurobiol.* 2011.
14
15 17 Locker M, El Yakoubi W, Mazurier N, et al. A decade of mammalian retinal stem cell
16
17 research. *Arch Ital Biol.* 2010;148:59-72.
18
19 18 Davis RL, Turner DL. Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins:
20
21 transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning.
22
23 *Oncogene.* 2001;20:8342-8357.
24
25 19 Kageyama R, Ohtsuka T, Kobayashi T. The Hes gene family: repressors and oscillators
26
27 that orchestrate embryogenesis. *Development.* 2007;134:1243-1251.
28
29 20 Baek JH, Hatakeyama J, Sakamoto S, et al. Persistent and high levels of Hes1 expression
30
31 regulate boundary formation in the developing central nervous system. *Development.*
32
33 2006;133:2467-2476.
34
35 21 Bonev B, Pisco A, Papalopulu N. MicroRNA-9 reveals regional diversity of neural
36
37 progenitors along the anterior-posterior axis. *Dev Cell.* 2011;20:19-32.
38
39 22 Hatakeyama J, Bessho Y, Katoh K, et al. Hes genes regulate size, shape and histogenesis
40
41 of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation.
42
43 *Development.* 2004;131:5539-5550.
44
45 23 Ishibashi M, Moriyoshi K, Sasai Y, et al. Persistent expression of helix-loop-helix factor
46
47 HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system. *EMBO J.*
48
49 1994;13:1799-1805.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 24 Kageyama R, Ohtsuka T, Kobayashi T. Roles of Hes genes in neural development. *Dev*
4
5 Growth Differ. 2008;50 Suppl 1:S97-103.
6
7 25 Ohtsuka T, Sakamoto M, Guillemot F, et al. Roles of the basic helix-loop-helix genes Hes1
8
9 and Hes5 in expansion of neural stem cells of the developing brain. *J Biol Chem.*
10
11 2001;276:30467-30474.
12
13 26 Shimojo H, Ohtsuka T, Kageyama R. Oscillations in notch signaling regulate maintenance
14
15 of neural progenitors. *Neuron.* 2008;58:52-64.
16
17 27 Stigloher C, Chapouton P, Adolf B, et al. Identification of neural progenitor pools by
18
19 E(Spl) factors in the embryonic and adult brain. *Brain Res Bull.* 2008;75:266-273.
20
21 28 Lee HY, Wroblewski E, Philips GT, et al. Multiple requirements for Hes1 during early eye
22
23 formation. *Dev Biol.* 2005;284:464-478.
24
25 29 Takatsuka K, Hatakeyama J, Bessho Y, et al. Roles of the bHLH gene Hes1 in retinal
26
27 morphogenesis. *Brain Res.* 2004;1004:148-155.
28
29 30 Tomita K, Ishibashi M, Nakahara K, et al. Mammalian hairy and Enhancer of split
30
31 homolog 1 regulates differentiation of retinal neurons and is essential for eye
32
33 morphogenesis. *Neuron.* 1996;16:723-734.
34
35 31 Sang L, Coller HA. Fear of commitment: Hes1 protects quiescent fibroblasts from
36
37 irreversible cellular fates. *Cell Cycle.* 2009;8:2161-2167.
38
39 32 Sang L, Coller HA, Roberts JM. Control of the reversibility of cellular quiescence by the
40
41 transcriptional repressor HES1. *Science.* 2008;321:1095-1100.
42
43 33 Nagatomo K, Hashimoto C. *Xenopus* hairy2 functions in neural crest formation by
44
45 maintaining cells in a mitotic and undifferentiated state. *Dev Dyn.* 2007;236:1475-1483.
46
47 34 Nichane M, de Croze N, Ren X, et al. Hairy2-Id3 interactions play an essential role in
48
49 *Xenopus* neural crest progenitor specification. *Dev Biol.* 2008;322:355-367.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 35 Nichane M, Ren X, Souopgui J, et al. Hairy2 functions through both DNA-binding and
4 non DNA-binding mechanisms at the neural plate border in *Xenopus*. *Dev Biol*.
5 2008;322:368-380.
6
7
8
9 36 Radosevic M, Robert-Moreno A, Coolen M, et al. Her9 represses neurogenic fate
10 downstream of *Tbx1* and retinoic acid signaling in the inner ear. *Development*.
11 2011;138:397-408.
12
13
14
15 37 Jouve C, Palmeirim I, Henrique D, et al. Notch signalling is required for cyclic expression
16 of the hairy-like gene *HES1* in the presomitic mesoderm. *Development*. 2000;127:1421-
17 1429.
18
19
20
21
22 38 Kubo F, Nakagawa S. Hairy1 acts as a node downstream of Wnt signaling to maintain
23 retinal stem cell-like progenitor cells in the chick ciliary marginal zone. *Development*.
24 2009;136:1823-1833.
25
26
27
28
29 39 Matter-Sadzinski L, Puzianowska-Kuznicka M, Hernandez J, et al. A bHLH transcriptional
30 network regulating the specification of retinal ganglion cells. *Development*.
31 2005;132:3907-3921.
32
33
34
35 40 Tran HT, Sekkali B, Van Imschoot G, et al. Wnt/beta-catenin signaling is involved in the
36 induction and maintenance of primitive hematopoiesis in the vertebrate embryo. *Proc Natl*
37 *Acad Sci U S A*. 2010;107:16160-16165.
38
39
40
41 41 Borday C, Cabochette P, Parain K, et al. Antagonistic cross-regulation between Wnt and
42 Hedgehog signalling pathways controls post-embryonic retinal proliferation. *Development*.
43 2012; In press.
44
45
46
47
48 42 Taelman V, Van Campenhout C, Solter M, et al. The Notch-effector *HRT1* gene plays a
49 role in glomerular development and patterning of the *Xenopus* pronephros anlagen.
50 *Development*. 2006;133:2961-2971.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 43 Solter M, Locker M, Boy S, et al. Characterization and function of the bHLH-O protein
4
5 XHes2: insight into the mechanisms controlling retinal cell fate decision. *Development*.
6
7 2006;133:4097-4108.
8
- 9
10 44 Decembrini S, Andrezzaoli M, Vignali R, et al. Timing the generation of distinct retinal
11
12 cells by homeobox proteins. *PLoS Biol*. 2006;4:e272.
13
- 14 45 Ohnuma S, Mann F, Boy S, et al. Lipofection strategy for the study of *Xenopus* retinal
15
16 development. *Methods*. 2002;28:411-419.
17
- 18 46 Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW. Bromodeoxyuridine immunohistochemical
19
20 determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an
21
22 anatomically defined population. *J Neurocytol*. 1989;18:311-318.
23
- 24 47 Arai Y, Pulvers JN, Haffner C, et al. Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on
25
26 commitment to neuron production. *Nat Commun*. 2011;2:154.
27
- 28 48 Ohnuma S, Hopper S, Wang KC, et al. Co-ordinating retinal histogenesis: early cell cycle
29
30 exit enhances early cell fate determination in the *Xenopus* retina. *Development*.
31
32 2002;129:2435-2446.
33
- 34 49 Perron M, Boy S, Amato MA, et al. A novel function for Hedgehog signalling in retinal
35
36 pigment epithelium differentiation. *Development*. 2003;130:1565-1577.
37
- 38 50 Kubo F, Nakagawa S. Wnt signaling in retinal stem cells and regeneration. *Dev Growth*
39
40 *Differ*. 2008;50:245-251.
41
- 42 51. Van Raay TJ, Vetter ML. Wnt/frizzled signaling during vertebrate retinal
43
44 development. *Dev Neurosci*. 2004;26:352-358.
45
- 46 52 Hirata H, Yoshiura S, Ohtsuka T, et al. Oscillatory expression of the bHLH factor *Hes1*
47
48 regulated by a negative feedback loop. *Science*. 2002;298:840-843.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 53 Wall DS, Mears AJ, McNeill B, et al. Progenitor cell proliferation in the retina is
4
5 dependent on Notch-independent Sonic hedgehog/Hes1 activity. *J Cell Biol.*
6
7 2009;184:101-112.
8
9
10 54 Nelson BR, Gumuscu B, Hartman BH, et al. Notch activity is downregulated just prior to
11
12 retinal ganglion cell differentiation. *Dev Neurosci.* 2006;28:128-141.
13
14 55 Kwan KM, Otsuna H, Kidokoro H, et al. A complex choreography of cell movements
15
16 shapes the vertebrate eye. *Development.* 2012;139:359-372.
17
18 56 Alexiades MR, Cepko C. Quantitative analysis of proliferation and cell cycle length during
19
20 development of the rat retina. *Dev Dyn.* 1996;205:293-307.
21
22 57 Morris VB, Cowan R. An analysis of the growth of the retinal cell population in embryonic
23
24 chicks yielding proliferative ratios, numbers of proliferative and non-proliferative cells and
25
26 cell-cycle times for successive generations of cell cycles. *Cell Prolif.* 1995;28:373-391.
27
28 58 Gotz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.*
29
30 2005;6:777-788.
31
32 59 Agathocleous M, Locker M, Harris WA, et al. A general role of hedgehog in the regulation
33
34 of proliferation. *Cell Cycle.* 2007;6:156-159.
35
36 60 Liu C, Bakeri H, Li T, et al. Regulation of retinal progenitor expansion by Frizzled
37
38 receptors: implications for microphthalmia and retinal coloboma. *Hum Mol Genet.* 2012.
39
40 61 Liu H, Xu S, Wang Y, et al. Ciliary margin transdifferentiation from neural retina is
41
42 controlled by canonical Wnt signaling. *Dev Biol.* 2007;308:54-67.
43
44 62 Stephens WZ, Senecal M, Nguyen M, et al. Loss of adenomatous polyposis coli (*apc*)
45
46 results in an expanded ciliary marginal zone in the zebrafish eye. *Dev Dyn.*
47
48 2010;239:2066-2077.
49
50 63 Kageyama R, Ohtsuka T, Shimojo H, et al. Dynamic Notch signaling in neural progenitor
51
52 cells and a revised view of lateral inhibition. *Nat Neurosci.* 2008;11:1247-1251.
53
54
55
56
57
58
59
60

64 Bai G, Sheng N, Xie Z, et al. Id sustains Hes1 expression to inhibit precocious neurogenesis by releasing negative autoregulation of Hes1. *Dev Cell*. 2007;13:283-297.

65 Tsuji S, Cho KW, Hashimoto C. Expression pattern of a basic helix-loop-helix transcription factor Xhairy2b during *Xenopus laevis* development. *Dev Genes Evol*. 2003;213:407-411.

Legends

Figure 1. *Hes4* expression during retinogenesis.

Comparative *in situ* hybridization analysis of *Hes4* expression profile with that of *Pax6*, *Rx*, *Mitf1A* and *Pax2*. White arrow in L point to the OS. Black arrows in K-M indicate the RPE/NR border (K, L) and the retinal margin (M). (Q) corresponds to a magnification of the CMZ delineated in (R). White and red arrows respectively indicate stem cell and progenitor zones of the CMZ. L: lens. Scale Bars: 300 μ m (A, B) or 50 μ m (C-R).

Figure 2. Wnt and Hedgehog signalling affect *Hes4* expression in an opposite manner.

(A-E) *In situ* hybridization analysis of *Hes4* expression on retinal sections, following a 24-hour (from stage 25 to stage 35; A, C-E) or a 15-hour (from stage 25 to stage 32; B, C) treatment with the indicated drug. Shown beneath each retinal section is a higher magnification of the dorsal CMZ delineated with dotted lines. (C, E) Quantification of *Hes4* staining area in the dorsal CMZ in each condition. N: number of analyzed sections. (F) qPCR analysis of retinal *Hes4* expression at stage 35 following 24 hours of Hedgehog or Wnt signalling inhibition. *Ptc1* and *CyclinD1* serve as controls of drug efficiency. Cyclo: cyclopamine; Purm: purmorphamine. Scale bar: 50 μ m.

Figure 3. *Hes4* is required for proper eye formation.

(A, B) Analysis of *Hes4* loss of function. *Hes4* or Ctrl Mo were injected at the indicated dose with or without *Hes4-GR* mRNA. (A) Typical pictures of stage 37 injected embryos (lateral view of the head). Note that embryos injected with *Hes4-GR* mRNA alone exhibit a defective RPE pigmentation and a slightly smaller eye. (B) Quantification of morphant and rescued embryos exhibiting the indicated phenotypes. (C) Transverse sections of a stage 25 morphant embryo (injected with 8 ng *Hes4* Mo) immunostained with anti-active caspase3 and anti-GFP (to visualize the injected side). Inj: injected side; Uninj: uninjected side; NT: neural tube; R: retina. Scale Bars: 300 μ m (A) or 100 μ m (C).

Figure 4. *Hes4* misexpression inhibits neuronal and RPE differentiation.

(A) Immunofluorescence analysis of cell-type specific marker expression in stage 37 retinas, following *Hes4-GR* mRNA injection. Arrows point to the staining in the RPE (Xar-1), photoreceptors (calbindin) or interneuron and ganglion cell fibers (syntaxin). The optic nerve is shown in insets. (B) *In situ* hybridization analysis with the indicated probe in stage 25 retinas, following *Hes4-GR* mRNA injection. (C, D) Analysis of cell type distribution in stage 39 or 41 retinas, following *Hes4* lipofection. (C) Typical sections of retinas transfected with *GFP* alone (control) or *GFP* plus *Hes4*. Arrows indicate neuroepithelial cells at stage 39 or Müller glial cells at stage 41. Respective morphologies of these cells are illustrated on the schematics below. (D) Quantification of neuroepithelial cells, neurons and glia among transfected cells at stage 39 or 41. GCL: ganglion cell layer; INL/ONL: inner/outer nuclear layer; NE: neuroepithelial cell. Scale Bars: 50 μ m (A, B) or 25 μ m (C).

Figure 5. *Hes4* overexpression delays cell cycle exit.

(A, B) BrdU incorporation assay (3-hour pulse) at stage 37, following *Hes4-GR* mRNA injection. (A) Typical retinal sections immunostained with anti-BrdU. (B) Corresponding

1
2
3 quantification. (C, D) Birthdating experiments in *Hes4* lipofected retinas. (C) Typical retinal
4
5 section immunostained for both GFP and BrdU, following continuous BrdU exposure from
6
7 stage 34 to 41. (D) Percentage of BrdU⁺ cells among transfected cells. Scale Bar: 50 μm.
8
9

10
11 **Figure 6. *Hes4* overexpression slows down cell cycle speed of retinal precursors.**

12
13 (A) Quantification of the mitotic index in the retinal neuroepithelium at stage 25, following
14
15 *Hes4-GR* mRNA injection. (B) Evaluation of the EdU labelling index in the NR of control
16
17 and *Hes4-GR* injected embryos, after cumulative EdU labelling starting from stage 25. (C, D)
18
19 G2 length evaluation *in vivo*, following *Hes4-GR* mRNA injection. (C) Typical retinal section
20
21 (stage 25) stained for both P-H3 and EdU, following a 1.5-hour EdU pulse. Dotted lines
22
23 delineate the NR. White and yellow arrows point to P-H3⁺/EdU⁻ and to P-H3⁺/EdU⁺ cells,
24
25 respectively. (D) Proportion of EdU-labelled mitosis along with increasing EdU exposure
26
27 times. (E, F) Proportion of EdU-labelled nuclei after cumulative EdU labelling, starting from
28
29 stage 22. EdU detection was performed following *in situ* hybridization with a *Hes4* probe.
30
31 Shown in E are typical retinal sections stained for both *Hes4* and EdU, following a 1-hour
32
33 EdU pulse. Labelling index was measured in the *Hes4*-expressing NR/RPE border (delineated
34
35 by white dotted lines in E) or in the *Hes4*-negative neural retina (yellow dotted lines) of
36
37 control embryos. Scale Bar: 50 μm.
38
39
40
41
42

43
44 **Figure 7. A proposed model for RSC cell-off origin and *Hes4* function during embryonic**
45
46 **retinogenesis.**

47
48 (A) Schema highlighting the dynamics of *Hes4* expression during retinogenesis. Adult RSCs
49
50 likely originate from the most dorsal *Hes4*-expressing part of the optic vesicle (red dotted
51
52 lines). (B) Schematic illustration of *Hes4* regulation and function in the presumptive adult
53
54 RSCs. GCL: ganglion cell layer; INL/ONL: inner/outer nuclear layer.
55
56
57
58
59
60

Supplementary legends

Figure S1. *Hes4* expression on whole mount embryos.

Whole mount *in situ* hybridization analysis of *Hes4* expression (lateral views of tailbud heads, anterior to the right). In addition to the eye, *Hes4* expression is detected in several parts of the brain and spinal cord, in the branchial arches (white arrow in B-E) and in the pronephros (black arrowhead in B-D). For more details on *Hes4* expression pattern in whole mount embryos, see [65]. Scale Bar: 300 μ m.

Figure S2. Expression pattern of the retinal stem cell markers *Id2* and *Wnt8b* during retinogenesis.

In situ hybridization analysis of *Id2* and *Wnt8b* expression during retinal development. Following expression in the presumptive RPE at the optic vesicle stage (stage 24), both genes get restricted to the peripheral RPE and forming CMZ in the optic cup (stage 32). Their expression in the CMZ of the mature retina (stage 41) is confined to the most peripheral region where neural stem cells reside (see magnifications of the dorsal CMZ on the right panels). Note that both *Id2* and *Wnt8b* exhibit a more intense staining dorsally than ventrally. Scale Bar: 50 μ m.

Figure S3. *Hes4* is expressed in domains exhibiting high Wnt and low Hedgehog activity.

Comparative *in situ* hybridization analysis of *Hes4* expression profile with that of *eGFP* (in Wnt-responsive transgenic embryos) and *Gli1* (as a readout of hedgehog signalling activity). Black and red dotted lines respectively delineate the RPE/NR border and the stem cell zone of the CMZ. Red and black arrows respectively point to the differentiating central RPE and the retinal margin. Drawings on the right schematize *Hes4* expression and domains with Wnt or Hedgehog activity at stage 25 and 35. Scale Bar: 50 μ m.

Figure S4. *Hes4* represses its own transcription.

(A) Whole mount *in situ* hybridization analysis of *N-Tubulin* and *Hes4* expression on stage 23 embryos injected with *Hes4VP16-GR* mRNA. Arrows indicate ectopic expression in the epidermis (anterior on the right, dorsal side up). Of note, a similar result was obtained with a probe designed in the 3'UTR of the *Hes4* gene, confirming that it was not due to cross-hybridization with the *Hes4VP16-GR* mRNA. (B) Whole mount *in situ* hybridization analysis of *Rx* and *Hes4* expression on stage 20 embryos, following injection of control or *Hes4* morpholinos (Mo). Note the reduction of *Rx* staining in the eye field (black arrow) and the increase of *Hes4* expression (white arrows) on the injected side (Inj). N indicates the proportion of embryos exhibiting the corresponding phenotype. Scale bar: 500 μm (A) or 300 μm (B).

Figure S5. *Hes4* expression is insensitive to a 24-hour Notch signalling blockade.

(A-E) *In situ* hybridization analysis following a 24- (from stage 25 to stage 35; A, B) or a 48-hour (from stage 25 to stage 39; C, D) treatment with the Notch inhibitor DAPT. (A, C) Expression of the Notch target gene *HRT1* (lateral views of the head) serves as a control of DAPT efficiency [42]. Arrows point to the brain labelling, which is clearly decreased upon DAPT treatment. (B, D) Typical *Hes4* staining on retinal sections from control or treated embryos as indicated. Shown on the right are higher magnifications of the dorsal CMZ, delineated with dotted lines. (E) Quantification of *Hes4* staining area in the dorsal CMZ in each condition. (F) qPCR analysis of retinal *Hes4* expression at stage 35 following a 24-hour DAPT treatment. *N-Tubulin* serves as a control of drug efficiency. Scale bar: 50 μm .

Figure S6. *Hes4* overexpression prolongs proliferation of retinal progenitors.

(A) Typical sections of stage 32 retinas lipofected with *GFP* and immunostained for both GFP and BrdU. White and yellow arrows point to a $\text{GFP}^+/\text{BrdU}^-$ and to a $\text{GFP}^+/\text{BrdU}^+$ cell,

1
2
3 respectively. (B) Quantification of BrdU incorporation (3-hour pulse) in retinal clones at stage
4
5 32 or 35, following *Hes4* or *Hes2* lipofection. Scale Bar: 50 μm .
6
7

8 **Figure S7. *Hes4*-dependent reduction of neurogenesis can be rescued by forcing cell**
9 **cycle exit.**
10

11
12 (A, B) Analysis of cell type distribution in stage 41 retinas, following *Hes4*, *Xgadd-45 γ* or
13 *Hes4* plus *Xgadd-45 γ* lipofection. (A) Typical sections of retinas transfected with the
14 indicated construct. (B) Quantification of neurons and glia among transfected cells in each
15 condition. (C) Birthdating experiments in retinas lipofected with *Hes4*, *Xgadd-45 γ* or *Hes4*
16 plus *Xgadd-45 γ* . GCL: ganglion cell layer; INL/ONL: inner/outer nuclear layer. Scale Bar: 25
17 μm .
18
19
20
21
22
23
24
25
26

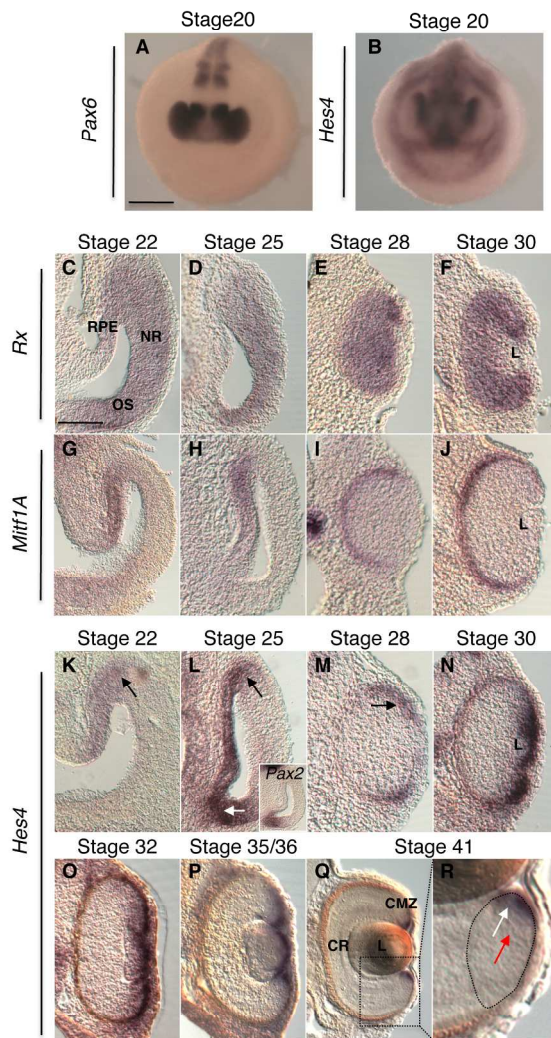
27 **Supplementary Table 1. List of antibodies used.**
28

29
30 **Supplementary Table 2. List of primers used in qPCR experiments.**
31

32
33 **Supplementary Table 3. Labelling index and cell cycle parameters in the NR and**
34 **NR/RPE border.**
35
36

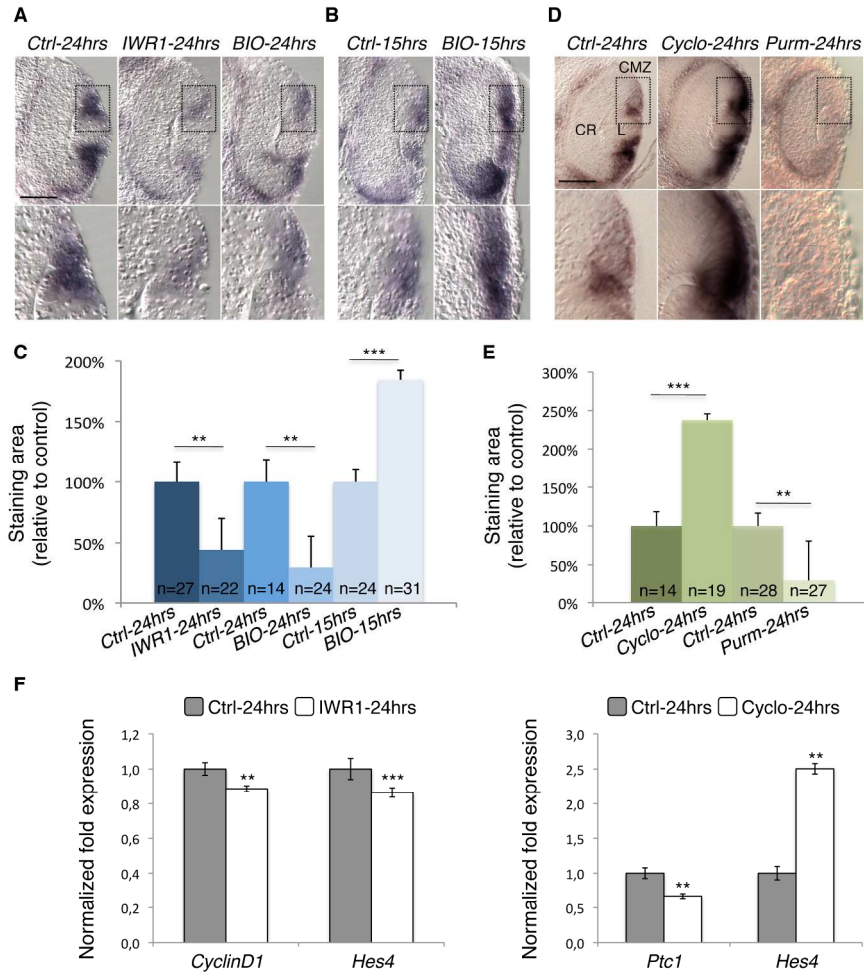
37
38 (A) EdU labelling indexes evaluated in the NR or NR/RPE border, after cumulative EdU
39 labelling starting from stage 22 (wild-type embryos; numeric data corresponding to Fig. 6F)
40 or stage 25 (control and *Hes4GR* overexpressing embryos; numeric data corresponding to Fig.
41 6B) as indicated. (B) Corresponding cell cycle parameters obtained after plotting numeric
42 data in the Excel sheet provided by Dr R. Nowakowski [46]. T_{G2} , T_M and T_{G1} were calculated
43 using data deduced from Fig. 6B, 6D and from the mitotic index measured in Fig. 6A (see
44 material and methods for details). GF: growth fraction; LI: labelling index; ND: not
45 determined.
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

El Yakoubi *et al.*, Fig. 1



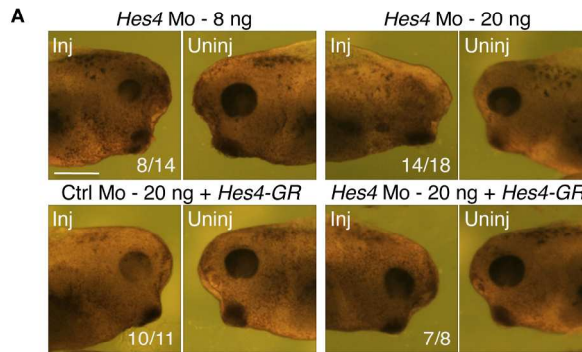
190x254mm (300 x 300 DPI)

El Yakoubi et al., Fig. 2



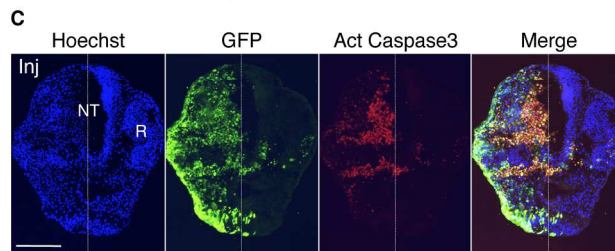
190x254mm (300 x 300 DPI)

El Yakoubi *et al.*, Fig. 3



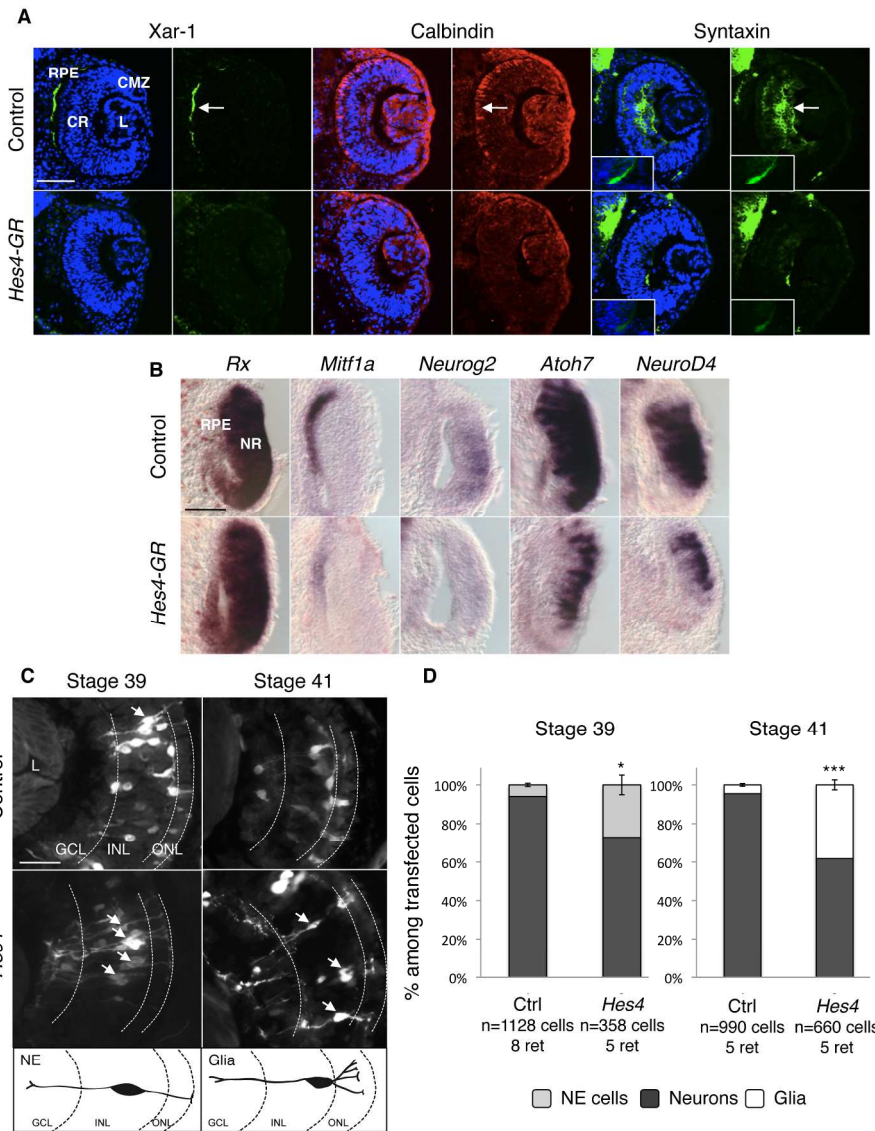
B

	% embryos with reduced eye size	% embryos with a missing eye
Mo <i>Hes4</i> 8 ng	57% (8/14)	43% (6/14)
Mo <i>Hes4</i> 20 ng	22% (4/18)	78% (14/18)
<i>Hes4-GR</i>	91% (10/11)	9% (1/11)
Mo <i>Hes4</i> 20 ng + <i>Hes4-GR</i>	87.5% (7/8)	12.5% (1/8)



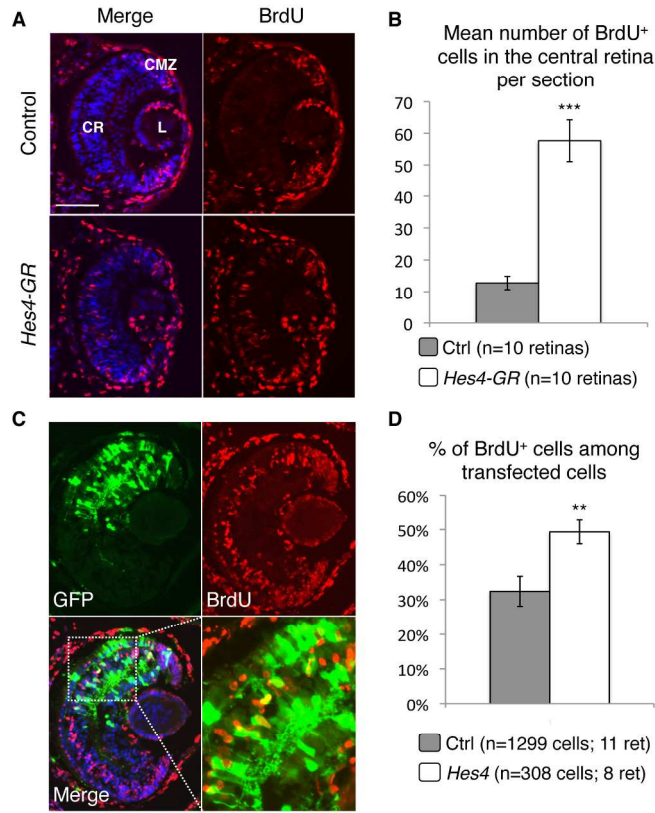
190x254mm (300 x 300 DPI)

El Yakoubi *et al.*, Fig. 4



190x254mm (300 x 300 DPI)

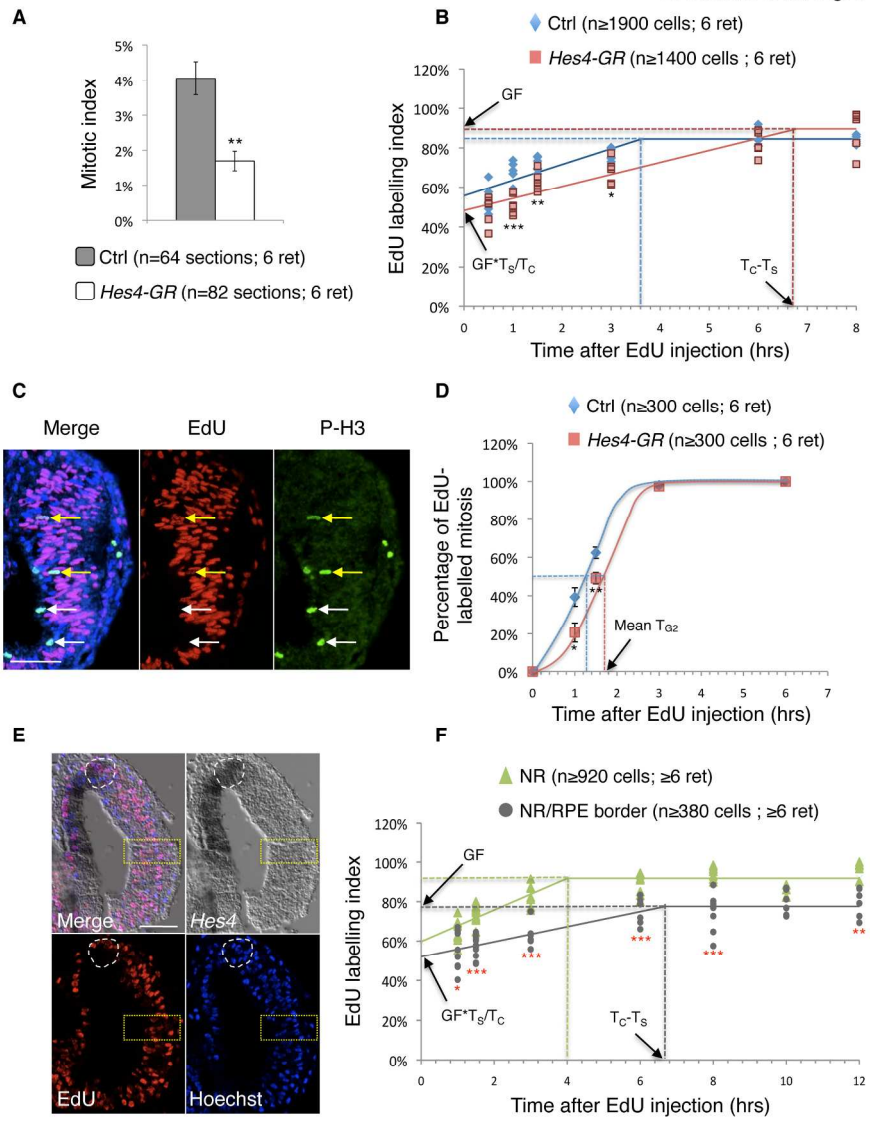
El Yakoubi *et al.*, Fig. 5



190x254mm (300 x 300 DPI)

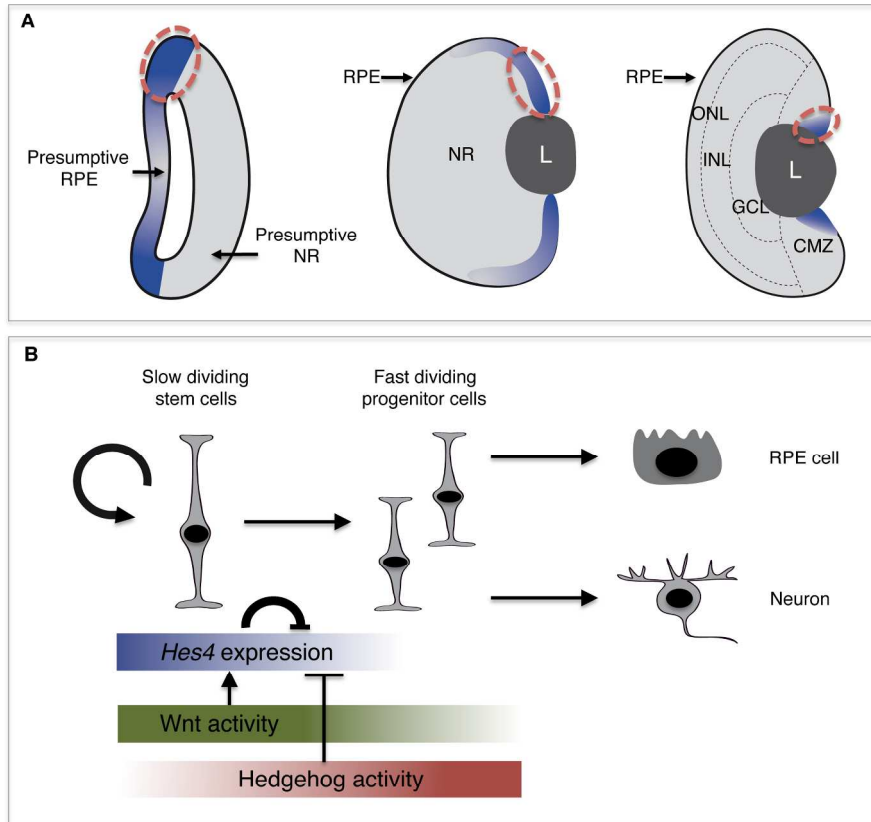
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

El Yakoubi *et al.*, Fig. 6



190x254mm (300 x 300 DPI)

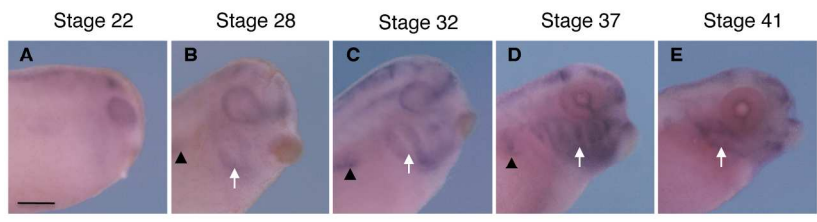
El Yakoubi *et al.*, Fig. 7



190x254mm (300 x 300 DPI)

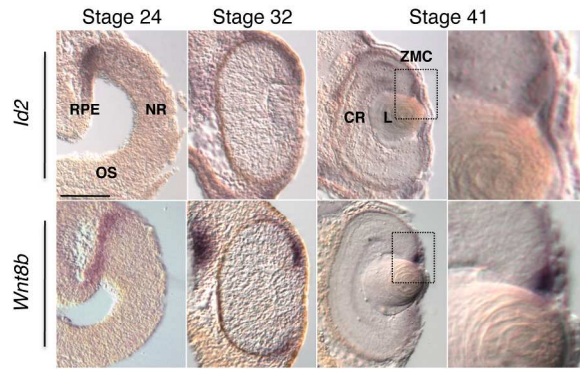
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

El Yakoubi *et al.*, Fig. S1



195x254mm (300 x 300 DPI)

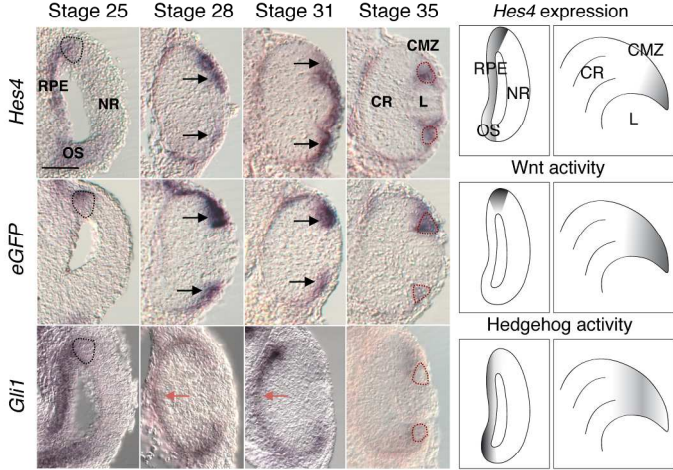
El Yakoubi *et al.*, Fig. S2



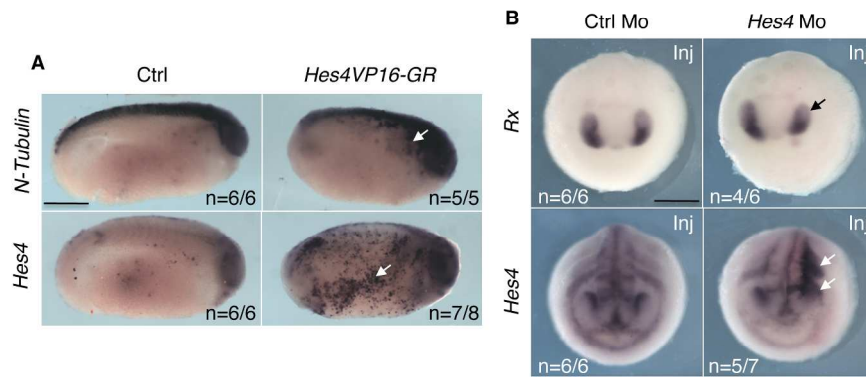
202x263mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

El Yakoubi *et al.*, Fig. S3

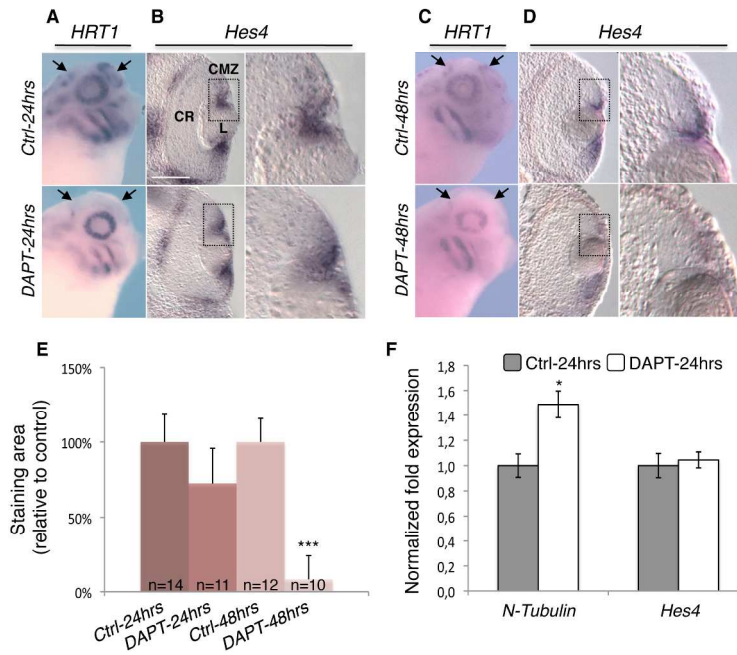


201x263mm (300 x 300 DPI)

El Yakoubi *et al.*, Fig. S4

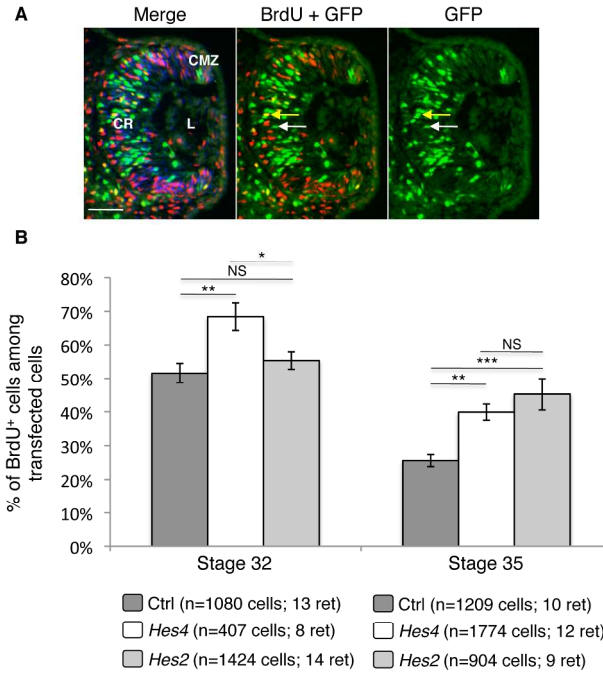
202x263mm (300 x 300 DPI)

El Yakoubi *et al.*, Fig. S5



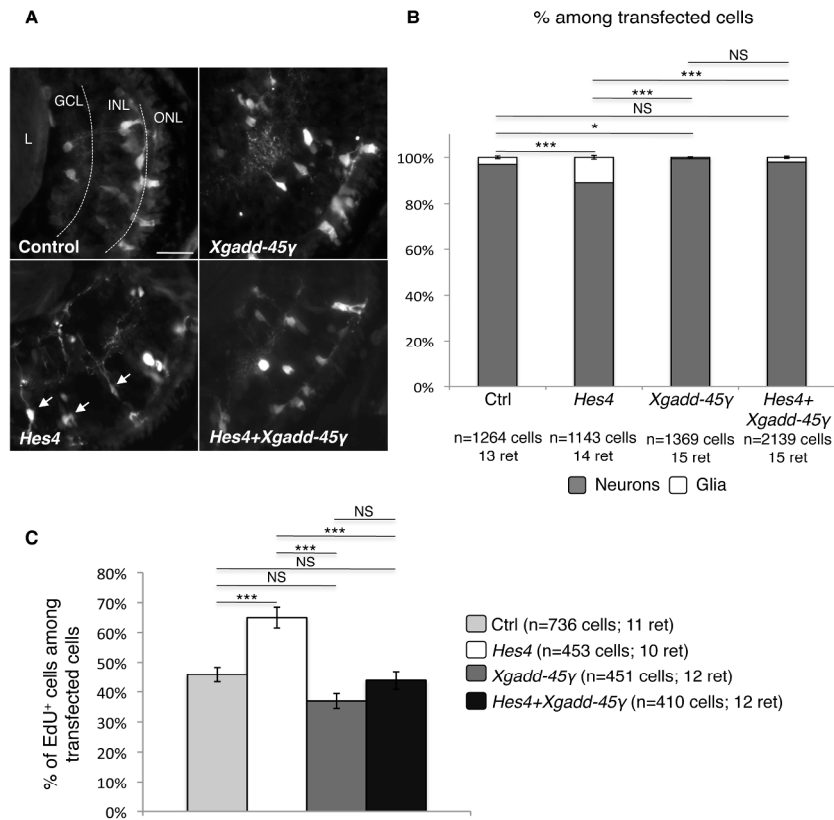
208x280mm (300 x 300 DPI)

El Yakoubi *et al.*, Fig. S6



208x280mm (300 x 300 DPI)

El Yakoubi *et al.*, Fig. S7



209x280mm (300 x 300 DPI)

El Yakoubi *et al.*, Supplementary Table 1**Supplementary Table 1. List of antibodies used.**

Antibody	Dilution	Manufacturer
Mouse monoclonal anti-BrdU	1:100	Becton Dickinson
Rabbit polyclonal or mouse monoclonal anti-GFP	1:400	Molecular Probes
Chicken polyclonal anti-GFP (*)	1:500	Aves Labs
Rabbit polyclonal anti-phospho-Histone H3	1:500	Upstate biotechnology
Rabbit polyclonal anti-active caspase 3	1:500	BD Pharmingen
Mouse monoclonal anti-syntaxin	1:500	Sigma
Mouse monoclonal anti-RPE XAR1	1:10	A gift from Don Sakaguchi
Mouse monoclonal anti-calbindin	1:100	Swant
Anti-mouse or anti-rabbit fluorescent secondary antibodies (Alexa 488 or 594)	1:1000	Molecular Probes

(*) Antibody used on paraffin-sections following a 10 mn antigen unmasking treatment in boiling Heat-mediated Antigen Retrieval Buffer (10mM sodium citrate, 0.05% Tween 20, pH 6.0)

Supplementary Table 2. List of primers used in qPCR experiments.

Xenopus laevis qPCR primers

gene	FW primer	RV primer
<i>Hes4</i>	CCCCCTCCAGCCAACAACCA	GGGGGAGATGGCCTCTGCTG
<i>Patched1</i>	CAGCTGCCAGCCGAGGGTA	GGGCGAAATTGGCATCGCAGTA
<i>CyclinD1</i>	CATCCGCAAACACGCCCAGA	GACACTGCCAGCGGCGATCA
<i>N-Tubulin</i>	CCCGTGCCATCCTTGTGGATTT	GCCCAGTTATTGCCAGCACCCTT
<i>ODC</i>	GCTTCTGGAGCGGGCAAAGGA	CCAAGCTCAGCCCCCATGTCA
(reference gene)		
<i>RPL8</i>	CCACGTGTCCGTGGTGTGGCTA	GCGCAGACGACCAGTACGACGA
(reference gene)		

Supplementary Table 3. Labelling index and cell cycle parameters in the NR and NR/RPE border.

A		EdU exposure (hrs)							
		0.5	1	1.5	3	6	8	10	12
NR Ctrl Stage 25	LI (% ± s.e.m.)	53.80 ± 2.77	67.89 ± 2.04	71.79 ± 1.48	77.06 ± 1.24	85.04 ± 1.80	83.92 ± 0.82	ND	ND
	Total cell count	1927	2108	1785	3008	1948	2470		
NR <i>Hes4-GR</i> Stage 25	LI (% ± s.e.m.)	48.65 ± 2.84	51.45 ± 2.04	62.70 ± 1.95	68.52 ± 2.44	83.24 ± 2.52	89.60 ± 4.18	ND	ND
	Total cell count	1394	2153	2076	2181	2457	2374		
NR Stage 22	LI (% ± s.e.m.)	ND	65.60 ± 1.96	73.93 ± 1.16	82.95 ± 1.87	89.11 ± 1.93	94.81 ± 1.10	86.04 ± 1.23	97.03 ± 1.45
	Total cell count		1008	1318	983	1698	1043	1361	927
NR/RPE border Stage 22	LI (% ± s.e.m.)	ND	55.84 ± 3.25	57.98 ± 1.64	62.84 ± 1.95	75.17 ± 2.16	74.67 ± 3.40	79.51 ± 2.55	79.62 ± 2.97
	Total cell count		644	1057	724	853	387	559	493
B		Cell-cycle parameters							
		T _C -T _S	GF*T _S /T _C	GF	T _C	T _S	T _{G2}	T _M	T _{G1}
NR Ctrl Stage 25		3.62 hrs	0.56	84.48%	10.62 hrs	7.00 hrs	1.20 hrs	0.43 hrs	1.99 hrs
NR <i>Hes4-GR</i> Stage 25		6.79 hrs	0.48	89.60%	14.73 hrs	7.94 hrs	1.60 hrs	0.25 hrs	4.94 hrs
NR Stage 22		4.00 hrs	0.60	91.78%	11.47 hrs	7.47 hrs	ND	ND	ND
NR/RPE border Stage 22		6.69 hrs	0.52	77.61%	20.26 hrs	13.57 hrs	ND	ND	ND

2. Expression, régulation et fonction du gène *Hes1* au cours de la rétinogenèse embryonnaire

2.1. PROFIL D'EXPRESSION DE *HES1* ET COMPARAISON AVEC *HES4*

Avant d'entamer l'étude fonctionnelle du gène *Hes1*, nous avons également établi son patron d'expression à différents stades de la rétinogenèse. Au stade 18 et 22, son profil d'expression n'est pas complètement similaire à celui de *Hes4*. *Hes1* s'exprime en effet dans tout le champ optique au stade neurula, comme *Pax6* et *Rx*, puis dans la totalité de la vésicule optique y compris dans la rétine neurale (Figure 22 A, B). À partir du stade 25 cependant, l'expression de *Hes1* s'éteint dans la rétine neurale et devient très similaire à celle de *Hes4* (Figure 22 C-H) : son expression s'éteint progressivement dans l'EPR central pour se limiter à l'EPR périphérique et à la ZMC en formation avant de se confiner aux cellules souches de la ZMC au stade 41. À ce stade cependant, la comparaison des profils d'expression dans la ZMC de *Hes1* et de *Hes4* révèle une expression moins restreinte de *Hes1* qui semble s'étendre à la zone des précurseurs précoces (Figure 22 H, H').

Le profil d'expression de *Hes1*, par ses similitudes avec celui de *Hes4* et des autres marqueurs de cellules souches testés, renforce donc notre hypothèse que les cellules souches de la ZMC dérivent de la frontière entre l'EPR présomptif et la rétine neurale. Il suggère également une potentielle participation fonctionnelle de ce facteur à la maintenance de ce pool de cellules souches présomptives. Néanmoins, son expression dans les précurseurs précoces de la rétine neurale au stade vésicule optique ou dans la ZMC suggère des rôles additionnels de ce facteur dans ces cellules.

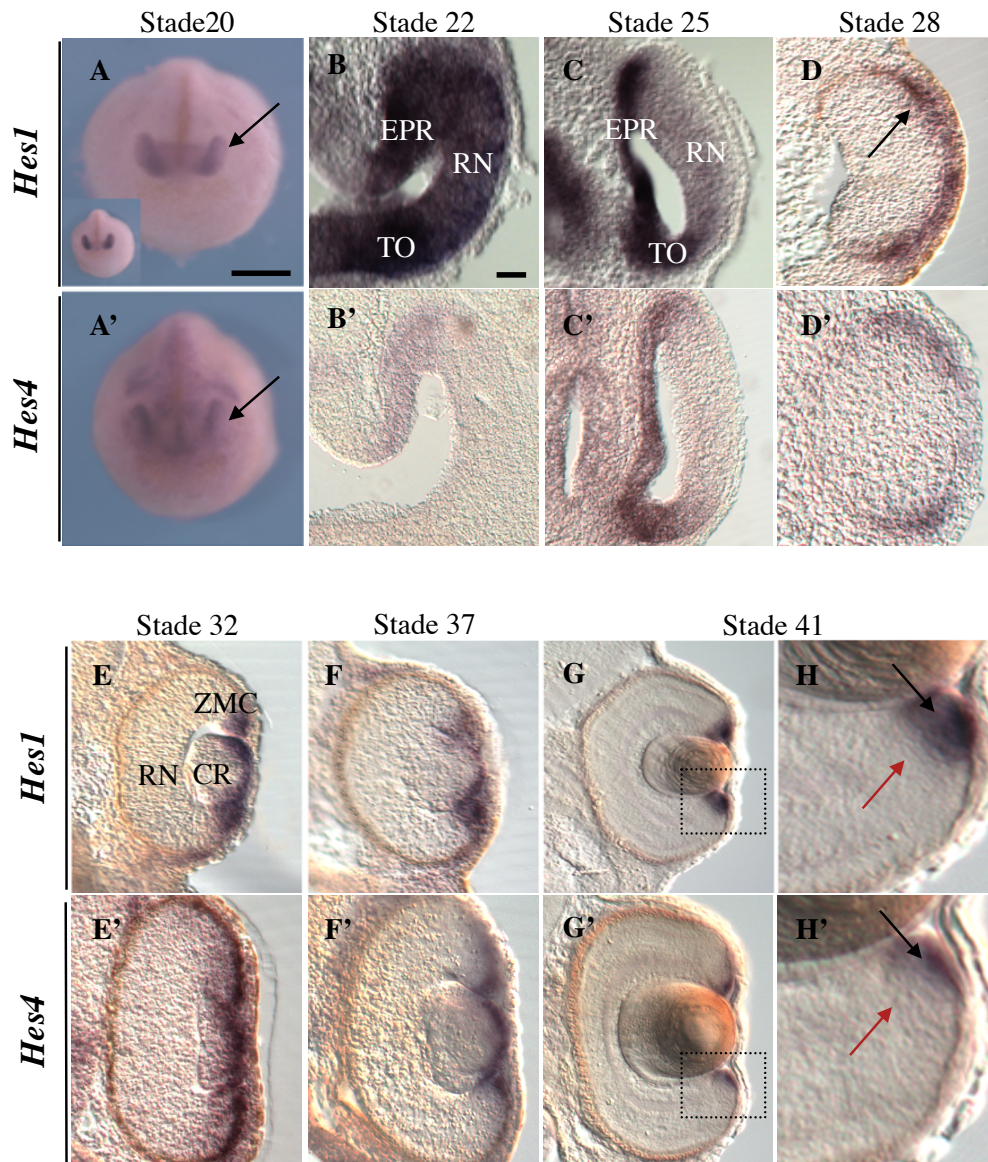


Figure 22 : Comparaison par hybridation *in situ* des profils d'expression des gènes *Hes1/4* au cours de la rétino-genèse.

A, A'. Embryons *in toto* au stade 20 (vues antérieures, dos en haut). Les flèches indiquent les champs optiques. *Hes1*, comme *Rx* (petit panel en A), marque tout le champ optique, alors que *Hes4* ne marque que sa région proximo-dorsale. **B-H, B'-H'**. Coupes transversales de rétines présentant l'expression de *Hes1* (B-H) et de *Hes4* (B'-H'). Dans la jeune vésicule optique (stade 22), *Hes1* s'exprime dans toute la vésicule optique (B), à l'inverse de *Hes4* dont l'expression est restreinte à l'EPR présumé (B'). Leur expression devient ensuite similaire et se localise dans le territoire présumé de l'EPR et de la tige optique au stade 25 (C, C'), dans l'EPR périphérique (D, D') puis dans la ZMC en formation (E, F, E', F') aux stades 28-32, et enfin à la fin à la pointe de la ZMC post embryonnaire au stade 41 (G, G'). Les panels (H, H') correspondent aux grossissements des encadrés en (G, G'). Les flèches noires indiquent les cellules souches de la ZMC alors que les flèches rouges pointent la région des précurseurs. Notons que l'expression de *Hes1* est plus large que celle de *Hes4* dans la ZMC post embryonnaire. CR: cristallin; EPR: épithélium pigmenté rétinien RN: rétine neurale; TO: tige optique; ZMC: zone marginale ciliaire. Échelle : 250 μm (A, A') ou 50 μm (autres panels).

2.2. REGULATION DE *HES1* ET COMPARAISON AVEC *HES4*

En accord avec cette hypothèse, nous avons pu montrer que la régulation de l'expression de *Hes1* différait de celle de *Hes4*. En effet, contrairement à *Hes4*, l'expression de *Hes1* est augmentée suite à l'activation de la voie Hedgehog, et inversement, elle est diminuée quand cette voie est inhibée (Figure 23 A, B). Toutefois, comme *Hes4*, l'activation de la voie Wnt augmente son expression et son inhibition la réduit (Figure 23 C, D). De plus, son expression n'est pas affectée par l'inhibition de Notch (Figure 24).

Ces résultats montrent que l'expression de *Hes1* dans la rétine embryonnaire dépend comme celle d'*Hes4* de la voie Wnt mais est régulée de façon opposée à celle d'*Hes4* par la voie Hedgehog.

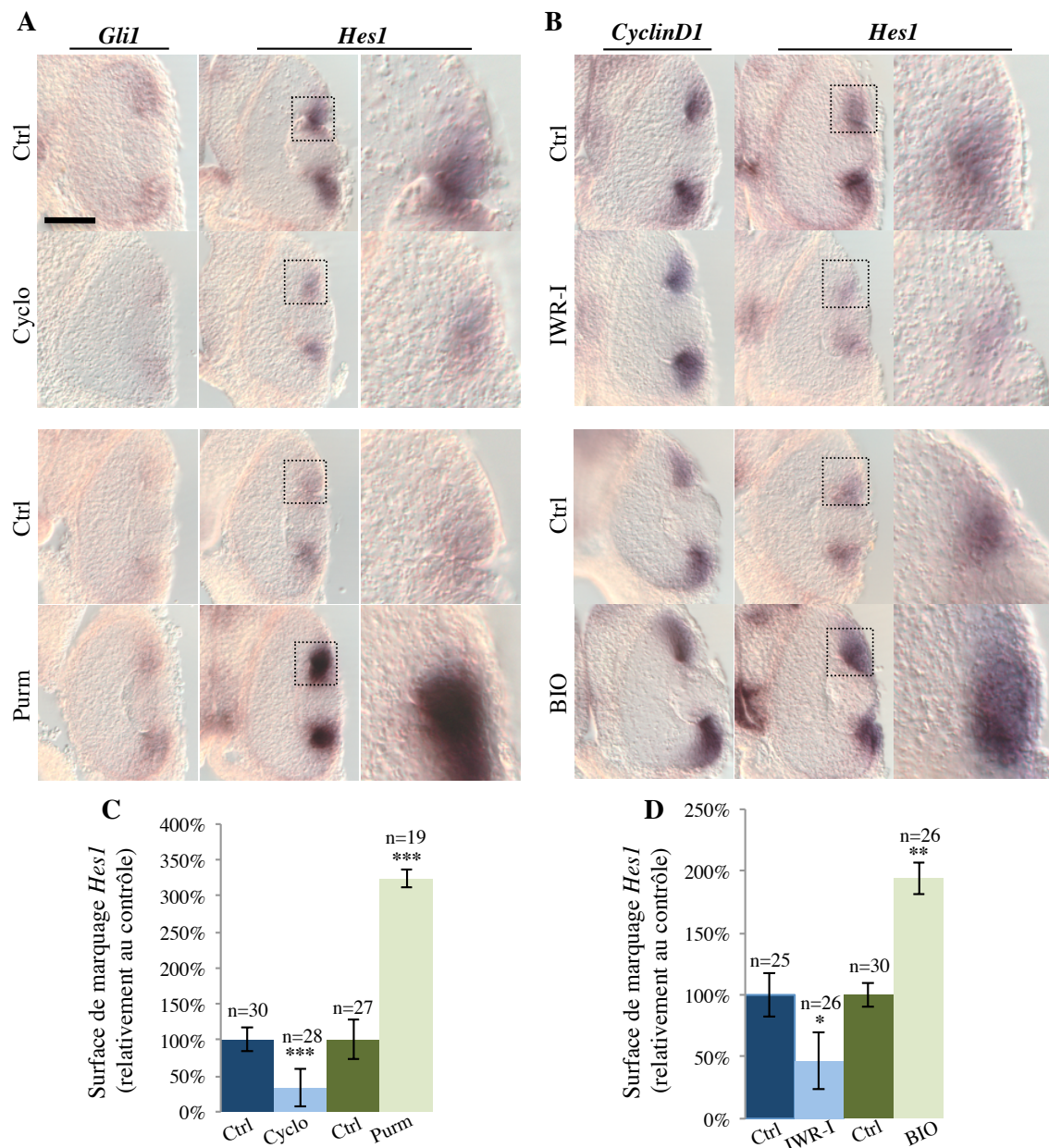


Figure 23 : Les voies Wnt et Hedgehog régulent positivement l'expression embryonnaire de *Hes1*.

A, B. Analyse par hybridation *in situ* de l'expression de *Hes1* après 24h (stades 25 à 35) de traitement aux agents pharmacologiques IWR-I, BIO (respectivement inhibiteur et activateur de la voie Wnt), Cyclophamide et Purmorphamine (respectivement inhibiteur et activateur de la voie Hedgehog). Les gènes *CyclinD1* et *Gli1* sont respectivement des cibles de la voie Wnt et de la voie Hedgehog, et servent de contrôles positifs de l'efficacité des agents pharmacologiques. Les panels de droite en (A, B) correspondent aux grossissements des encadrés des panels du milieu. **C, D.** Quantification de la surface de marquage de *Hes1* dans la ZMC. L'inhibition des voies Wnt et Hedgehog réduit l'expression de *Hes1* alors que leur activation l'augmente. n: nombre de sections quantifiées. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$ (t-test de Student). Échelle : 50 μm .

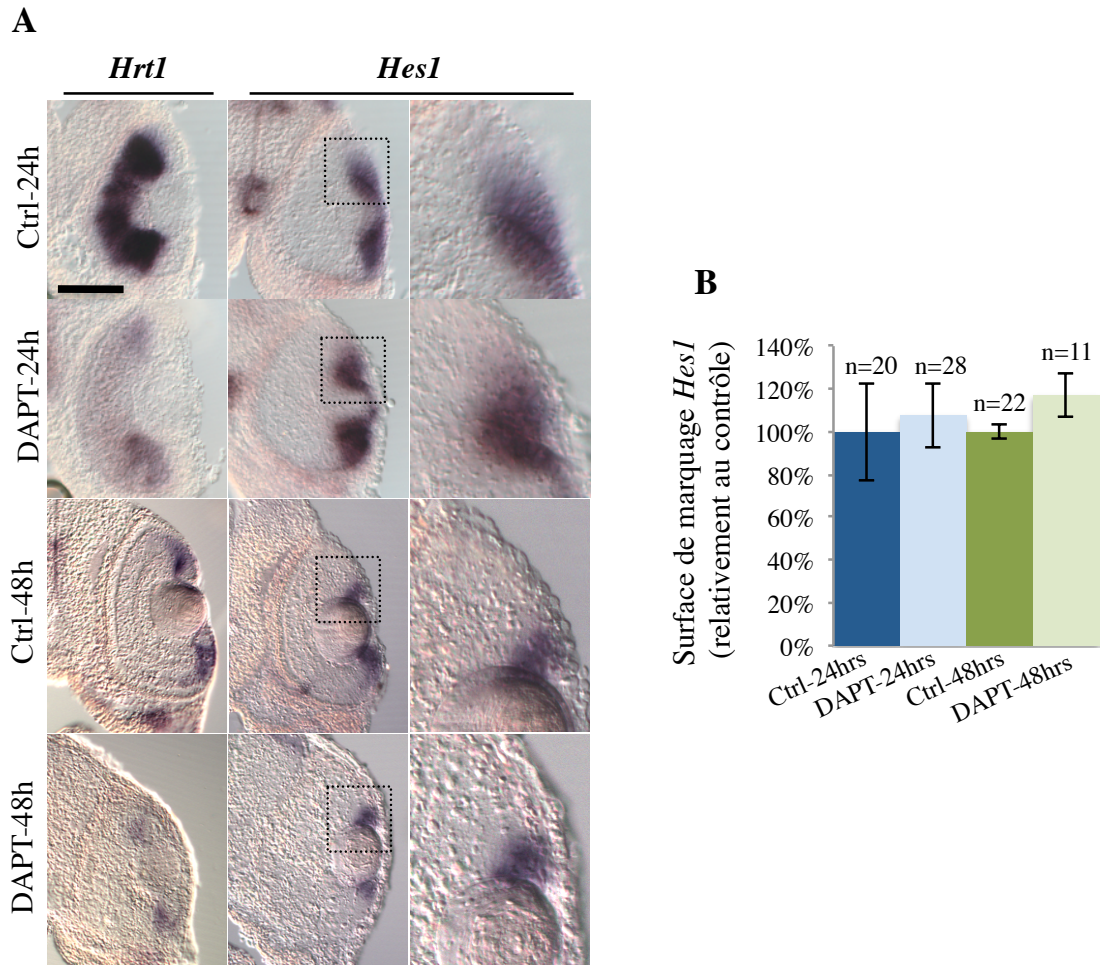


Figure 24 : L'expression embryonnaire du gène *Hes1* est indépendante de la voie Notch.

A. Analyse par hybridation *in situ* de l'expression de *Hes1* après 24h (stades 25 à 35) ou 48h (stades 25 à 39) de traitement au DAPT (inhibiteur de la voie Notch). La diminution du marquage *Hrt1* témoigne de l'action effective du DAPT (contrôle positif). Les panels de droite correspondent aux grossissements des encadrés des panels du milieu **B.** Quantification de la surface de marquage de *Hes1* dans la ZMC. L'expression de *Hes1* dans la rétine n'est pas affectée par l'inhibition de la voie Notch. n: nombre de sections quantifiées. Échelle : 50 μm .

Nous avons également entamé une comparaison de la régulation des gènes *Hes1/4* mais à des stades post-embryonnaires cette fois (traitements pharmacologiques à partir du stade 39). Comme au stade embryonnaire, leur expression n'est pas affectée par l'inactivation de la voie Notch (Figure 25 A, B), alors qu'elle est augmentée après activation de la voie Wnt (Figure 25 C-D). Il faut noter qu'à nouveau pour *Hes4*, cette augmentation advient après 15h de traitement à BIO puis une diminution est observée à 24h. Ce n'est pas le cas pour *Hes1* qui continue à présenter une expression accrue après 24h de traitement à BIO (suggérant l'absence de boucle de rétroaction négative). Par ailleurs, on observe à nouveau que l'activation de la voie Hedgehog a un effet opposé sur l'expression des deux gènes : elle augmente l'expression de *Hes1* et diminue celle de *Hes4* (Figure 25 E, F). En revanche, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effets significatifs après application des inhibiteurs IWR1 (Figure 25 C, D) et cyclopamine (Figure 25 E, F) malgré des tendances similaires aux résultats des traitements embryonnaires. Ceci suggère que les voies Wnt et Hedgehog ne sont pas nécessaires à l'expression de *Hes1/4* dans la ZMC post-embryonnaire. Alternativement, il est possible que le niveau d'inhibition de ces voies soit insuffisant pour observer un effet. Une raison possible pourrait être une perméabilité à ces drogues réduite des têtards par rapport aux embryons et donc une moindre exposition du tissu rétinien.

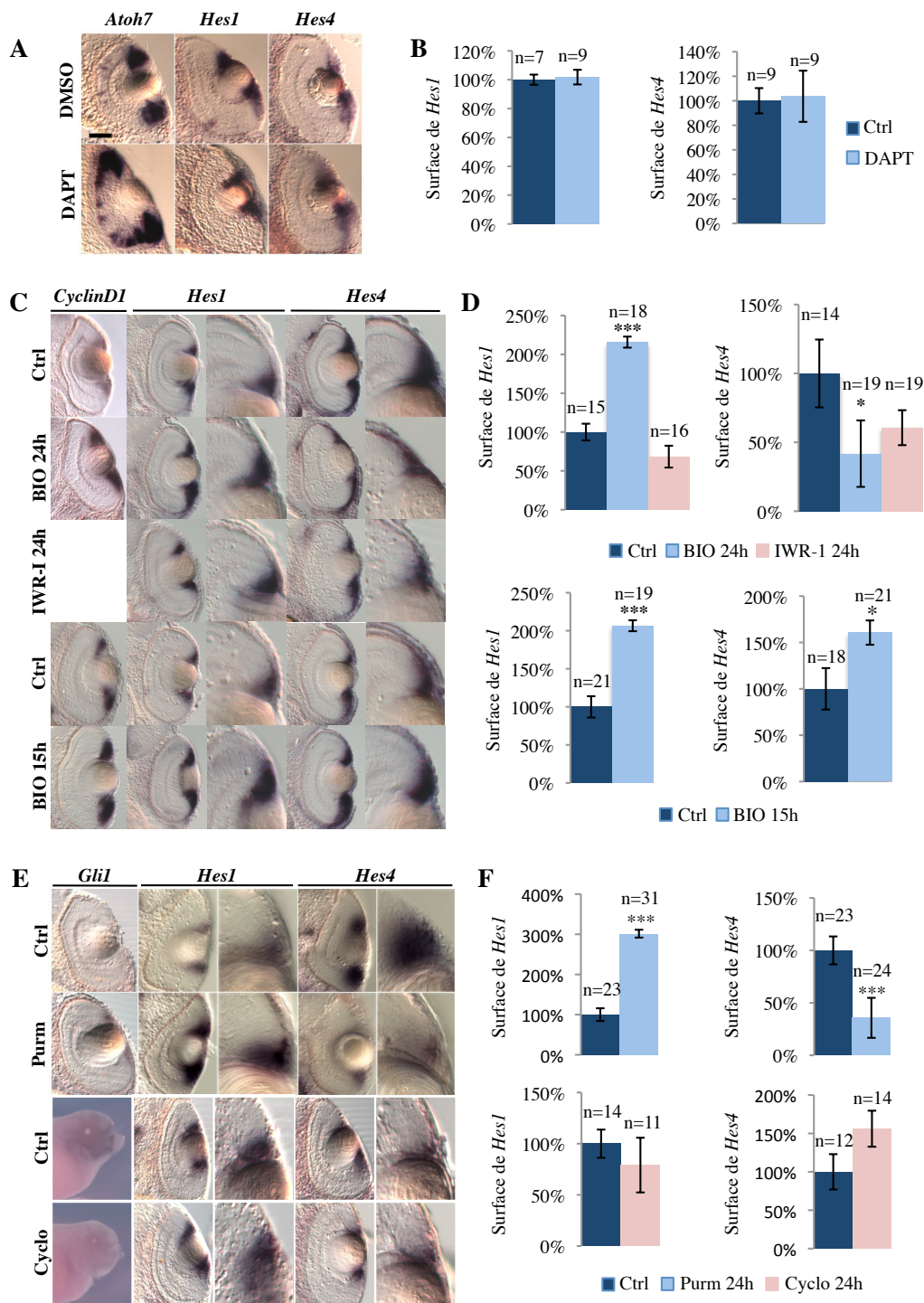


Figure 25 : Régulation de l'expression des gènes *Hes1/4* dans la ZMC post-embryonnaire.

A, C, E. Analyse par hybridation *in situ* de l'expression de *Hes1* après 15h ou 24h (à partir du stade 39) de traitement au DAPT (A), à BIO ou IWR-1 (C), et à la Purmorphamine ou à la Cyclophamide (E). Les gènes *Atoh7*, *CyclinD1*, *Gli1* ou *Ptc* (en *in toto*) témoignent de l'action effective de la drogue considérée (contrôles positifs). **B, D, F.** Quantification de la surface de marquage de *Hes1/4* dans la ZMC post-embryonnaire. n: nombre de sections quantifiées. (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0,001$ (t-test de Student). Échelle : 50 μ m.

2.3. ANALYSE FONCTIONNELLE DE *HES1* ET COMPARAISON AVEC *HES4*

2.3.1. Perte de fonction

L'expression au stade neurula des gènes *Hes1/4* dans les champs optiques suggère un rôle précoce dans la formation de l'œil. Comme *Hes4*, la perte de fonction de *Hes1* par des oligonucléotides morpholinos spécifiques (Figure 26 A-C) provoque des défauts sévères de la morphogenèse rétinienne probablement liés à une mort cellulaire accrue (Figure 26D). Il est possible que cette apoptose massive soit la conséquence d'un arrêt de la prolifération comme le suggèrent des expériences de marquage au BrdU, montrant une absence d'incorporation du nucléotide dans les zones injectées (Figure 26D). Quoi qu'il en soit, un tel phénotype empêche l'analyse de la perte de fonction de ce gène sur les cellules souches. Pour contourner ce problème, nous nous sommes donc focalisés, comme pour *Hes4*, sur des expériences de gain de fonction.

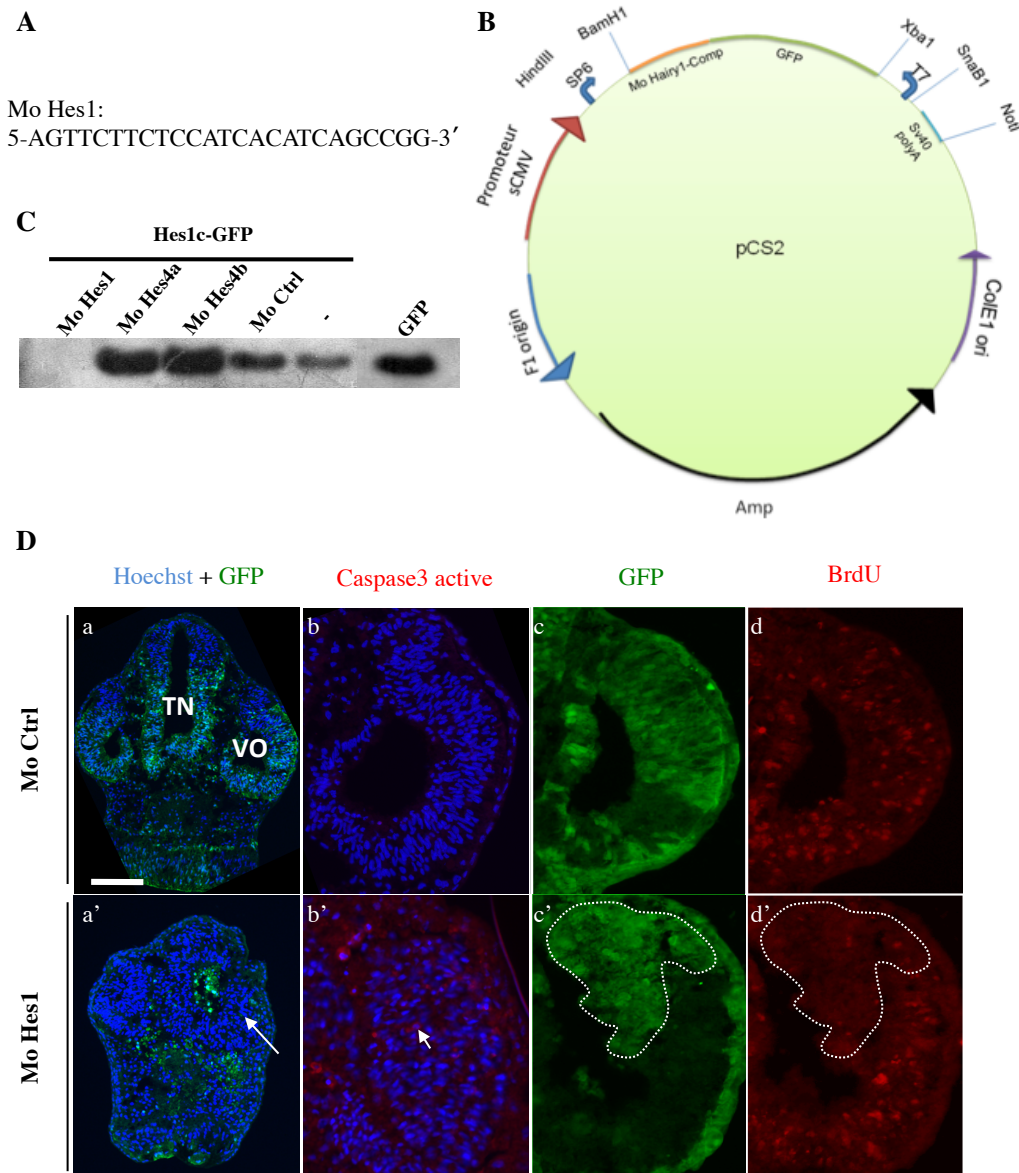


Figure 26 : La perte de fonction du gène *Hes1* perturbe fortement la formation de l'œil.

A. Séquence de l'oligonucléotide morpholino dirigé contre les ARNm *Hes1* (Mo Hes1). **B.** Carte du plasmide *Hes1c-GFP* contenant la séquence codante de la GFP clonée en aval de la séquence complémentaire du Mo Hes1 (MoHairy-Comp). **C.** Test par Western-blot de la spécificité et de l'efficacité des Mo Hes1. Les morpholinos Mo Hes1, Mo Hes4a (dirigé contre *Hes4a*), Mo Hes4b (dirigé contre *Hes4b*) ou Mo Ctrl (morpholino standard) ont été co-injectés avec des ARNm *Hes1c-GFP* au stade 2 cellules. On détecte ensuite l'expression de la GFP dans des extraits protéiques d'embryons au stade 18. Seuls les Mo Hes1 inhibent la traduction de la GFP. **D.** Coupes transversales de rétines au stade 25 après injection de Mo Hes1 au stade 2 cellules. Le côté injecté est visualisé par la fluorescence de la GFP (en vert). (**a, a'**). Les embryons Mo Hes1 présentent une rétine très réduite voire absente du côté injecté (flèche). (**b, b'**). Immunomarquage anti-caspase3 active montrant une augmentation des cellules apoptotiques (flèches) du côté injecté. (**d, d'**). Immunomarquage anti-BrdU montrant l'absence de prolifération dans la région injectée d'une rétine (région GFP⁺). Les noyaux cellulaires sont marqués au Hoechst (en bleu). TN : tube neural ; VO : vésicule optique. Échelle: 50 μ m.

2.3.2. Gain de fonction

Comme pour *Hes4*, j'ai pu montrer (i) que l'injection au stade 2 cellules d'ARNm *Hes1-GR* inhibe l'engagement des précurseurs rétiniens vers un destin EPR ou neuronal (Figure 27 A, B) et (ii) que les cellules surexprimant *Hes1* (expériences de lipofection) présentent un délai de différenciation et sont biaisées vers une identité gliale (Figure 27 C, D). Associé à cela, *Hes1* s'est également avéré capable de maintenir les cellules en prolifération comme l'attestent des marquages au BrdU après injection d'ARNm au stade 2 cellules (Figure 28 A, B) ou des expériences de birthdating (Figure 28 C, D).

Enfin, nous avons pu montrer que la surexpression de *Hes1*, comme celle d'*Hes4* induisait un ralentissement significatif de la vitesse de division des précurseurs rétiniens (Figure 29).

En conclusion, malgré des différences d'expression et de régulation, aucune de nos analyses fonctionnelles n'a pu mettre en évidence de différences fonctionnelles entre les deux gènes *Hes1/4*. Il est donc possible qu'ils coopèrent intimement pour réguler des processus cellulaires communs au sein d'un même réseau génique. Cette conclusion est cependant à moduler du fait que nos données reposent essentiellement sur du gain de fonction et ne permettent donc pas de formellement discriminer les deux gènes.

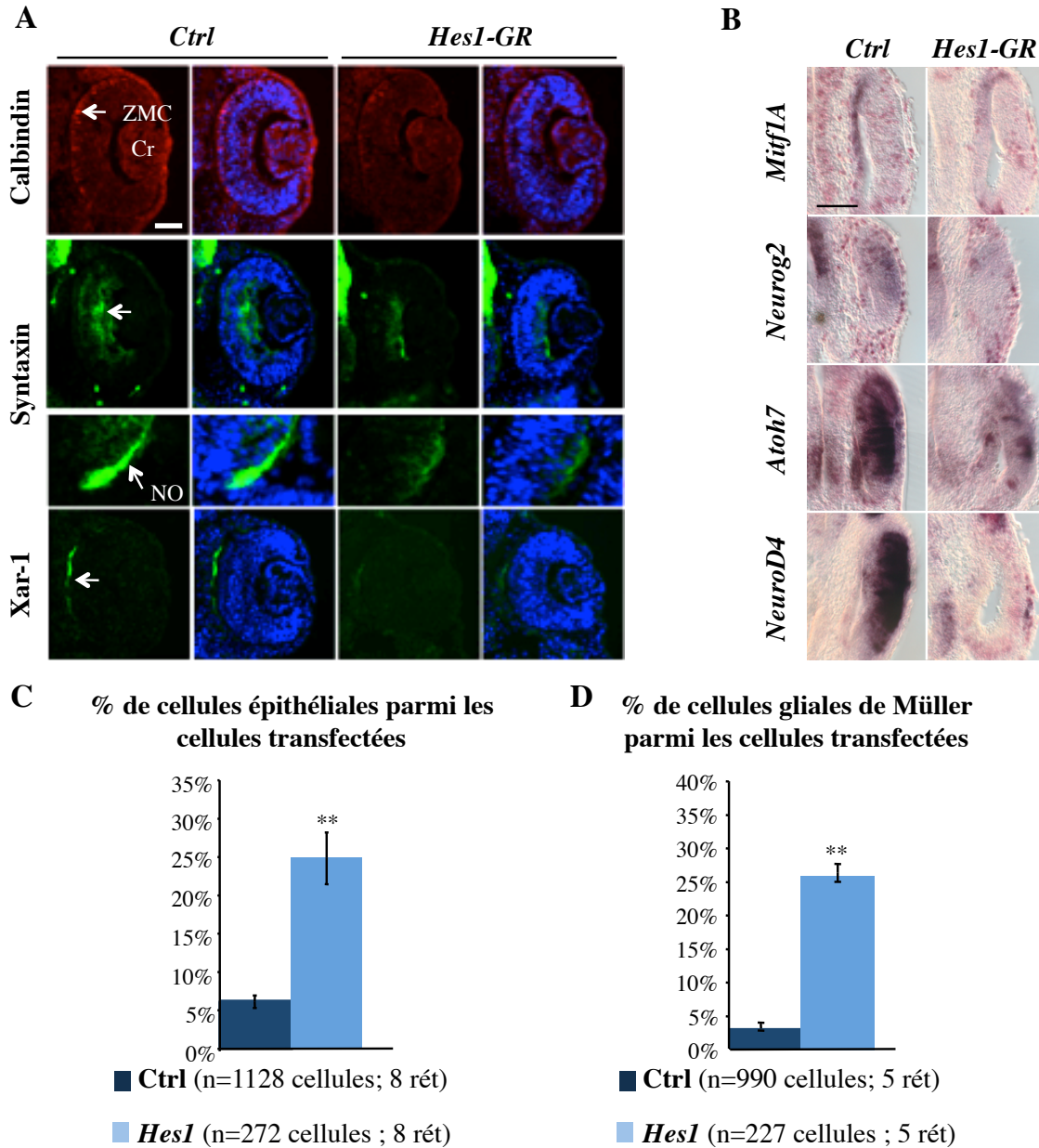


Figure 27 : La surexpression du gène *Hes1* inhibe les destinées neuronales et EPR.

A. Immunomarquage des cellules rétinienne différenciées sur coupes transversales de rétines au stade 37, après injection d'ARNm *Hes1-GR* au stade 2 cellules. Les anticorps utilisés sont : anti-Calbindin (marqueur des photorécepteurs), anti-Syntaxin (marqueur des fibres des cellules amacrine et du nerf optique) et anti-XAR1 (marqueur de l'EPR). Les noyaux sont marqués au Hoechst (bleu). La surexpression de *Hes1-GR* inhibe l'expression des marqueurs des cellules différenciées. **B.** Analyse par hybridation *in situ* au stade 25 de l'expression de *Mitf1A* (marqueur de l'EPR présomptif), *Neurog2*, *Atoh7* et *NeuroD4* (gènes proneuraux), après injection d'ARNm *Hes1-GR* au stade 2 cellules. La surexpression de *Hes1-GR* inhibe l'expression de ces gènes. **C, D.** Analyse de la proportion de cellules neuroépithéliales (C ; stade 39) ou de cellules gliales de Müller (D ; stade 41) parmi les cellules transfectées, après lipofection de *Hes1* au stade 17/18. La surexpression de *Hes1* retarde la différenciation des cellules transfectées qui finissent ultimement par adopter un destin glial au détriment d'une destinée neuronale. Cr: cristallin, NO: nerf optique. (**) $p < 0,01$ (t-test de Student). Échelle: 50 μm .

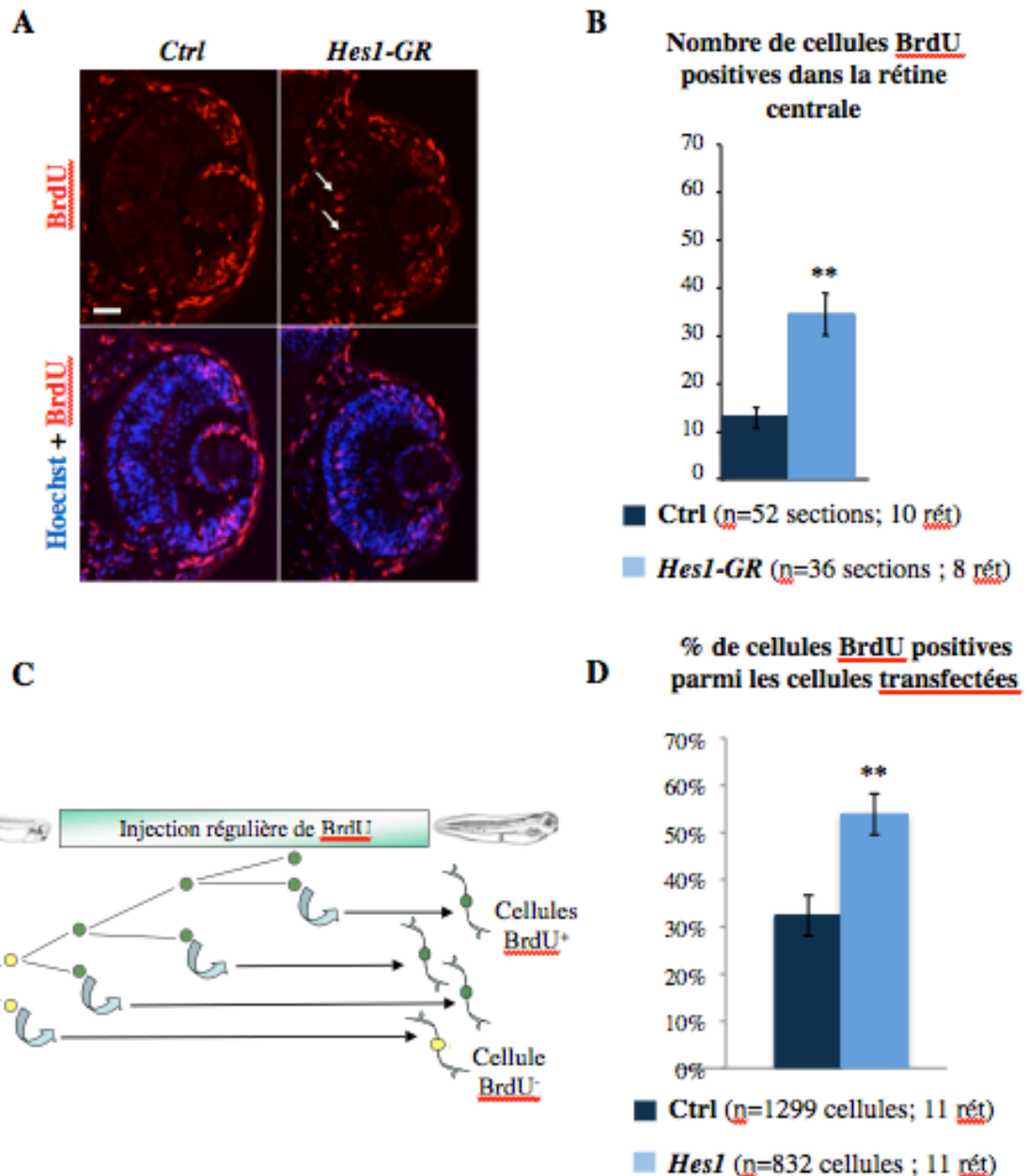


Figure 28 : La surexpression de *Hes1* maintient les précurseurs rétiniens en prolifération.

Immunomarquage anti-BrdU sur coupes de rétines au stade 37, après injection d'ARNm *Hes1-GR* au stade 2 cellules. Les flèches indiquent l'excès de cellules BrdU-positives dans la rétine centrale des embryons *Hes1-GR*. **B.** Quantification correspondante. **C.** Principe de la technique de « birthdating ». Du BrdU est régulièrement injecté dans les embryons lipofectés pendant une période donnée. Toutes les cellules ayant cessé de proliférer avant le début des injections sont négatives pour le BrdU (en jaune). Toutes celles qui quittent le cycle cellulaire après le début des injections sont marquées positivement (en vert). D'après Locker et al. 2006. **D.** Pourcentage de cellules BrdU⁺ parmi les cellules transfectées après lipofection de *Hes1* au stade 17/18 et « birthdating » du stade 32 au stade 41. Ces données montrent que la surexpression de *Hes1* retarde la sortie du cycle des précurseurs rétiniens. (***) $p < 0,01$ (t-test de Student). Échelle: 50 μ m.

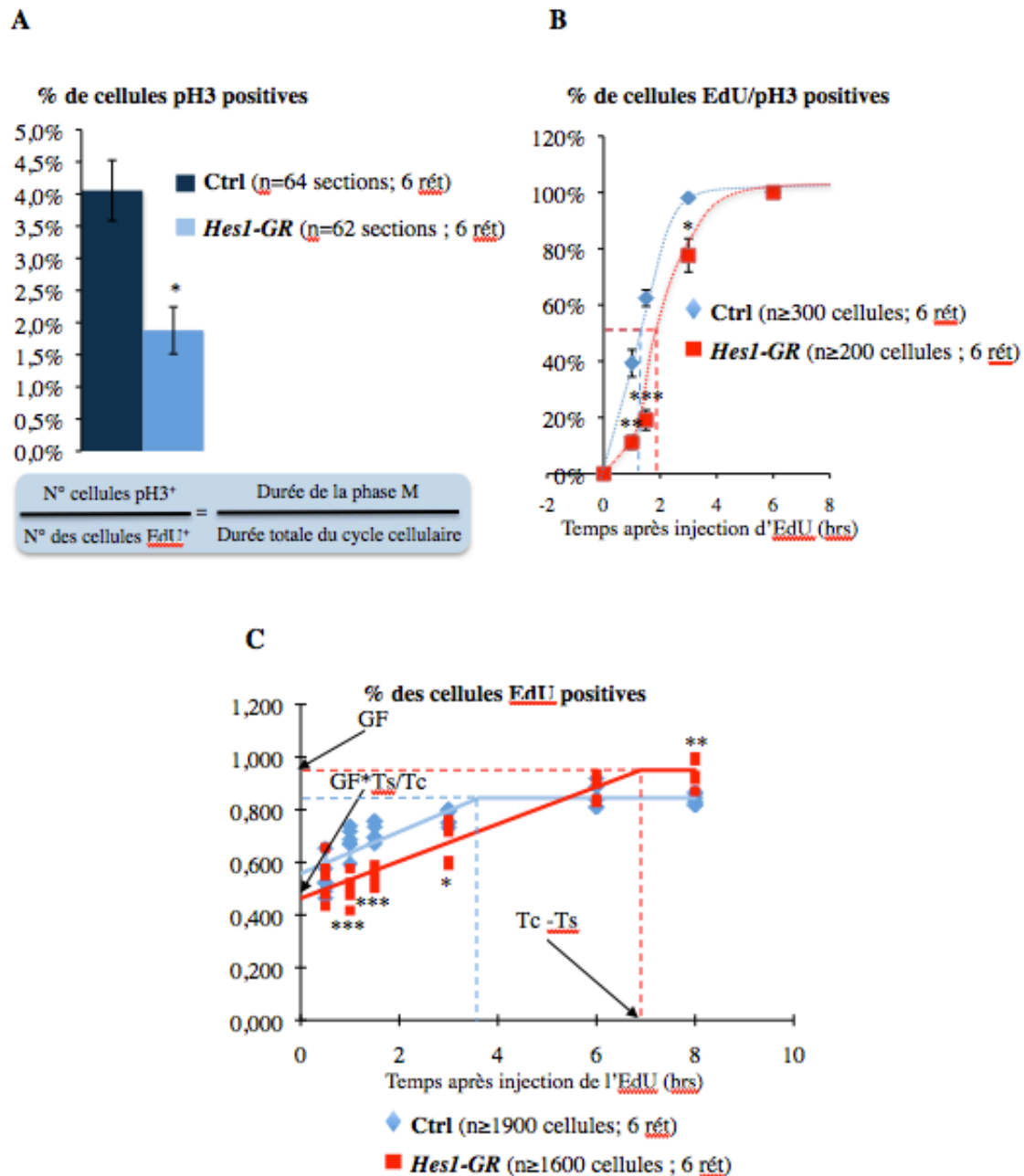


Figure 29 : La surexpression du gène *Hes1* ralentit la vitesse du cycle cellulaire.

A. Quantification du pourcentage de cellules mitotiques (pH3⁺ ; phospho-histone 3) dans le neuroépithélium rétinien au stade 25, après injection d'ARNm *Hes1-GR* au stade 2 cellules. Ce pourcentage est inversement proportionnel à la vitesse du cycle cellulaire et permet de calculer la durée de la phase M grâce à la formule indiquée en dessous de l'histogramme. **B.** Quantification du pourcentage des cellules EdU/pH3⁺ en fonction du temps d'exposition à l'EdU, dans le neuroépithélium rétinien au stade 25 après injection d'ARNm *Hes1-GR* au stade 2 cellules. La durée moyenne de la phase G2 est celle où 50% des cellules sont doublement marquées. **C.** Quantification du pourcentage de noyaux EdU⁺ en fonction du temps d'exposition à l'EdU dans le neuroépithélium rétinien au stade 25 après injection d'ARNm *Hes1-GR* au stade 2 cellules. Cette expérience permet de calculer la durée totale du cycle cellulaire (Tc) et celle de la phase S (Ts) en déterminant les valeurs de (Tc-Ts) et de GF*Ts/Tc (GF ou « growth fraction » est la proportion de cellules prolifératives). (*) p<0,05, (**) p<0,01, (***) p<0,001 (t-test de Student).

	Phases du cycle cellulaire (h)						Growth fraction (% \pm s.e.m)
	Tc-Ts	T _S	T _C	T _{G2}	T _M	T _{G1}	
Ctrl	3,62	7,00	10,62	1,20	0,43	1,99	84,48%
<i>Hes1-GR</i>	6,90	6,56	13,46	1,90	0,25	4,75	95,01%

Tableau 2. Paramètres du cycle cellulaire mesurés dans le neuroépithélium rétinien au stade 25, après injection d'ARNm *Hes1-GR* au stade 2 cellules.

3. Établissement de lignées transgéniques rapportrices de l'expression d'*Hes4*

Nos résultats sur le profil d'expression de *Hes1/4* au cours de la rétino-genèse embryonnaire suggèrent fortement que les cellules situées à la frontière EPR/rétine neurale au stade vésicule optique préfigurent les futures cellules souches adultes. Cependant, cette hypothèse nécessite des études de lignage pour être formellement démontrée.

Nous avons donc décidé de générer des animaux transgéniques rapporteurs de l'activité du promoteur *Hes4*. Une séquence d'environ 500pb du promoteur *Hes4a* a précédemment été publiée et s'est démontrée capable de reproduire le profil d'expression du gène dans les somites (Davis et al., 2001). Afin de vérifier que cette séquence était également suffisante pour reproduire le profil d'*Hes4* pendant la rétino-genèse embryonnaire, nous l'avons clonée en aval de l'eGFP (codant une protéine GFP stable) et de la Turbo-GFP (codant une GFP déstabilisée) et nous avons généré des animaux transgéniques par la technique REMI (Figure 30A). Le taux d'embryons F0 transgéniques pour la construction *promHes4a-eGFP*, sélectionnés grâce à la fluorescence de l'eGFP, s'est avéré assez faible (environ 3% de transgéniques). Ce taux n'a pas été évalué chez les embryons transgéniques *promHes4a-TurboGFP* car nous n'avons pas pu visualiser la fluorescence de cette GFP. Pour tester si le promoteur *Hes4a* est capable de reproduire le profil d'expression d'*Hes4* dans la ZMC post-embryonnaire, nous avons réalisé des hybridations *in situ* avec les sondes *eGFP* et *TurboGFP* sur une dizaine de têtards transgéniques de la génération F0 (Figure 30B). Certains embryons présentent des patrons d'expression différents de celui attendu, y compris dans la rétine,

probablement en raison d' « effets de position » du transgène. Néanmoins, quelques embryons montrent un marquage restreint à la ZMC, bien que plus étendu que celui de *Hes4a* endogène.

Ces résultats sont encourageants mais nécessitent d'être vérifiés et complétés par une analyse sur des individus F1 (les transgènes sont souvent dérégulés en F0). Pour ce faire, nous avons élevé des animaux transgéniques F0 jusqu'à l'âge adulte et les avons croisés avec des animaux sauvages pour produire la génération F1. L'analyse du patron d'expression du transgène au cours de la rétino-genèse a pu être réalisée sur les descendances de deux animaux transgéniques *promHes4a-eGFP*. Chez la première descendance, l'expression du transgène s'est avérée totalement différente de celle de *Hes4* (marquage ubiquitaire dans la rétine aux stades précoces et expression limitée à l'EPR et au cristallin au stade post-embryonnaire; Figure 31A). Chez la deuxième descendance, l'expression embryonnaire du transgène diffère également de celle de *Hes4a*, puisqu'on l'observe dans toute la rétine neurale aux stades vésicule et cupule optique. Cependant, à des stades plus tardifs, elle s'éteint dans la rétine centrale et se confine progressivement, comme celle d'*Hes4*, à la pointe de la ZMC post-embryonnaire (Figure 31B). Il est possible que cette différence de patron d'expression au cours de l'embryogenèse soit liée à la grande stabilité de l'eGFP. Alternativement, la séquence promotrice clonée (seulement 500 pb) n'est peut-être pas suffisante pour reproduire le patron d'expression de *Hes4* au cours de la rétino-genèse embryonnaire.

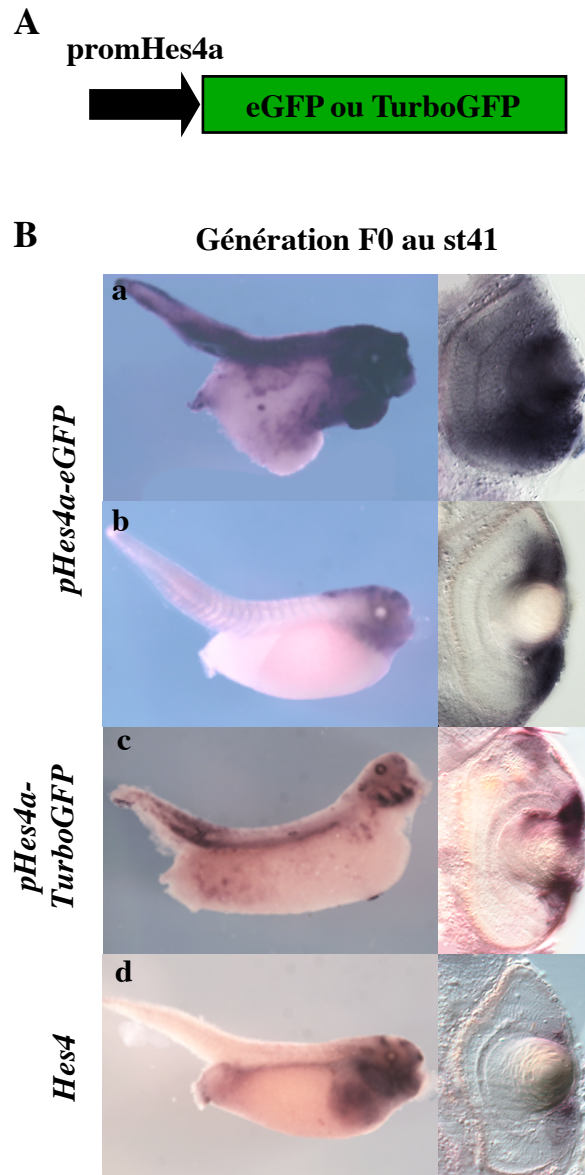


Figure 30 : Analyse des animaux transgéniques rapporteurs de l'activité du promoteur *Hes4a* (génération F0).

A. Schéma simplifié de la construction rapportrice de l'activité du promoteur *Hes4a*. La séquence codante de l'eGFP ou de la TurboGFP est clonée en aval du promoteur *Hes4a* (promHes4). **B.** Analyse comparative par hybridation *in situ* de l'expression de *Hes4*, eGFP et TurboGFP sur des embryons transgéniques *promHes4a-eGFP* (a, b), *promHes4a-TurboGFP* (c) ou sauvages (d) de la génération F0 (vues *in toto* et sur coupes transversales de rétines). Beaucoup d'embryons transgéniques affichent des expressions ubiquitaires du transgène y compris dans la rétine (a). Cependant quelques-uns présentent un marquage spécifique dans la ZMC (b, c), plus au moins similaire à celui de *Hes4* (d). Échelle: 1 mm.

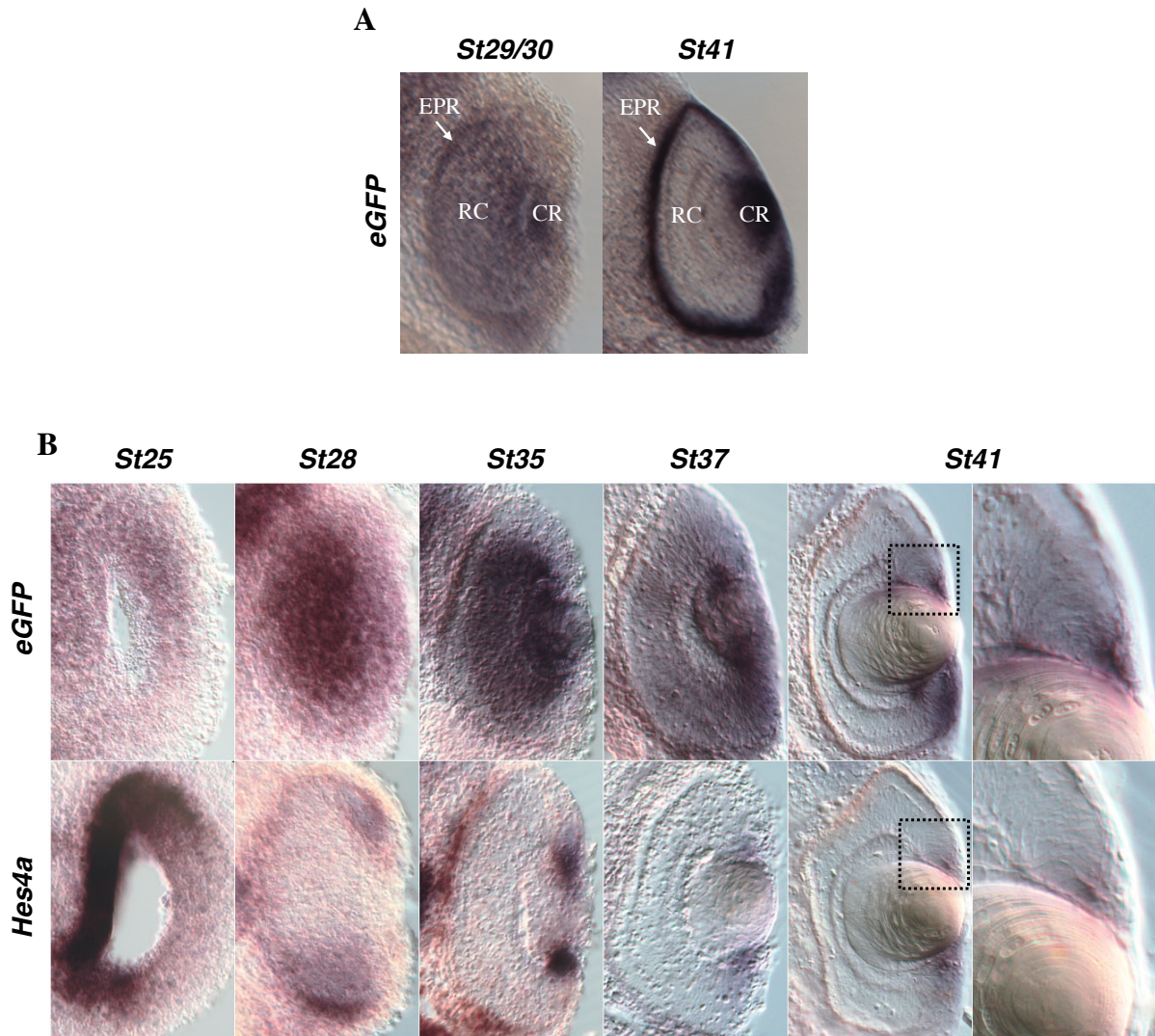


Figure 31 : Analyse des animaux transgéniques rapporteurs de l'activité du promoteur *Hes4a* (génération F1).

Analyse comparative par hybridation *in situ* au cours de la rétino-genèse de l'expression de *Hes4* et *eGFP* sur des embryons transgéniques *promHes4a-eGFP* ou sauvages de la génération F1. **A.** Coupes transversales de rétines d'une descendance transgénique qui présente un patron d'expression aberrant de l'*eGFP*. Au stade 29/30, le transgène s'exprime dans la rétine centrale, dans l'EPR et dans le cristallin. Au stade 41, son expression s'éteint dans la rétine centrale et persiste dans l'EPR et dans le cristallin. **B.** Comparaison dans une autre descendance F1 du profil d'expression de *Hes4* et de celui du transgène *promHes4a-eGFP*. Leurs domaines d'expression ne coïncident pas aux stades précoces de la rétino-genèse (stades 25 à 37), mais sont similaires dans la rétine mature (stade 41 ; expression confinée à la pointe de la ZMC). Cr: Cristallin ; EPR : épithélium pigmenté rétinien ; RC : rétine centrale. Échelle: 50 μ m.

Ces résultats préliminaires en F1 doivent être confirmés. Un doute subsiste quant à la capacité du promoteur à reproduire le patron embryonnaire d'*Hes4* mais il semble qu'il suffise à reproduire son expression dans la rétine mature. Nos animaux transgéniques devraient donc constituer un outil précieux dans un contexte plus général d'étude des cellules souches rétiniennes, en permettant leur visualisation spécifique à des stades post-embryonnaires. Si le transgène s'avère également refléter correctement le profil d'expression de *Hes4* au cours de la rétino-genèse embryonnaire, nous clonerons cette fois une GFP photoconvertible (GFP Kaede) (Scott et al., 2007) en aval du promoteur en vue de réaliser des expériences de lignage.

4. Mise au point d'outils génétiques pour l'étude des gènes *Hes1/4* dans les cellules souches adultes

L'expression des gènes *Hes1/4* dans les cellules souches de la ZMC suggère un rôle potentiel de ces gènes dans la régulation de leurs propriétés spécifiques comme leur capacité d'auto-renouvellement, leur taux de prolifération et leur multipotence. Pour tester cette hypothèse, il est indispensable de pouvoir réaliser des expériences de gain et de perte de fonction à des stades post-embryonnaires sans perturber l'embryogenèse. Nous avons donc entamé la mise au point d'outils génétiques de transgénèse conditionnelle.

(i) Stratégie générale

L'équipe de Stefan Hopler a mis au point une méthode simple de surexpression conditionnelle qui repose sur l'utilisation du promoteur Hsp70, inductible par choc thermique (Wheeler et al., 2000). L'idée était donc de cloner sous contrôle de ce promoteur les différents ADNc codant les protéines Hes1, Hes4 ou leurs formes antimorphes (fusionnées au domaine transactivateur de la transcription de la protéine VP16).

(ii) Clonage des différentes constructions

Afin d'éviter toute fuite potentielle au cours du développement embryonnaire, nous avons décidé de réaliser des constructions *Hsp70-Hes1/4* fusionnées à la séquence codante du récepteur aux glucocorticoïdes. On obtient alors un double niveau de contrôle : transcriptionnel par choc thermique et post-traductionnel par ajout de la dexamétasone (ligand du récepteur

aux glucocorticoïdes). Chaque plasmide contient également un autre cistron plaçant la séquence codante de la GFP sous contrôle d'un deuxième promoteur Hsp70, de manière à pouvoir sélectionner les individus transgéniques après choc thermique. Les constructions suivantes ont été réalisées : *Hsp70-Hes1/4*, *Hsp70-Hes1/4-GR* et *Hsp70-Hes4-VP16-GR* (Figure 32 et annexe III).

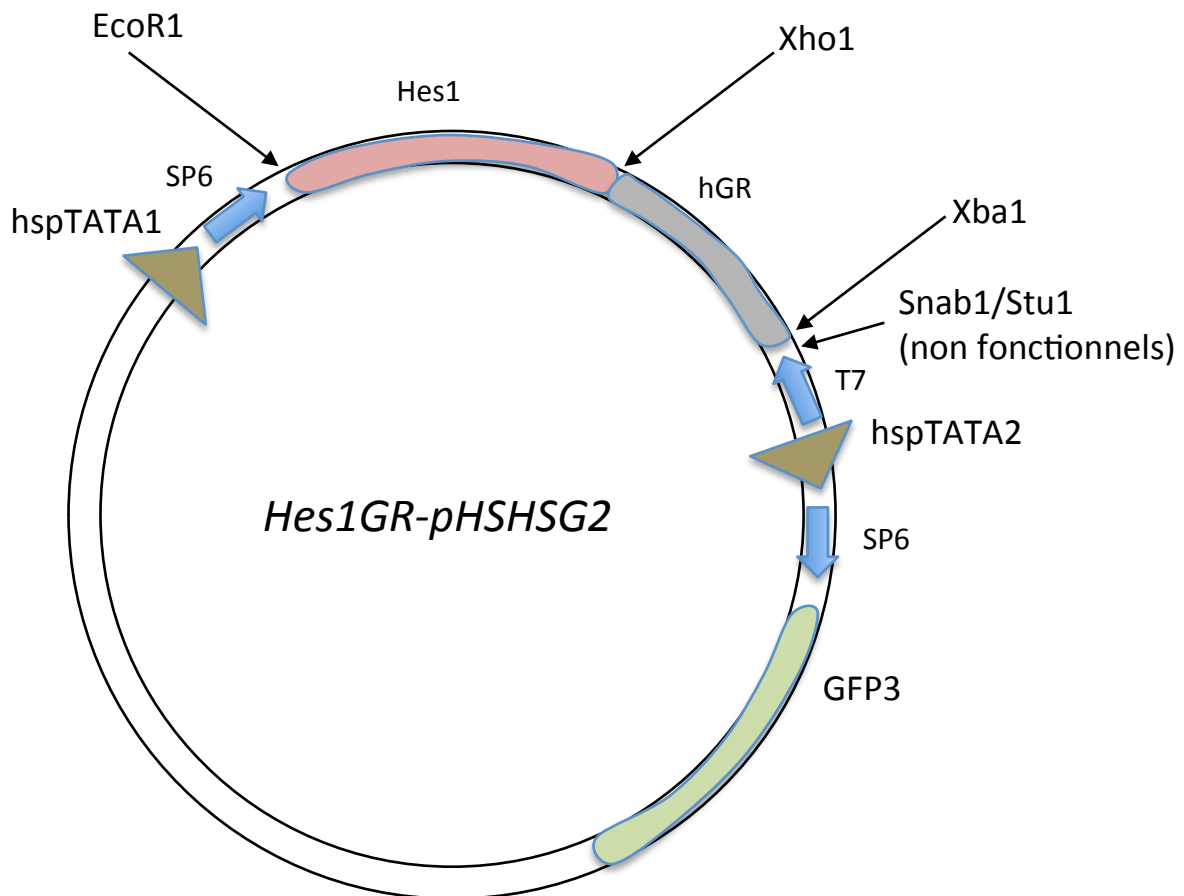


Figure 32 : Carte du plasmide *Hes1GR-pHSHSG2*.

Hsp : promoteur « Heat shock » ; hGR : domaine de liaison au ligand du récepteur aux glucocorticoïdes humain.

(iii) Mise au point des conditions de choc thermique à des stades post-embryonnaires

Weeler et collaborateurs ont mis au point un protocole de choc thermique à des stades précoces du développement embryonnaire. Il était donc nécessaire dans un premier temps d'adapter leur protocole chez le têtard et de vérifier l'expression effective du transgène dans la ZMC. Pour cela nous avons généré des embryons transgéniques avec deux constructions contrôle *Hsp70-GFP* et *Hsp70-Wnt8-Hsp-GFP* (Wheeler et al., 2000). Cette dernière permet

une surexpression du ligand Wnt8b et devait nous permettre de reproduire des résultats obtenus par d'autres biais au laboratoire, montrant que la suractivation de la voie Wnt induit une augmentation de l'expression du gène *CyclinD1* dans la ZMC (Denayer et al., 2008).

Nous avons dans un premier temps testé sur nos têtards les conditions décrites dans l'article de Wheeler, soit 3 à 4 chocs thermiques successifs de 30 min à 37°C avec un intervalle de 30 min à 16°C (Wheeler et al., 2000). Les résultats ont montré qu'une grande proportion d'embryons n'avait pas supporté le choc thermique et que l'expression du transgène n'avait pas été induite chez les quelques survivants. Cela suggère que ce choc thermique n'est pas suffisant pour induire l'activité du promoteur Hsp70 et que la température d'incubation est néfaste pour les têtards déjà fragilisés par la transgénèse. Nous avons donc décidé de modifier le protocole (Figure 33A) en rallongeant le temps d'incubation à 45 min mais en diminuant la température à 34°C. Cette stratégie s'est avérée payante, permettant un taux de survie plus élevé des têtards (Figure 33B) et, 24h après le traitement, une expression ubiquitaire de la GFP y compris dans la ZMC (Figure 33 C, D). Cependant, l'analyse de l'expression de *CyclinD1* n'a pas montré d'effet significatif de la construction *Hsp70-Wnt8-Hsp-GFP* comparée à *Hsp70-GFP*. Ceci est dû probablement au nombre trop faible d'embryons analysés.

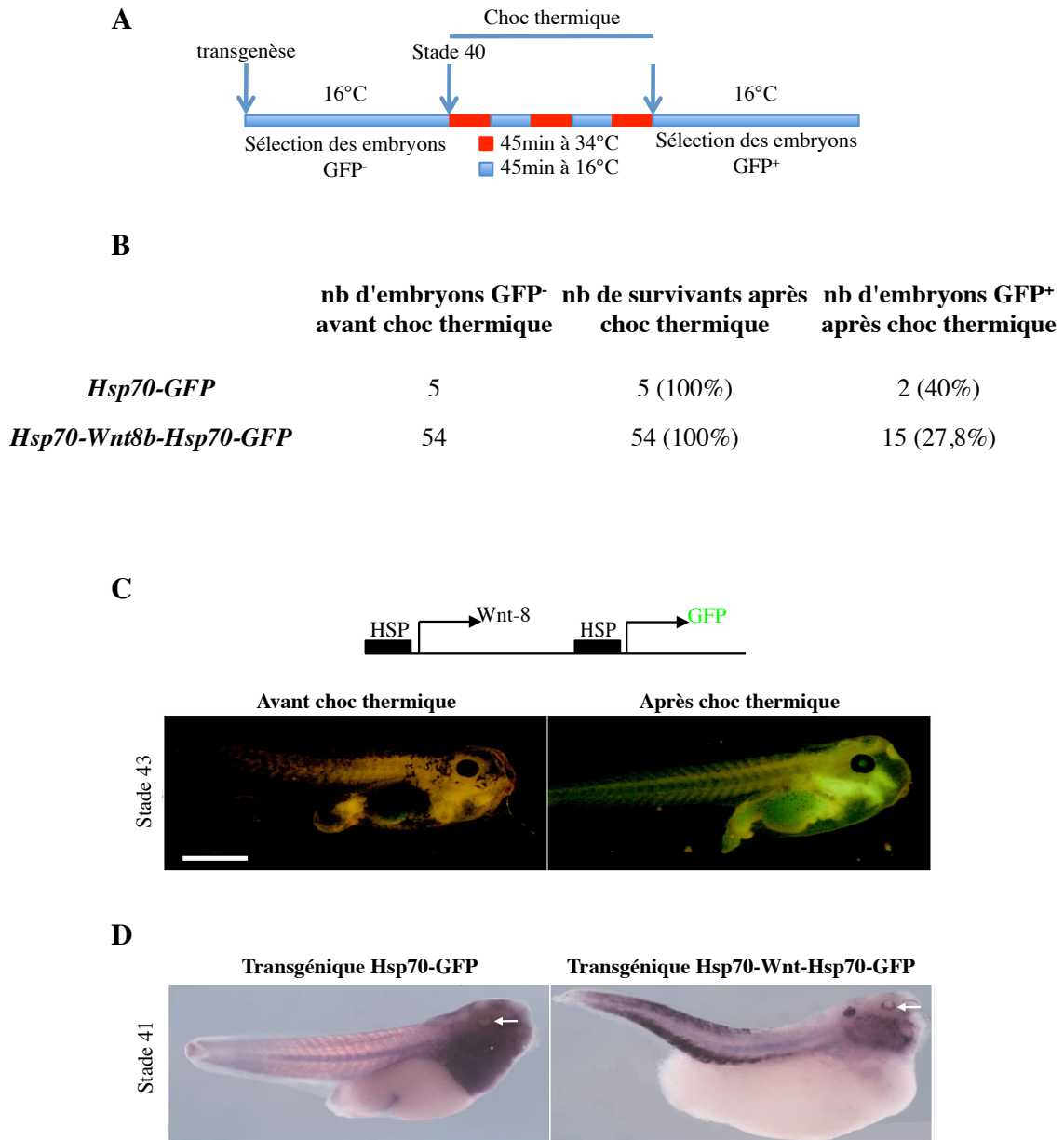


Figure 33 : Mise au point de l'expression inductible d'un transgène par choc thermique chez le têtard.

A. Schéma expérimental. **B.** Quantification du nombre de têtards GFP⁻ et GFP⁺ avant et après choc thermique ainsi que du taux de survie. **C.** Exemple de têtard transgénique F0 *Hsp70-Wnt8-Hsp-GFP* avant (GFP⁻) et après choc thermique (GFP⁺). La fluorescence de la GFP indique l'expression du transgène qui semble ubiquitaire. **D.** Analyse par hybridation *in situ* de l'expression de la GFP après choc thermique, dans des têtards transgéniques F0 *Hsp70-GFP* ou *Hsp70-Wnt8-Hsp-GFP*. Les flèches indiquent la présence possible de marquage dans la ZMC. Échelle : 1,3mm.

Bien que ce protocole doive encore être amélioré, ces résultats sont encourageants et ouvrent la porte à l'étude fonctionnelle par transgénèse conditionnelle de *Hes1/4* dans les cellules souches adultes de la ZMC.

IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Notre étude soulève pour la première fois la question de l'ontogenèse des cellules souches rétiniennes adultes et propose un rôle des répresseurs transcriptionnels *Hes1/4* dans leur maintien à l'état souche (indifférencié et en prolifération lente) pendant la rétino-genèse. Nos analyses fonctionnelles convergent vers un modèle selon lequel *Hes1/4* contribueraient à protéger une sous-population cellulaire des signaux de différenciation/sortie de cycle à l'œuvre au cours du développement, permettant ainsi la constitution d'un pool de cellules souches adultes.

1. Les gènes *Hes1/4* : des outils pour comprendre l'ontogenèse des cellules souches rétiniennes adultes.

L'analyse rétrospective, au cours de la rétino-genèse embryonnaire, de la dynamique d'expression de marqueurs des cellules souches adultes de la ZMC, notamment *Hes1/4*, *Id2* et *Wnt8b*, suggère que ces cellules proviennent d'une partie de la vésicule optique située à la frontière entre l'EPR présumé et la rétine neurale. Cette hypothèse va à l'encontre d'une idée classique selon laquelle les cellules souches rétiniennes occuperaient initialement toute la rétine neurale de la vésicule optique puis ne persisteraient qu'en périphérie au fur et à mesure de l'histogenèse rétinienne. Nos résultats suggèrent à l'inverse qu'elles seraient déjà ségréguées des lignages EPR et rétine neurale au stade vésicule optique. Pour conforter cette hypothèse, nous envisageons d'analyser l'expression des nouveaux marqueurs de cellules souches identifiés *via* notre crible par hybridation *in situ* à grande échelle (Parain et al., 2011).

Par ailleurs, nous avons généré des gènes rapporteurs de l'expression de *Hes4* en utilisant une séquence promotrice de 500pb précédemment décrite dans la littérature (Davis et al., 2001). L'idée était de voir si cette séquence suffisait à reproduire le profil d'expression de *Hes4* au cours de la rétino-genèse embryonnaire pour pouvoir le cas échéant en faire un outil pour des études de lignage. Nos premières analyses sur des animaux transgéniques suggèrent pour le moment que ce n'est pas le cas, bien que ce promoteur reproduise très bien le patron de *Hes4* dans la ZMC mature. Il est possible que l'expression aberrante du transgène observée au cours du développement soit due à des dérégulations liées à des effets de position. Pour éviter ces effets nous avons généré des animaux transgéniques avec des constructions qui

cette fois sont insulées et nous devons désormais cribler leur descendance F1. Si le transgène s'avère refléter correctement le profil d'expression de *Hes4* au cours de la rétino-genèse, nous clonerons cette fois le promoteur en amont d'une GFP photoconvertible Kaede (Scott et al., 2007), en vue de réaliser des expériences de lignage.

Une autre stratégie est de réaliser ces expériences chez le poisson zèbre, dont le temps de génération est beaucoup plus court et pour lequel les outils génétiques de lignage, comme le système Cre-LoxP inductible, sont bien plus au point que chez le xénope.

2. Les gènes *Hes1/4* : des gènes requis pour la maintenance d'un pool de cellules souches au cours de la rétino-genèse embryonnaire ?

Nos résultats montrent que la surexpression des gènes *Hes1/4* confèrent aux cellules rétinienne des caractéristiques « souches » : programmes de différenciation EPR et neuronal inhibés, maintien à l'état prolifératif et division lente. Cependant, nous n'avons pas été en mesure de démontrer formellement que c'était bien là leur rôle endogène dans les cellules souches embryonnaires. En effet, leur perte de fonction par injection de Morpholinos au stade 8 cellules provoque des défauts de formation de l'œil et une apoptose massive incompatibles avec une analyse fonctionnelle fine au niveau cellulaire. Pour confirmer notre modèle, il est désormais nécessaire de mettre au point des techniques permettant de les invalider à des stades plus avancés de la rétino-genèse. Ceci est potentiellement réalisable par lipofection/électroporation de Morpholinos ou de constructions dominantes négatives, en ciblant la région proximo-dorsale de la vésicule optique où ces deux gènes s'expriment. Nos quelques essais en ce sens n'ont pas été très concluants mais méritent d'être poursuivis. On peut également envisager de générer des animaux transgéniques permettant l'expression de RNAi ou de dominants négatifs sous contrôle du promoteur Hsp70. Nous avons déjà cloné une batterie de constructions de ce type, que nous pensons également utiliser pour étudier le rôle de *Hes1/4* dans la ZMC post-embryonnaire.

3. Comment les facteurs *Hes1/4* contrôlent-ils les propriétés prolifératives des cellules souches rétinienne présumptives ?

Nos résultats montrent que la surexpression de *Hes1/4* ralentit la vitesse du cycle cellulaire des précurseurs rétinien en rallongeant la durée de la phase G2 et plus particulièrement celle de la phase G1. Ces données montrent pour la première fois *in vivo* que ces gènes constituent des régulateurs de la cinétique de division. Il serait donc intéressant de

tester si c'est le cas dans d'autres types cellulaires et notamment dans les cellules des frontières, comme l'isthme ou la Zli, qui expriment *Hes1* à taux élevé et non oscillant et sont caractérisées par une prolifération lente en comparaison des cellules progénitrices des compartiments adjacents (Baek et al., 2006). La question qui se pose maintenant est de savoir comment les facteurs Hes1/4 affectent la vitesse de prolifération. Parmi leurs cibles potentielles figurent des composants du cycle cellulaire. Il a en effet été montré que la surexpression de *Hes1* dans des précurseurs neuraux inhibait l'expression de *CyclinD1* et *CyclinE2* et causait en conséquence un retard de transition G1/S (Shimojo et al., 2008).

Il a récemment été proposé que des régulateurs spécifiques du cycle cellulaire pouvaient être recrutés dans les cellules pour modifier leur dynamique de division et influencer ainsi la décision entre prolifération et différenciation. En effet, une étude réalisée au cours du développement de la moelle épinière chez le poulet montre que les cellules à divisions neurogéniques et exprimant *cdc25a* et *cdc25b* (gènes codant des phosphatases impliquées dans la transition G2/M) ont une phase G2 plus courte que les cellules à divisions prolifératives exprimant uniquement *cdc25a* (Peco et al., 2012). En outre, l'invalidation de *cdc25b* engendre un allongement spécifique de la phase G2 associé à une réduction de la production neuronale. Cet exemple illustre comment des différences qualitatives dans l'expression de régulateurs du cycle influent sur le devenir des cellules. Il est donc tentant de spéculer que les effets de Hes1/4 sur la vitesse de division des cellules souches rétinienne pourraient ne pas reposer uniquement sur l'inhibition de composants du cycle (effet quantitatif) mais également sur la favorisation de l'expression de certains régulateurs par rapport à d'autres (effet qualitatif). Parmi les candidats figure le gène codant la Cycline D2, qui présente dans le champ optique au stade neurula un profil d'expression semblable à celui de *Hes4* (limité à sa région proximo-dorsale), contrairement au gène codant la Cycline D1 qui marque quant à lui tout le champ optique (Vernon and Philpott, 2003).

4. Les gènes *Hes1/4* sont-ils des cibles clefs des interactions Wnt/Hedgehog dans le contrôle des cellules souches rétinienne ?

Le gène *Hes4/XHair2* contient des sites de fixation à RBP-J dans son promoteur (Davis and Turner, 2001), et il est, dans certains contextes, activable par la voie Notch (Davis and Turner, 2001) ; (Taelman et al., 2006). Le promoteur du gène *Hes1/XHair1* n'a quant à lui pas été décrit chez le xénope, mais il présente ces mêmes caractéristiques chez la souris (Jarriault et al., 1995) ; (Jarriault et al., 1998). Nous avons montré que l'expression des gènes

Hes1/4 dans la ZMC en formation et post-embryonnaire n'est pas sensible à une inhibition de la signalisation Notch pendant 24h. Il est donc peu probable qu'ils constituent des cibles directes de la voie dans cette région. Ces résultats sont cohérents avec des études réalisées chez la souris et le poulet, montrant que ces gènes peuvent avoir des rôles indépendants de la voie Notch dans le développement de la rétine (Kubo and Nakagawa, 2009) ; (Wall et al., 2009). Cependant, il doit être noté que l'expression de *Hes4* est fortement diminuée après 48h de traitement au DAPT du stade 25 au stade 39, alors que celle de *Hes1* reste inchangée (Figure S5 du papier et Figure 24). Nous ne pouvons donc exclure que la voie Notch exerce quand même un effet indirect sur *Hes4*. Alternativement, il est possible que cette diminution d'*Hes4* reflète une déplétion du pool de cellules souches. Un tel effet consécutif à l'inactivation de la voie Notch a en effet été montré dans divers tissus et en particulier dans le cerveau adulte (Imayoshi and Kageyama, 2011) ; (Ehm et al., 2010) ; (Chapouton et al., 2010). Comme *Hes1* semble également marquer les jeunes progéniteurs de la ZMC en plus des cellules souches, nous ne savons pas si ces dernières sont toujours présentes dans les rétines traitées 48h au DAPT. Il serait donc intéressant de tester l'expression d'autres marqueurs spécifiques des cellules souches (*Gli3* et *Id2* par exemple) ; (Perron et al., 2003) ; (Borday et al., 2012). En outre, nous ne savons pas si d'éventuels ligands et récepteurs de la voie Notch s'expriment dans les cellules souches de la ZMC. Clairement, le profil d'expression de *Notch1/Delta1* et celui de *Hes4* y sont mutuellement exclusifs (expression dans les progéniteurs *versus* dans les cellules souches). Cependant, d'autres couples (*Notch3/Jagged* par exemple) pourraient y être exprimés comme c'est le cas dans la rétine périphérique des rongeurs par rapport à la rétine centrale (Bao and Cepko, 1997) ; (Lindsell et al., 1996).

La voie de signalisation Wnt semble quant à elle positivement réguler les gène *Hes1/4*. Ces résultats concordent avec des données obtenues dans la rétine du poulet, où *c-Hairy1* est requis en aval de la voie Wnt pour la maintenance des précurseurs de la ZMC à l'état indifférencié. L'analyse du promoteur de *c-Hairy1* a en outre révélé que des sites de fixation au facteur TCF/Lef étaient présents mais non nécessaires à l'activation du gène par la voie. Les auteurs proposent que l'effet de cette dernière sur l'expression de *c-Hairy1* serait médié par l'activation de multiples gènes cibles dont *c-myc* (Kubo and Nakagawa, 2009). Ainsi, il est possible qu'une cascade similaire (Wnt-*c-Myc-Hes1/4*) maintienne les cellules souches rétiniennes en prolifération et prévienne leur différenciation au cours de l'embryogenèse chez le xénope. Dans la rétine périphérique chez la souris et le poisson zèbre, l'activation de la voie Wnt a pour conséquence de diminuer la cinétique de prolifération (Liu et al., 2007) ;

(Stephens et al., 2010). Il est donc tentant de spéculer que cette dernière limiterait également, *via Hes4*, la vitesse de prolifération des cellules souches.

Nous avons très récemment montré que les voies Wnt et Hedgehog ont des fonctions opposées sur la prolifération des cellules de la ZMC post-embryonnaire et qu'elles s'antagonisent mutuellement dans cette région (Borday et al., 2012). Sur la base de ces données, de nos résultats antérieurs (Locker et al., 2006) ; (Denayer et al., 2008) et du profil d'expression de leurs ligands respectifs (Figure 13), nous proposons que la voie Wnt serait essentielle à la maintenance d'un pool de cellules souches adultes et que la signalisation Hedgehog contrebalancerait son action pour entrainer régulièrement certaines d'entre elles dans le processus de différenciation (Borday et al., 2012). L'observation d'une régulation positive de *Hes4* par Wnt et négative par Hedgehog suggère que cet antagonisme fonctionnel des voies pourrait être mis en place dès les stades précoces de l'embryogenèse rétinienne. Notons qu'il est possible dans ce cas que la régulation négative de *Hes4* par la voie Hedgehog puisse n'être que le résultat de l'inhibition qu'elle exerce sur l'activité de la voie Wnt. Il est donc maintenant nécessaire d'analyser précisément les fonctions de Wnt et Hedgehog sur le pool de cellules souches rétiniennes embryonnaires et de déterminer si *Hes4* est requis en aval de ces voies.

De façon troublante, nous avons constaté que *Hes1*, contrairement à *Hes4* est fortement activé par la voie Hedgehog. Ces résultats rappellent la situation observée chez la souris où Dana S. Wall et collaborateurs ont montré que Shh induisait directement, *via* son effecteur Gli2, l'expression de *Hes1* (Wall et al., 2009). Nous avons constaté que *Hes1*, en plus de son expression dans les cellules souches, semble aussi actif dans les progéniteurs précoces du neuroépithélium de la vésicule optique comme de la ZMC (Figure 22). Il pourrait donc y médier certains des effets d'Hedgehog sur ces derniers. Cependant cette hypothèse est difficilement réconciliable avec le fait établi qu'Hedgehog accélère les divisions des précurseurs rétiniens et les pousse vers la sortie de cycle alors qu'*Hes1* semble avoir des effets strictement opposé. Cela nous amène donc à postuler que l'effet d'Hedgehog sur *Hes1* contribuerait à une boucle de rétroaction négative exercée par les précurseurs sur leur propre comportement prolifératif. Il ne s'agit là cependant que de spéculations et tout ceci mérite de plus amples investigations.

5. Quels modes d'action, partenaires et interactants pour les facteurs Hes1/4 ?

Pour accomplir leurs fonctions, les protéines bHLH-O interagissent entre elles pour former des dimères actifs qui se fixent sur les promoteurs des gènes cibles et inhibent leur transcription en recrutant des co-represseurs (Groucho/TLE). Elles peuvent aussi physiquement interagir avec d'autres protéines à domaine bHLH pour inhiber leur fonction en formant des dimères non fonctionnels. Ainsi, il a pu être montré qu'un domaine de fixation à l'ADN intact était nécessaire à la fonction de Hes4/XHairy2 dans la survie des précurseurs des crêtes neurales mais dispensable pour son rôle dans la prolifération (Nichane et al., 2008b). Il sera donc intéressant dans notre système de voir si les effets de Hes1/4 sur la survie, l'inhibition des programmes de différenciation, le maintien de la prolifération et la cinétique de division peuvent être également découplés, *via* la surexpression de constructions *Hes1/4-DBM* (codant des protéines incapables de se lier à l'ADN).

Les gènes *Id* codent des protéines à domaine HLH, connues pour antagoniser les facteurs de transcription bHLH (Norton, 2000) ; Yokota et al. 2001). La protéine Hes1 interagit avec les quatre membres de la famille Id (Id1 à 4) ; (Jogi et al., 2002) ; (Bai et al., 2007). Il a également été montré que la protéine Id3 interagissait physiquement avec Hes4/XHairy2 et régulait négativement son activité dans les crêtes neurales chez le xénope (Nichane et al., 2008a). Enfin, Bai et collaborateurs ont montré que l'interaction Id/Hes1 dans le cerveau postérieur chez le poulet empêche Hes1 de réprimer sa propre transcription sans interférer avec sa capacité d'inhiber l'expression de ses autres gènes cibles. Une telle interaction permet l'obtention d'un niveau élevé d'expression de *Hes1* et le maintien consécutif des précurseurs neuraux à l'état indifférencié (Bai et al., 2007). Comme je l'ai souligné auparavant, nous avons mis en évidence que le gène *Id2* constituait, comme *Hes1/4*, un marqueur des cellules souches rétinienne et présentait le même profil d'expression au cours de la rétino-genèse. Nous envisageons donc de tester la coopération de ces facteurs dans le contrôle de la prolifération des cellules souches rétinienne.

V. BIBLIOGRAPHIE

Abdouh, M. and 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.

Agathocleous, M. and Harris, W. A. (2009). From progenitors to differentiated cells in the vertebrate retina. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**, 45-69.

Agathocleous, M., Locker, M., Harris, W. A. and Perron, M. (2007). A general role of hedgehog in the regulation of proliferation. *Cell Cycle* **6**, 156-9.

Ahmad, I., Das, A. V., James, J., Bhattacharya, S. and Zhao, X. (2004). Neural stem cells in the mammalian eye: types and regulation. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 53-62.

Ahmad, I., Tang, L. and Pham, H. (2000). Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun* **270**, 517-21.

Akagi, T., Mandai, M., Ooto, S., Hiram, Y., Osakada, F., Kageyama, R., Yoshimura, N. and Takahashi, M. (2004). Otx2 homeobox gene induces photoreceptor-specific phenotypes in cells derived from adult iris and ciliary tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 4570-5.

Alexiades, M. R. and Cepko, C. (1996). Quantitative analysis of proliferation and cell cycle length during development of the rat retina. *Dev Dyn* **205**, 293-307.

Alexson, T. O., Hitoshi, S., Coles, B. L., Bernstein, A. and 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.

Ali, F., Hindley, C., McDowell, G., Deibler, R., Jones, A., Kirschner, M., Guillemot, F. and Philpott, A. (2011). Cell cycle-regulated multi-site phosphorylation of Neurogenin 2 coordinates cell cycling with differentiation during neurogenesis. *Development* **138**, 4267-77.

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.

Andreazzoli, M. (2009). Molecular regulation of vertebrate retina cell fate. *Birth Defects Res C Embryo Today* **87**, 284-95.

Andreazzoli, M., Gestri, G., Cremisi, F., Casarosa, S., Dawid, I. B. and Barsacchi, G. (2003). Xrx1 controls proliferation and neurogenesis in *Xenopus* anterior neural plate. *Development* **130**, 5143-54.

Apelqvist, A., Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D. J., Honjo, T., Hrabe de Angelis, M., Lendahl, U. and Edlund, H. (1999). Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* **400**, 877-81.

Arai, Y., Pulvers, J. N., Haffner, C., Schilling, B., Nusslein, I., Calegari, F. and Huttner, W. B. (2011). Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nat Commun* **2**, 154.

Asami, M., Sun, G., Yamaguchi, M. and Kosaka, M. (2007). Multipotent cells from mammalian iris pigment epithelium. *Dev Biol* **304**, 433-46.

Ashery-Padan, R., Marquardt, T., Zhou, X. and Gruss, P. (2000). Pax6 activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye. *Genes Dev* **14**, 2701-11.

Austin, C. P., Feldman, D. E., Ida, J. A., Jr. and Cepko, C. L. (1995). Vertebrate retinal ganglion cells are selected from competent progenitors by the action of Notch. *Development* **121**, 3637-50.

Bae, S., Bessho, Y., Hojo, M. and Kageyama, R. (2000). The bHLH gene Hes6, an inhibitor of Hes1, promotes neuronal differentiation. *Development* **127**, 2933-43.

Bae, Y. K., Shimizu, T. and Hibi, M. (2005). Patterning of proneuronal and inter-proneuronal domains by hairy- and enhancer of split-related genes in zebrafish neuroectoderm. *Development* **132**, 1375-85.

Baek, J. H., Hatakeyama, J., Sakamoto, S., Ohtsuka, T. and Kageyama, R. (2006). Persistent and high levels of Hes1 expression regulate boundary formation in the developing central nervous system. *Development* **133**, 2467-76.

Bai, G., Sheng, N., Xie, Z., Bian, W., Yokota, Y., Benezra, R., Kageyama, R., Guillemot, F. and Jing, N. (2007). Id sustains Hes1 expression to inhibit precocious neurogenesis by releasing negative autoregulation of Hes1. *Dev Cell* **13**, 283-97.

Bailey, A. M. and Posakony, J. W. (1995). Suppressor of hairless directly activates transcription of enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes Dev* **9**, 2609-22.

Bao, Z. Z. and Cepko, C. L. (1997). The expression and function of Notch pathway genes in the developing rat eye. *J Neurosci* **17**, 1425-34.

Barrantes, I. B., Elia, A. J., Wunsch, K., Hrabe de Angelis, M. H., Mak, T. W., Rossant, J., Conlon, R. A., Gossler, A. and de la Pompa, J. L. (1999). Interaction between Notch signalling and Lunatic fringe during somite boundary formation in the mouse. *Curr Biol* **9**, 470-80.

Basak, O., Giachino, C., Fiorini, E., Macdonald, H. R. and Taylor, V. (2012). Neurogenic subventricular zone stem/progenitor cells are Notch1-dependent in their active but not quiescent state. *J Neurosci* **32**, 5654-66.

Bassett, E. A. and Wallace, V. A. (2012). Cell fate determination in the vertebrate retina. *Trends Neurosci.*

Baumer, N., Marquardt, T., Stoykova, A., Spieler, D., Treichel, D., Ashery-Padan, R. and Gruss, P. (2003). Retinal pigmented epithelium determination requires the redundant activities of Pax2 and Pax6. *Development* **130**, 2903-15.

Belliveau, M. J. and Cepko, C. L. (1999). Extrinsic and intrinsic factors control the genesis of amacrine and cone cells in the rat retina. *Development* **126**, 555-66.

Berson, E. L. (1993). Retinitis pigmentosa. The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34**, 1659-76.

Bessho, Y., Hirata, H., Masamizu, Y. and Kageyama, R. (2003). Periodic repression by the bHLH factor Hes7 is an essential mechanism for the somite segmentation clock. *Genes Dev* **17**, 1451-6.

Bessho, Y., Sakata, R., Komatsu, S., Shiota, K., Yamada, S. and Kageyama, R. (2001). Dynamic expression and essential functions of Hes7 in somite segmentation. *Genes Dev* **15**, 2642-7.

Bharti, K., Liu, W., Csermely, T., Bertuzzi, S. and Arnheiter, H. (2008). Alternative promoter use in eye development: the complex role and regulation of the transcription factor MITF. *Development* **135**, 1169-78.

Bharti, K., Nguyen, M. T., Skuntz, S., Bertuzzi, S. and Arnheiter, H. (2006). The other pigment cell: specification and development of the pigmented epithelium of the vertebrate eye. *Pigment Cell Res* **19**, 380-94.

Bier, E., Vaessin, H., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1992). deadpan, an essential pan-neural gene in Drosophila, encodes a helix-loop-helix protein similar to the hairy gene product. *Genes Dev* **6**, 2137-51.

Bigas, A. and Espinosa, L. (2012). Hematopoietic stem cells: to be or Notch to be. *Blood* **119**, 3226-35.

Bilitou, A. and 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.

Bonev, B., Pisco, A. and Papalopulu, N. (2011). MicroRNA-9 reveals regional diversity of neural progenitors along the anterior-posterior axis. *Dev Cell* **20**, 19-32.

Bonev, B., Stanley, P. and Papalopulu, N. (2012). MicroRNA-9 Modulates Hes1 Ultradian Oscillations by Forming a Double-Negative Feedback Loop. *Cell Reports* **2**, 10-18.

Borday, C., Cabochette, P., Parain, K., Mazurier, N., Janssens, S., Tran, H., Sekkali, B., Bronchain, O., Vleminckx, V., Locker, M. et al. (2012). Antagonistic cross-regulation between Wnt and Hedgehog signalling pathways controls post-embryonic retinal proliferation. *Development* **In press**.

Boucher, S. E. and Hitchcock, P. F. (1998). Insulin-related growth factors stimulate proliferation of retinal progenitors in the goldfish. *J Comp Neurol* **394**, 386-94.

Bruckner, K., Perez, L., Clausen, H. and Cohen, S. (2000). Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* **406**, 411-5.

Calegari, F. and Huttner, W. B. (2003). An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J Cell Sci* **116**, 4947-55.

Cameron, D. A., Gentile, K. L., Middleton, F. A. and Yurco, P. (2005). Gene expression profiles of intact and regenerating zebrafish retina. *Mol Vis* **11**, 775-91.

Casarosa, S., Leone, P., Cannata, S., Santini, F., Pinchera, A., Barsacchi, G. and Andreazzoli, M. (2005). Genetic analysis of metamorphic and premetamorphic Xenopus ciliary marginal zone. *Dev Dyn* **233**, 646-51.

Castro, D. S., Skowronska-Krawczyk, D., Armant, O., Donaldson, I. J., Parras, C., Hunt, C., Critchley, J. A., Nguyen, L., Gossler, A., Gottgens, B. et al. (2006). Proneural bHLH and Brn proteins coregulate a neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif. *Dev Cell* **11**, 831-44.

Centanin, L., Hoeckendorf, B. and Wittbrodt, J. (2011). Fate restriction and multipotency in retinal stem cells. *Cell Stem Cell* **9**, 553-62.

Cervený, K. L., Cavodeassi, F., Turner, K. J., de Jong-Curtain, T. A., Heath, J. K. and Wilson, S. W. (2010). The zebrafish *lotte* mutant reveals that the local retinal environment promotes the differentiation of proliferating precursors emerging from their stem cell niche. *Development* **137**, 2107-15.

Cervený, K. L., Varga, M. and Wilson, S. W. (2011). Continued growth and circuit building in the anamniote visual system. *Dev Neurobiol*.

Chacko, D. M., Das, A. V., Zhao, X., James, J., Bhattacharya, S. and Ahmad, I. (2003). Transplantation of ocular stem cells: the role of injury in incorporation and differentiation of grafted cells in the retina. *Vision Res* **43**, 937-46.

Chae, J., Zimmerman, L. B. and Grainger, R. M. (2002). Inducible control of tissue-specific transgene expression in *Xenopus tropicalis* transgenic lines. *Mech Dev* **117**, 235-41.

Chalmers, A. D., Goldstone, K., Smith, J. C., Gilchrist, M., Amaya, E. and Papalopulu, N. (2005). A *Xenopus tropicalis* oligonucleotide microarray works across species using RNA from *Xenopus laevis*. *Mech Dev* **122**, 355-63.

Chang, G. Q., Hao, Y. and Wong, F. (1993). Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice. *Neuron* **11**, 595-605.

Chapouton, P., Skupien, P., Hesl, B., Coolen, M., Moore, J. C., Madelaine, R., Kremmer, E., Faus-Kessler, T., Blader, P., Lawson, N. D. et al. (2010). Notch activity levels control the balance between quiescence and recruitment of adult neural stem cells. *J Neurosci* **30**, 7961-74.

Chapouton, P., Webb, K. J., Stigloher, C., Alunni, A., Adolf, B., Hesl, B., Topp, S., Kremmer, E. and Bally-Cuif, L. (2011). Expression of hairy/enhancer of split genes in neural progenitors and neurogenesis domains of the adult zebrafish brain. *J Comp Neurol* **519**, 1748-69.

Chesneau, A., Sachs, L. M., Chai, N., Chen, Y., Du Pasquier, L., Loeber, J., Pollet, N., Reilly, M., Weeks, D. L. and Bronchain, O. J. (2008). Transgenesis procedures in *Xenopus*. *Biol Cell* **100**, 503-21.

Cho, S. H. and Cepko, C. L. (2006). Wnt2b/beta-catenin-mediated canonical Wnt signaling determines the peripheral fates of the chick eye. *Development* **133**, 3167-77.

Choorapoikayil, S., Willems, B., Strohle, P. and Gajewski, M. (2012). Analysis of her1 and her7 Mutants Reveals a Spatio Temporal Separation of the Somite Clock Module. *PLoS One* **7**, e39073.

Cicero, S. A., Johnson, D., Reyntjens, S., Frase, S., Connell, S., Chow, L. M., Baker, S. J., Sorrentino, B. P. and 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.

Cisneros, E., Latasa, M. J., Garcia-Flores, M. and Frade, J. M. (2008). Instability of Notch1 and Delta1 mRNAs and reduced Notch activity in vertebrate neuroepithelial cells undergoing S-phase. *Mol Cell Neurosci* **37**, 820-31.

Close, J. L., Gumuscu, B. and 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.

Coles, B. L., Angenieux, B., Inoue, T., Del Rio-Tsonis, K., Spence, J. R., McInnes, R. R., Arsenijevic, Y. and 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.

Coller, H. A., Sang, L. and Roberts, J. M. (2006). A new description of cellular quiescence. *PLoS Biol* **4**, e83.

Colozza, G., Locker, M. and Perron, M. (Accepted). Shaping the eye in vitro from embryonic stem cells: biological and medical implications. *World journal of stem cells*.

Comyn, O., Lee, E. and MacLaren, R. E. (2010). Induced pluripotent stem cell therapies for retinal disease. *Curr Opin Neurol* **23**, 4-9.

Coolen, M., Thieffry, D., Drivenes, O., Becker, T. S. and Bally-Cuif, L. (2012). miR-9 controls the timing of neurogenesis through the direct inhibition of antagonistic factors. *Dev Cell* **22**, 1052-64.

Curry, C. L., Reed, L. L., Golde, T. E., Miele, L., Nickoloff, B. J. and Foreman, K. E. (2005). Gamma secretase inhibitor blocks Notch activation and induces apoptosis in Kaposi's sarcoma tumor cells. *Oncogene* **24**, 6333-44.

Danno, H., Michiue, T., Hitachi, K., Yukita, A., Ishiura, S. and Asashima, M. (2008). Molecular links among the causative genes for ocular malformation: Otx2 and Sox2 coregulate Rax expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5408-13.

Das, A. V., James, J., Rahnenfuhrer, J., Thoreson, W. B., Bhattacharya, S., Zhao, X. and Ahmad, I. (2005). Retinal properties and potential of the adult mammalian ciliary epithelium stem cells. *Vision Res* **45**, 1653-66.

Das, A. V., Mallya, K. B., Zhao, X., Ahmad, F., Bhattacharya, S., Thoreson, W. B., Hegde, G. V. and 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.

Davis, R. L. and Turner, D. L. (2001). Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* **20**, 8342-57.

Davis, R. L., Turner, D. L., Evans, L. M. and Kirschner, M. W. (2001). Molecular targets of vertebrate segmentation: two mechanisms control segmental expression of *Xenopus hairy2* during somite formation. *Dev Cell* **1**, 553-65.

Dawson, S. R., Turner, D. L., Weintraub, H. and Parkhurst, S. M. (1995). Specificity for the hairy/enhancer of split basic helix-loop-helix (bHLH) proteins maps outside the bHLH domain and suggests two separable modes of transcriptional repression. *Mol Cell Biol* **15**, 6923-31.

de la Pompa, J. L., Wakeham, A., Correia, K. M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R. J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T. W., Rossant, J. et al. (1997). Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* **124**, 1139-48.

De Sousa, E. M. F. and Medema, J. P. (2012). Axing Wnt signals. *Cell Res* **22**, 9-11.

Deblandre, G. A., Wettstein, D. A., Koyano-Nakagawa, N. and Kintner, C. (1999). A two-step mechanism generates the spacing pattern of the ciliated cells in the skin of *Xenopus* embryos. *Development* **126**, 4715-28.

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.

Decembrini, S., Bressan, D., Vignali, R., Pitto, L., Mariotti, S., Rainaldi, G., Wang, X., Evangelista, M., Barsacchi, G. and Cremisi, F. (2009). MicroRNAs couple cell fate and developmental timing in retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21179-84.

Del Debbio, C. B., Balasubramanian, S., Parameswaran, S., Chaudhuri, A., Qiu, F. and Ahmad, I. (2010). Notch and Wnt signaling mediated rod photoreceptor regeneration by Muller cells in adult mammalian retina. *PLoS One* **5**, e12425.

Denayer, T., Locker, M., Borday, C., Deroo, T., Janssens, S., Hecht, A., van Roy, F., Perron, M. and Vleminckx, K. (2008). Canonical Wnt signaling controls proliferation of retinal stem/progenitor cells in postembryonic *Xenopus* eyes. *Stem Cells* **26**, 2063-74.

Djojosebrot, M. W. and Arsenijevic, Y. (2008). Retinal stem cells: promising candidates for retina transplantation. *Cell Tissue Res* **331**, 347-57.

Donoviel, D. B., Hadjantonakis, A. K., Ikeda, M., Zheng, H., Hyslop, P. S. and Bernstein, A. (1999). Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects. *Genes Dev* **13**, 2801-10.

Dorsky, R. I., Sheldahl, L. C. and Moon, R. T. (2002). A transgenic *Lef1*/beta-catenin-dependent reporter is expressed in spatially restricted domains throughout zebrafish development. *Dev Biol* **241**, 229-37.

Dubrulle, J. and Pourquie, O. (2004). Coupling segmentation to axis formation. *Development* **131**, 5783-93.

Dyer, M. A. and Cepko, C. L. (2000). p57(Kip2) regulates progenitor cell proliferation and amacrine interneuron development in the mouse retina. *Development* **127**, 3593-605.

Dyer, M. A. and Cepko, C. L. (2001a). p27Kip1 and p57Kip2 regulate proliferation in distinct retinal progenitor cell populations. *J Neurosci* **21**, 4259-71.

Dyer, M. A. and Cepko, C. L. (2001b). 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. and Oliver, G. (2003). Prox1 function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina. *Nat Genet* **34**, 53-8.

Ehm, O., Goritz, C., Covic, M., Schaffner, I., Schwarz, T. J., Karaca, E., Kempkes, B., Kremmer, E., Pfrieger, F. W., Espinosa, L. et al. (2010). RBPJkappa-dependent signaling is essential for long-term maintenance of neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci* **30**, 13794-807.

Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., Okuda, S., Sekiguchi, K., Adachi, T. and Sasai, Y. (2011). Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* **472**, 51-6.

Ekker, S. C., Ungar, A. R., Greenstein, P., von Kessler, D. P., Porter, J. A., Moon, R. T. and Beachy, P. A. (1995). Patterning activities of vertebrate hedgehog proteins in the developing eye and brain. *Curr Biol* **5**, 944-55.

Fausett, B. V. and Goldman, D. (2006). A role for alpha1 tubulin-expressing Muller glia in regeneration of the injured zebrafish retina. *J Neurosci* **26**, 6303-13.

Fierro, A. C., Thuret, R., Coen, L., Perron, M., Demeneix, B. A., Wegnez, M., Gyapay, G., Weissenbach, J., Wincker, P., Mazabraud, A. et al. (2007). Exploring nervous system transcriptomes during embryogenesis and metamorphosis in *Xenopus tropicalis* using EST analysis. *BMC Genomics* **8**, 118.

Fimbel, S. M., Montgomery, J. E., Burket, C. T. and Hyde, D. R. (2007). Regeneration of inner retinal neurons after intravitreal injection of ouabain in zebrafish. *J Neurosci* **27**, 1712-24.

Fischer, A. and Gessler, M. (2007). Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Res* **35**, 4583-96.

Fischer, A. J. and Bongini, R. (2010). Turning Muller glia into neural progenitors in the retina. *Mol Neurobiol* **42**, 199-209.

Fischer, A. J., McGuire, C. R., Dierks, B. D. and Reh, T. A. (2002). Insulin and fibroblast growth factor 2 activate a neurogenic program in Muller glia of the chicken retina. *J Neurosci* **22**, 9387-98.

Fischer, A. J. and Reh, T. A. (2000). Identification of a Proliferating Marginal Zone of Retinal Progenitors in Postnatal Chickens. *Dev Biol* **220**, 197-210.

Fischer, A. J. and Reh, T. A. (2001). Muller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat Neurosci* **4**, 247-52.

Fischer, A. J. and Reh, T. A. (2002). Exogenous growth factors stimulate the regeneration of ganglion cells in the chicken retina. *Dev Biol* **251**, 367-79.

Fischer, A. J. and Reh, T. A. (2003). Potential of Muller glia to become neurogenic retinal progenitor cells. *Glia* **43**, 70-6.

Fuhrmann, S. (2010). Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle. *Curr Top Dev Biol* **93**, 61-84.

Fujimura, N., Taketo, M. M., Mori, M., Korinek, V. and Kozmik, Z. (2009). Spatial and temporal regulation of Wnt/beta-catenin signaling is essential for development of the retinal pigment epithelium. *Dev Biol* **334**, 31-45.

Fukuda, A., Kawaguchi, Y., Furuyama, K., Kodama, S., Horiguchi, M., Kuhara, T., Koizumi, M., Boyer, D. F., Fujimoto, K., Doi, R. et al. (2006). Ectopic pancreas formation in Hes1 -knockout mice reveals plasticity of endodermal progenitors of the gut, bile duct, and pancreas. *J Clin Invest* **116**, 1484-93.

Furimsky, M. and Wallace, V. A. (2006). Complementary Gli activity mediates early patterning of the mouse visual system. *Dev Dyn* **235**, 594-605.

Furukawa, T., Mukherjee, S., Bao, Z. Z., Morrow, E. M. and Cepko, C. L. (2000). rax, Hes1, and notch1 promote the formation of Muller glia by postnatal retinal progenitor cells. *Neuron* **26**, 383-94.

Geling, A., Itoh, M., Tallafuss, A., Chapouton, P., Tannhauser, B., Kuwada, J. Y., Chitnis, A. B. and Bally-Cuif, L. (2003). bHLH transcription factor Her5 links patterning to regional inhibition of neurogenesis at the midbrain-hindbrain boundary. *Development* **130**, 1591-604.

Geling, A., Plessy, C., Rastegar, S., Strahle, U. and Bally-Cuif, L. (2004). Her5 acts as a prepattern factor that blocks neurogenin1 and coe2 expression upstream of Notch to inhibit neurogenesis at the midbrain-hindbrain boundary. *Development* **131**, 1993-2006.

- Gestri, G., Carl, M., Appolloni, I., Wilson, S. W., Barsacchi, G. and Andreazzoli, M.** (2005). Six3 functions in anterior neural plate specification by promoting cell proliferation and inhibiting Bmp4 expression. *Development* **132**, 2401-13.
- Gilchrist, M. J., Christensen, M. B., Bronchain, O., Brunet, F., Chesneau, A., Fenger, U., Geach, T. J., Ironfield, H. V., Kaya, F., Kricha, S. et al.** (2009). Database of queryable gene expression patterns for *Xenopus*. *Dev Dyn* **238**, 1379-88.
- Gotz, M. and Huttner, W. B.** (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 777-88.
- Graw, J.** (2010). Eye development. *Curr Top Dev Biol* **90**, 343-86.
- Green, E. S., Stubbs, J. L. and Levine, E. M.** (2003). Genetic rescue of cell number in a mouse model of microphthalmia: interactions between Chx10 and G1-phase cell cycle regulators. *Development* **130**, 539-52.
- Gu, P., Harwood, L. J., Zhang, X., Wylie, M., Curry, W. J. and 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., Smith, A. J., Pearson, R. A., Ali, R. R. and Sowden, J. C.** (2010). 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**, 1048-59.
- Handler, M., Yang, X. and Shen, J.** (2000). Presenilin-1 regulates neuronal differentiation during neurogenesis. *Development* **127**, 2593-606.
- Harada, T., Harada, C. and Parada, L. F.** (2007). Molecular regulation of visual system development: more than meets the eye. *Genes Dev* **21**, 367-78.
- Harland, R. M. and Grainger, R. M.** (2011). *Xenopus* research: metamorphosed by genetics and genomics. *Trends Genet* **27**, 507-15.
- Hartley, K. O., Hardcastle, Z., Friday, R. V., Amaya, E. and Papalopulu, N.** (2001). Transgenic *Xenopus* embryos reveal that anterior neural development requires continued suppression of BMP signaling after gastrulation. *Dev Biol* **238**, 168-84.
- Hartong, D. T., Berson, E. L. and Dryja, T. P.** (2006). Retinitis pigmentosa. *Lancet* **368**, 1795-809.
- Haruta, M.** (2005). Embryonic stem cells: potential source for ocular repair. *Semin Ophthalmol* **20**, 17-23.

Haruta, M., Kosaka, M., Kanegae, Y., Saito, I., Inoue, T., Kageyama, R., Nishida, A., Honda, Y. and Takahashi, M. (2001). Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue. *Nat Neurosci* **4**, 1163-4.

Hatakeyama, J., Bessho, Y., Katoh, K., Ookawara, S., Fujioka, M., Guillemot, F. and 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.

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.

Haynes, T., Gutierrez, C., Aycinena, J. C., Tsonis, P. A. and Del Rio-Tsonis, K. (2007). BMP signaling mediates stem/progenitor cell-induced retina regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20380-5.

Heasman, J., Kofron, M. and Wylie, C. (2000). Beta-catenin signaling activity dissected in the early *Xenopus* embryo: a novel antisense approach. *Dev Biol* **222**, 124-34.

Heng, J. I., Nguyen, L., Castro, D. S., Zimmer, C., Wildner, H., Armant, O., Skowronska-Krawczyk, D., Bedogni, F., Matter, J. M., Hevner, R. et al. (2008). Neurogenin 2 controls cortical neuron migration through regulation of Rnd2. *Nature* **455**, 114-8.

Henrique, D., Hirsinger, E., Adam, J., Le Roux, I., Pourquie, O., Ish-Horowicz, D. and Lewis, J. (1997). Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina. *Curr Biol* **7**, 661-70.

Henry, C. A., Urban, M. K., Dill, K. K., Merlie, J. P., Page, M. F., Kimmel, C. B. and Amacher, S. L. (2002). Two linked hairy/Enhancer of split-related zebrafish genes, *her1* and *her7*, function together to refine alternating somite boundaries. *Development* **129**, 3693-704.

Hester, S. D., Belmonte, J. M., Gens, J. S., Clendenon, S. G. and Glazier, J. A. (2011). A multi-cell, multi-scale model of vertebrate segmentation and somite formation. *PLoS Comput Biol* **7**, e1002155.

Hirashima, M., Kobayashi, T., Uchikawa, M., Kondoh, H. and Araki, M. (2008). Anteroventrally localized activity in the optic vesicle plays a crucial role in the optic development. *Dev Biol* **317**, 620-31.

Hirata, H., Bessho, Y., Kokubu, H., Masamizu, Y., Yamada, S., Lewis, J. and Kageyama, R. (2004). Instability of Hes7 protein is crucial for the somite segmentation clock. *Nat Genet* **36**, 750-4.

Hirata, H., Tomita, K., Bessho, Y. and Kageyama, R. (2001). Hes1 and Hes3 regulate maintenance of the isthmic organizer and development of the mid/hindbrain. *EMBO J* **20**, 4454-66.

Hirata, H., Yoshiura, S., Ohtsuka, T., Bessho, Y., Harada, T., Yoshikawa, K. and Kageyama, R. (2002). Oscillatory expression of the bHLH factor Hes1 regulated by a negative feedback loop. *Science* **298**, 840-3.

Hojo, M., Ohtsuka, T., Hashimoto, N., Gradwohl, G., Guillemot, F. and Kageyama, R. (2000). Glial cell fate specification modulated by the bHLH gene Hes5 in mouse retina. *Development* **127**, 2515-22.

Holley, S. A., Julich, D., Rauch, G. J., Geisler, R. and Nusslein-Volhard, C. (2002). her1 and the notch pathway function within the oscillator mechanism that regulates zebrafish somitogenesis. *Development* **129**, 1175-83.

Horsford, D. J., Nguyen, M. T., Sellar, G. C., Kothary, R., Arnheiter, H. and McInnes, R. R. (2005). Chx10 repression of Mitf is required for the maintenance of mammalian neuroretinal identity. *Development* **132**, 177-87.

Huang, S. and 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.

Hyer, J., Mima, T. and Mikawa, T. (1998). FGF1 patterns the optic vesicle by directing the placement of the neural retina domain. *Development* **125**, 869-77.

Imayoshi, I. and Kageyama, R. (2011). The role of Notch signaling in adult neurogenesis. *Mol Neurobiol* **44**, 7-12.

Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K. and Kageyama, R. (2010). Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J Neurosci* **30**, 3489-98.

Ingram, W. J., McCue, K. I., Tran, T. H., Hallahan, A. R. and Wainwright, B. J. (2008). Sonic Hedgehog regulates Hes1 through a novel mechanism that is independent of canonical Notch pathway signalling. *Oncogene* **27**, 1489-500.

Inoue, T., Coles, B. L., Dorval, K., Bremner, R., Bessho, Y., Kageyama, R., Hino, S., Matsuoka, M., Craft, C. M., McInnes, R. R. et al. (2010). Maximizing functional photoreceptor differentiation from adult human retinal stem cells. *Stem Cells* **28**, 489-500.

Inoue, T., Hojo, M., Bessho, Y., Tano, Y., Lee, J. E. and 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. and 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.

Ishibashi, M., Ang, S. L., Shiota, K., Nakanishi, S., Kageyama, R. and Guillemot, F. (1995). Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev* **9**, 3136-48.

Ishibashi, M., Moriyoshi, K., Sasai, Y., Shiota, K., Nakanishi, S. and Kageyama, R. (1994). Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system. *EMBO J* **13**, 1799-805.

Iso, T., Kedes, L. and Hamamori, Y. (2003). HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* **194**, 237-55.

Jang, J., Ku, S. Y., Kim, J. E., Choi, K., Kim, Y. Y., Kim, H. S., Oh, S. K., Lee, E. J., Cho, H. J., Song, Y. H. et al. (2008). Notch inhibition promotes human embryonic stem cell-derived cardiac mesoderm differentiation. *Stem Cells* **26**, 2782-90.

Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E. H., Kopan, R. and Israel, A. (1995). Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* **377**, 355-8.

Jarriault, S., Le Bail, O., Hirsinger, E., Pourquie, O., Logeat, F., Strong, C. F., Brou, C., Seidah, N. G. and Israel, A. (1998). Delta-1 activation of notch-1 signaling results in HES-1 transactivation. *Mol Cell Biol* **18**, 7423-31.

Jen, W. C., Gawantka, V., Pollet, N., Niehrs, C. and Kintner, C. (1999). Periodic repression of Notch pathway genes governs the segmentation of *Xenopus* embryos. *Genes Dev* **13**, 1486-99.

Jennings, B., Preiss, A., Delidakis, C. and Bray, S. (1994). The Notch signalling pathway is required for Enhancer of split bHLH protein expression during neurogenesis in the *Drosophila* embryo. *Development* **120**, 3537-48.

Jensen, J., Pedersen, E. E., Galante, P., Hald, J., Heller, R. S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F., Serup, P. and Madsen, O. D. (2000). Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat Genet* **24**, 36-44.

Jin, Z. B., Okamoto, S., Mandai, M. and Takahashi, M. (2009). Induced pluripotent stem cells for retinal degenerative diseases: a new perspective on the challenges. *J Genet* **88**, 417-24.

Jogi, A., Persson, P., Grynfeld, A., Pahlman, S. and Axelson, H. (2002). Modulation of basic helix-loop-helix transcription complex formation by Id proteins during neuronal differentiation. *J Biol Chem* **277**, 9118-26.

Jouve, C., Palmeirim, I., Henrique, D., Beckers, J., Gossler, A., Ish-Horowicz, D. and Pourquie, O. (2000). Notch signalling is required for cyclic expression of the hairy-like gene HES1 in the presomitic mesoderm. *Development* **127**, 1421-9.

Kageyama, R., Niwa, Y., Shimojo, H., Kobayashi, T. and Ohtsuka, T. (2010). Ultradian oscillations in Notch signaling regulate dynamic biological events. *Curr Top Dev Biol* **92**, 311-31.

Kageyama, R., Ohtsuka, T., Hatakeyama, J. and Ohsawa, R. (2005). Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Exp Cell Res* **306**, 343-8.

Kageyama, R., Ohtsuka, T. and Kobayashi, T. (2007). The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development* **134**, 1243-51.

Kageyama, R., Ohtsuka, T. and Kobayashi, T. (2008a). Roles of Hes genes in neural development. *Dev Growth Differ* **50 Suppl 1**, S97-103.

Kageyama, R., Ohtsuka, T., Shimojo, H. and Imayoshi, I. (2008b). Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition. *Nat Neurosci* **11**, 1247-51.

Kageyama, R., Ohtsuka, T., Shimojo, H. and Imayoshi, I. (2009). Dynamic regulation of Notch signaling in neural progenitor cells. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 733-40.

Kagiyama, Y., Gotouda, N., Sakagami, K., Yasuda, K., Mochii, M. and Araki, M. (2005). Extraocular dorsal signal affects the developmental fate of the optic vesicle and patterns the optic neuroepithelium. *Dev Growth Differ* **47**, 523-36.

Kang, S. A., Seol, J. H. and Kim, J. (2005). The conserved WRPW motif of Hes6 mediates proteasomal degradation. *Biochem Biophys Res Commun* **332**, 33-6.

Karantza-Wadsworth, V., Patel, S., Kravchuk, O., Chen, G., Mathew, R., Jin, S. and White, E. (2007). Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev* **21**, 1621-35.

Karl, M. O., Hayes, S., Nelson, B. R., Tan, K., Buckingham, B. and Reh, T. A. (2008). Stimulation of neural regeneration in the mouse retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 19508-13.

Karl, M. O. and Reh, T. A. (2010). Regenerative medicine for retinal diseases: activating endogenous repair mechanisms. *Trends Mol Med* **16**, 193-202.

Kenyon, K. L., Zaghoul, N. and Moody, S. A. (2001). Transcription factors of the anterior neural plate alter cell movements of epidermal progenitors to specify a retinal fate. *Dev Biol* **240**, 77-91.

Khokha, M. K., Chung, C., Bustamante, E. L., Gaw, L. W., Trott, K. A., Yeh, J., Lim, N., Lin, J. C., Taverner, N., Amaya, E. et al. (2002). Techniques and probes for the study of *Xenopus tropicalis* development. *Dev Dyn* **225**, 499-510.

Kiecker, C. and Lumsden, A. (2005). Compartments and their boundaries in vertebrate brain development. *Nat Rev Neurosci* **6**, 553-64.

king, H. D. (1905). experimental studies on the eye for the frog embryo. *Development Genes and Evolution* **19**, 85-107.

Klonisch, T., Wiehac, E., Hombach-Klonisch, S., Ande, S. R., Wesselborg, S., Schulze-Osthoff, K. and Los, M. (2008). Cancer stem cell markers in common cancers - therapeutic implications. *Trends Mol Med* **14**, 450-60.

Kobayashi, T. and Kageyama, R. (2010). Hes1 oscillation: making variable choices for stem cell differentiation. *Cell Cycle* **9**, 207-8.

Kobayashi, T., Mizuno, H., Imayoshi, I., Furusawa, C., Shirahige, K. and Kageyama, R. (2009). The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells. *Genes Dev* **23**, 1870-5.

Kopinke, D., Brailsford, M., Shea, J. E., Leavitt, R., Scaife, C. L. and Murtaugh, L. C. (2011). Lineage tracing reveals the dynamic contribution of Hes1+ cells to the developing and adult pancreas. *Development* **138**, 431-41.

Koyano-Nakagawa, N., Kim, J., Anderson, D. and Kintner, C. (2000). Hes6 acts in a positive feedback loop with the neurogenins to promote neuronal differentiation. *Development* **127**, 4203-16.

Kubo, F. and Nakagawa, S. (2008). Wnt signaling in retinal stem cells and regeneration. *Dev Growth Differ* **50**, 245-51.

Kubo, F. and Nakagawa, S. (2009). 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**, 1823-33.

Kubo, F., Takeichi, M. and Nakagawa, S. (2003). Wnt2b controls retinal cell differentiation at the ciliary marginal zone. *Development* **130**, 587-98.

Kubo, F., Takeichi, M. and Nakagawa, S. (2005). Wnt2b inhibits differentiation of retinal progenitor cells in the absence of Notch activity by downregulating the expression of proneural genes. *Development* **132**, 2759-70.

Lamar, E. and Kintner, C. (2005). The Notch targets Esr1 and Esr10 are differentially regulated in *Xenopus* neural precursors. *Development* **132**, 3619-30.

Lamba, D., Karl, M. and Reh, T. (2008). Neural regeneration and cell replacement: a view from the eye. *Cell Stem Cell* **2**, 538-49.

Lamba, D. A., Karl, M. O. and Reh, T. A. (2009). Strategies for retinal repair: cell replacement and regeneration. *Prog Brain Res* **175**, 23-31.

Lange, C., Huttner, W. B. and Calegari, F. (2009). Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors. *Cell Stem Cell* **5**, 320-31.

Langeland, J. A. and Carroll, S. B. (1993). Conservation of regulatory elements controlling hairy pair-rule stripe formation. *Development* **117**, 585-96.

Lathia, J. D., Venere, M., Rao, M. S. and Rich, J. N. (2011). Seeing is believing: are cancer stem cells the Loch Ness monster of tumor biology? *Stem Cell Rev* **7**, 227-37.

Latimer, A. J., Shin, J. and Appel, B. (2005). her9 promotes floor plate development in zebrafish. *Dev Dyn* **232**, 1098-104.

Lee, H. Y., Wroblewski, E., Philips, G. T., Stair, C. N., Conley, K., Reedy, M., Mastick, G. S. and Brown, N. L. (2005). Multiple requirements for Hes 1 during early eye formation. *Dev Biol* **284**, 464-78.

Levine, E. M., Roelink, H., Turner, J. and Reh, T. A. (1997). Sonic hedgehog promotes rod photoreceptor differentiation in mammalian retinal cells in vitro. *J Neurosci* **17**, 6277-88.

Li, H., Tierney, C., Wen, L., Wu, J. Y. and 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, M. and Rohrer, B. (2006). Gene silencing in *Xenopus laevis* by DNA vector-based RNA interference and transgenesis. *Cell Res* **16**, 99-105.

Li, Z., Hu, M., Ochocinska, M. J., Joseph, N. M. and Easter, S. S., Jr. (2000). Modulation of cell proliferation in the embryonic retina of zebrafish (*Danio rerio*). *Dev Dyn* **219**, 391-401.

Lindsell, C. E., Boulter, J., diSibio, G., Gossler, A. and Weinmaster, G. (1996). Expression patterns of Jagged, Delta1, Notch1, Notch2, and Notch3 genes identify ligand-receptor pairs that may function in neural development. *Mol Cell Neurosci* **8**, 14-27.

Liu, C., Bakeri, H., Li, T. and Swaroop, A. (2012). Regulation of retinal progenitor expansion by Frizzled receptors: implications for microphthalmia and retinal coloboma. *Hum Mol Genet.*

Liu, H., Mohamed, O., Dufort, D. and Wallace, V. A. (2003). Characterization of Wnt signaling components and activation of the Wnt canonical pathway in the murine retina. *Dev Dyn* **227**, 323-34.

Liu, H., Thurig, S., Mohamed, O., Dufort, D. and Wallace, V. A. (2006). Mapping canonical Wnt signaling in the developing and adult retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 5088-97.

Liu, H., Xu, S., Wang, Y., Mazerolle, C., Thurig, S., Coles, B. L., Ren, J. C., Taketo, M. M., van der Kooy, D. and Wallace, V. A. (2007). Ciliary margin transdifferentiation from neural retina is controlled by canonical Wnt signaling. *Dev Biol* **308**, 54-67.

Livesey, F. J. and Cepko, C. L. (2001). Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nat Rev Neurosci* **2**, 109-18.

Locker, M., Agathocleous, M., Amato, M. A., Parain, K., Harris, W. A. and Perron, M. (2006). Hedgehog signaling and the retina: insights into the mechanisms controlling the proliferative properties of neural precursors. *Genes Dev* **20**, 3036-48.

Locker, M., Borday, C. and 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., 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.

Lord-Grignon, J., Abdouh, M. and Bernier, G. (2006). Identification of genes expressed in retinal progenitor/stem cell colonies isolated from the ocular ciliary body of adult mice. *Gene Expr Patterns* **6**, 992-9.

Love, N. R., Thuret, R., Chen, Y., Ishibashi, S., Sabherwal, N., Paredes, R., Alves-Silva, J., Dorey, K., Noble, A. M., Guille, M. J. et al. (2011). pTransgenesis: a cross-species, modular transgenesis resource. *Development* **138**, 5451-8.

Lowell, S., Benchoua, A., Heavey, B. and Smith, A. G. (2006). Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells. *PLoS Biol* **4**, e121.

Lugert, S., Basak, O., Knuckles, P., Haussler, U., Fabel, K., Gotz, M., Haas, C. A., Kempermann, G., Taylor, V. and Giachino, C. (2010). Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell* **6**, 445-56.

Macdonald, R., Barth, K. A., Xu, Q., Holder, N., Mikkola, I. and Wilson, S. W. (1995). Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes. *Development* **121**, 3267-78.

MacLaren, R. E. and Pearson, R. A. (2007). Stem cell therapy and the retina. *Eye (Lond)* **21**, 1352-9.

MacLaren, R. E., Pearson, R. A., MacNeil, A., Douglas, R. H., Salt, T. E., Akimoto, M., Swaroop, A., Sowden, J. C. and Ali, R. R. (2006). Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature* **444**, 203-7.

MacNeil, A., Pearson, R. A., MacLaren, R. E., Smith, A. J., Sowden, J. C. and 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.

Marquardt, T. (2003). Transcriptional control of neuronal diversification in the retina. *Prog Retin Eye Res* **22**, 567-77.

Marquardt, T. and Gruss, P. (2002). Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends Neurosci* **25**, 32-8.

Martinez-Morales, J. R., Del Bene, F., Nica, G., Hammerschmidt, M., Bovolenta, P. and Wittbrodt, J. (2005). Differentiation of the vertebrate retina is coordinated by an FGF signaling center. *Dev Cell* **8**, 565-74.

Martinez-Morales, J. R., Rodrigo, I. and Bovolenta, P. (2004). Eye development: a view from the retina pigmented epithelium. *Bioessays* **26**, 766-77.

Martinez-Navarrete, G. C., Angulo, A., Martin-Nieto, J. and Cuenca, N. (2008). Gradual morphogenesis of retinal neurons in the peripheral retinal margin of adult monkeys and humans. *J Comp Neurol* **511**, 557-80.

Masse, K., Bhamra, S., Eason, R., Dale, N. and Jones, E. A. (2007). Purine-mediated signalling triggers eye development. *Nature* **449**, 1058-62.

Matter-Sadzinski, L., Puzianowska-Kuznicka, M., Hernandez, J., Ballivet, M. and Matter, J. M. (2005). A bHLH transcriptional network regulating the specification of retinal ganglion cells. *Development* **132**, 3907-21.

Mayer, E. J., Carter, D. A., Ren, Y., Hughes, E. H., Rice, C. M., Halfpenny, C. A., Scolding, N. J. and Dick, A. D. (2005). Neural progenitor cells from postmortem adult human retina. *Br J Ophthalmol* **89**, 102-6.

McCabe, K. L., Gunther, E. C. and Reh, T. A. (1999). The development of the pattern of retinal ganglion cells in the chick retina: mechanisms that control differentiation. *Development* **126**, 5713-24.

McCollum, C. W., Amin, S. R., Pauerstein, P. and Lane, M. E. (2007). A zebrafish LMO4 ortholog limits the size of the forebrain and eyes through negative regulation of six3b and rx3. *Dev Biol* **309**, 373-85.

Mochii, M., Mazaki, Y., Mizuno, N., Hayashi, H. and Eguchi, G. (1998). Role of Mitf in differentiation and transdifferentiation of chicken pigmented epithelial cell. *Dev Biol* **193**, 47-62.

Moe, M. C., Kolberg, R. S., Sandberg, C., Vik-Mo, E., Olstorn, H., Varghese, M., Langmoen, I. A. and 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.

Moloney, D. J., Panin, V. M., Johnston, S. H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K. D., Haltiwanger, R. S. et al. (2000). Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* **406**, 369-75.

Monnin, J., Morand-Villeneuve, N., Michel, G., Hicks, D. and Versaux-Botteri, C. (2007). Production of neurospheres from mammalian Muller cells in culture. *Neurosci Lett* **421**, 22-6.

Moody, S. A. (1987). Fates of the blastomeres of the 32-cell-stage *Xenopus* embryo. *Dev Biol* **122**, 300-19.

Moore, A. W., Barbel, S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2000). A genomewide survey of basic helix-loop-helix factors in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10436-41.

Morcillo, J., Martinez-Morales, J. R., Trousse, F., Fermin, Y., Sowden, J. C. and Bovolenta, P. (2006). Proper patterning of the optic fissure requires the sequential activity of BMP7 and SHH. *Development* **133**, 3179-90.

Morris, V. B. and Cowan, R. (1995). An analysis of the growth of the retinal cell population in embryonic chicks yielding proliferative ratios, numbers of proliferative and non-proliferative cells and cell-cycle times for successive generations of cell cycles. *Cell Prolif* **28**, 373-91.

Morrow, E. M., Belliveau, M. J. and Cepko, C. L. (1998). Two phases of rod photoreceptor differentiation during rat retinal development. *J Neurosci* **18**, 3738-48.

Moshiri, A., McGuire, C. R. and Reh, T. A. (2005). Sonic hedgehog regulates proliferation of the retinal ciliary marginal zone in posthatch chicks. *Dev Dyn* **233**, 66-75.

Moshiri, A. and Reh, T. A. (2004). Persistent progenitors at the retinal margin of *ptc*^{+/-} mice. *J Neurosci* **24**, 229-37.

Mui, S. H., Kim, J. W., Lemke, G. and Bertuzzi, S. (2005). Vax genes ventralize the embryonic eye. *Genes Dev* **19**, 1249-59.

Murali, D., Yoshikawa, S., Corrigan, R. R., Plas, D. J., Crair, M. C., Oliver, G., Lyons, K. M., Mishina, Y. and Furuta, Y. (2005). Distinct developmental programs require different levels of Bmp signaling during mouse retinal development. *Development* **132**, 913-23.

Muranishi, Y., Terada, K., Inoue, T., Katoh, K., Tsujii, T., Sanuki, R., Kurokawa, D., Aizawa, S., Tamaki, Y. and Furukawa, T. (2011). An essential role for RAX homeoprotein and NOTCH-HES signaling in Otx2 expression in embryonic retinal photoreceptor cell fate determination. *J Neurosci* **31**, 16792-807.

Murato, Y., Yamaguti, M., Katamura, M., Cho, K. W. and Hashimoto, C. (2006). Two modes of action by which *Xenopus hairy2b* establishes tissue demarcation in the Spemann-Mangold organizer. *Int J Dev Biol* **50**, 463-71.

Murtaugh, L. C. (2007). Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible. *Development* **134**, 427-38.

Nagatomo, K. and Hashimoto, C. (2007). *Xenopus hairy2* functions in neural crest formation by maintaining cells in a mitotic and undifferentiated state. *Dev Dyn* **236**, 1475-83.

Nakano, H., Amemiya, S., Shiokawa, K. and Taira, M. (2000). RNA interference for the organizer-specific gene *Xlim-1* in *Xenopus* embryos. *Biochem Biophys Res Commun* **274**, 434-9.

Nelson, B. R., Gumuscu, B., Hartman, B. H. and Reh, T. A. (2006). Notch activity is downregulated just prior to retinal ganglion cell differentiation. *Dev Neurosci* **28**, 128-41.

Nelson, B. R., Hartman, B. H., Georgi, S. A., Lan, M. S. and Reh, T. A. (2007). Transient inactivation of Notch signaling synchronizes differentiation of neural progenitor cells. *Dev Biol* **304**, 479-98.

Nemir, M., Croquelois, A., Pedrazzini, T. and Radtke, F. (2006). Induction of cardiogenesis in embryonic stem cells via downregulation of Notch1 signaling. *Circ Res* **98**, 1471-8.

Neumann, C. J. and Nusslein-Volhard, C. (2000). Patterning of the zebrafish retina by a wave of sonic hedgehog activity. *Science* **289**, 2137-9.

Nguyen, M. and Arnheiter, H. (2000). Signaling and transcriptional regulation in early mammalian eye development: a link between FGF and MITF. *Development* **127**, 3581-91.

Nichane, M., de Croze, N., Ren, X., Souopgui, J., Monsoro-Burq, A. H. and Bellefroid, E. J. (2008a). Hairy2-Id3 interactions play an essential role in *Xenopus* neural crest progenitor specification. *Dev Biol* **322**, 355-67.

Nichane, M., Ren, X., Souopgui, J. and Bellefroid, E. J. (2008b). Hairy2 functions through both DNA-binding and non DNA-binding mechanisms at the neural plate border in *Xenopus*. *Dev Biol* **322**, 368-80.

Nieuwkoop, P. D. and Faber, J. (1994). Normal Table of *Xenopus Laevis* (Daudin): A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg till the End of Metamorphosis. *Garland Pub, New York*.

Ninkovic, J., Stigloher, C., Lillesaar, C. and Bally-Cuif, L. (2008). Gsk3beta/PKA and Gli1 regulate the maintenance of neural progenitors at the midbrain-hindbrain boundary in concert with E(Spl) factor activity. *Development* **135**, 3137-48.

Ninkovic, J., Tallafuss, A., Leucht, C., Topczewski, J., Tannhauser, B., Solnica-Krezel, L. and Bally-Cuif, L. (2005). Inhibition of neurogenesis at the zebrafish midbrain-hindbrain boundary by the combined and dose-dependent activity of a new hairy/E(spl) gene pair. *Development* **132**, 75-88.

Norton, J. D. (2000). ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci* **113 (Pt 22)**, 3897-905.

Nowakowski, R. S., Lewin, S. B. and Miller, M. W. (1989). Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol* **18**, 311-8.

Ohnuma, S., Hopper, S., Wang, K. C., Philpott, A. and Harris, W. A. (2002a). Coordinating retinal histogenesis: early cell cycle exit enhances early cell fate determination in the *Xenopus* retina. *Development* **129**, 2435-46.

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

Ohnuma, S., Philpott, A., Wang, K., Holt, C. E. and Harris, W. A. (1999). p27^{Xic1}, a Cdk inhibitor, promotes the determination of glial cells in *Xenopus* retina. *Cell* **99**, 499-510.

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

Ohtsuka, T., Imayoshi, I., Shimojo, H., Nishi, E., Kageyama, R. and McConnell, S. K. (2006). Visualization of embryonic neural stem cells using Hes promoters in transgenic mice. *Mol Cell Neurosci* **31**, 109-22.

Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F. and Kageyama, R. (1999). Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J* **18**, 2196-207.

Ohtsuka, T., Sakamoto, M., Guillemot, F. and Kageyama, R. (2001). Roles of the basic helix-loop-helix genes Hes1 and Hes5 in expansion of neural stem cells of the developing brain. *J Biol Chem* **276**, 30467-74.

Ooto, S., Akagi, T., Kageyama, R., Akita, J., Mandai, M., Honda, Y. and 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.

Osakada, F., Ooto, S., Akagi, T., Mandai, M., Akaike, A. and Takahashi, M. (2007). Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals. *J Neurosci* **27**, 4210-9.

Osakada, F. and Takahashi, M. (2009). Drug development targeting the glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta)-mediated signal transduction pathway: targeting the Wnt pathway and transplantation therapy as strategies for retinal repair. *J Pharmacol Sci* **109**, 168-73.

Pai, V. P., Aw, S., Shomrat, T., Lemire, J. M. and Levin, M. (2012). Transmembrane voltage potential controls embryonic eye patterning in *Xenopus laevis*. *Development* **139**, 313-23.

Palmeirim, I., Henrique, D., Ish-Horowicz, D. and Pourquie, O. (1997). Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell* **91**, 639-48.

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* DOI: **10.1002/dneu.20973**.

Park, H. C., Boyce, J., Shin, J. and Appel, B. (2005). Oligodendrocyte specification in zebrafish requires notch-regulated cyclin-dependent kinase inhibitor function. *J Neurosci* **25**, 6836-44.

Peco, E., Escude, T., Agius, E., Sabado, V., Medevielle, F., Ducommun, B. and Pituello, F. (2012). The CDC25B phosphatase shortens the G2 phase of neural progenitors and promotes efficient neuron production. *Development* **139**, 1095-104.

Pellegrinet, L., Rodilla, V., Liu, Z., Chen, S., Koch, U., Espinosa, L., Kaestner, K. H., Kopan, R., Lewis, J. and Radtke, F. (2011). Dll1- and dll4-mediated notch signaling are required for homeostasis of intestinal stem cells. *Gastroenterology* **140**, 1230-1240 e1-7.

Pellegrini, G., De Luca, M. and Arsenijevic, Y. (2007). Towards therapeutic application of ocular stem cells. *Semin Cell Dev Biol* **18**, 805-18.

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**, 1565-77.

Perron, M. and Harris, W. A. (2000). 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., 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.

Pittack, C., Grunwald, G. B. and Reh, T. A. (1997). Fibroblast growth factors are necessary for neural retina but not pigmented epithelium differentiation in chick embryos. *Development* **124**, 805-16.

Pitto, L. and Cremisi, F. (2010). Timing neurogenesis by cell cycle? *Cell Cycle* **9**, 434-5.

Poggi, L., Zolessi, F. R. and Harris, W. A. (2005). Time-lapse analysis of retinal differentiation. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 676-81.

Pollet, N., Delius, H. and Niehrs, C. (2003). In situ analysis of gene expression in *Xenopus* embryos. *C R Biol* **326**, 1011-7.

Radosevic, M., Robert-Moreno, A., Coolen, M., Bally-Cuif, L. and Alsina, B. (2011). Her9 represses neurogenic fate downstream of Tbx1 and retinoic acid signaling in the inner ear. *Development* **138**, 397-408.

Ramachandran, R., Zhao, X. F. and Goldman, D. (2011). Ascl1a/Dkk/beta-catenin signaling pathway is necessary and glycogen synthase kinase-3beta inhibition is sufficient for zebrafish retina regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 15858-63.

Rankin, S. A., Hasebe, T., Zorn, A. M. and Buchholz, D. R. (2009). Improved cre reporter transgenic *Xenopus*. *Dev Dyn* **238**, 2401-8.

Rapaport, D. H., Patheal, S. L. and Harris, W. A. (2001). Cellular competence plays a role in photoreceptor differentiation in the developing *Xenopus* retina. *J Neurobiol* **49**, 129-41.

Raymond, P. A., Barthel, L. K., Bernardos, R. L. and Perkowski, J. J. (2006). Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC Dev Biol* **6**, 36.

Reh, T. A. and Constantine-Paton, M. (1983). Qualitative and quantitative measures of plasticity during the normal development of the *Rana pipiens* retinotectal projection. *Brain Res* **312**, 187-200.

Riccio, O., van Gijn, M. E., Bezdek, A. C., Pellegrinet, L., van Es, J. H., Zimmer-Strobl, U., Strobl, L. J., Honjo, T., Clevers, H. and Radtke, F. (2008). Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2. *EMBO Rep* **9**, 377-83.

Ridgway, P., Quivy, J. P. and Almouzni, G. (2000). Tetracycline-regulated gene expression switch in *Xenopus laevis*. *Exp Cell Res* **256**, 392-9.

Roose, M., Sauert, K., Turan, G., Solomentsev, N., Werdien, D., Pramanik, K., Senkel, S., Ryffel, G. U. and Waldner, C. (2009). Heat-shock inducible Cre strains to study organogenesis in transgenic *Xenopus laevis*. *Transgenic Res* **18**, 595-605.

Rothenaigner, I., Krecsmarik, M., Hayes, J. A., Bahn, B., Lepier, A., Fortin, G., Gotz, M., Jagasia, R. and Bally-Cuif, L. (2011). Clonal analysis by distinct viral vectors identifies bona fide neural stem cells in the adult zebrafish telencephalon and characterizes their division properties and fate. *Development* **138**, 1459-69.

Ruiz i Altaba, A., Palma, V. and Dahmane, N. (2002). Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci* **3**, 24-33.

Saga, Y. (2012). The mechanism of somite formation in mice. *Curr Opin Genet Dev.*

Sakagami, K., Gan, L. and Yang, X. J. (2009). Distinct effects of Hedgehog signaling on neuronal fate specification and cell cycle progression in the embryonic mouse retina. *J Neurosci* **29**, 6932-44.

Sancho-Pelluz, J., Arango-Gonzalez, B., Kustermann, S., Romero, F. J., van Veen, T., Zrenner, E., Ekstrom, P. and Paquet-Durand, F. (2008). Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration. *Mol Neurobiol* **38**, 253-69.

Sang, L. and Coller, H. A. (2009). Fear of commitment: Hes1 protects quiescent fibroblasts from irreversible cellular fates. *Cell Cycle* **8**, 2161-7.

Sang, L., Coller, H. A. and Roberts, J. M. (2008). Control of the reversibility of cellular quiescence by the transcriptional repressor HES1. *Science* **321**, 1095-100.

Sang, L., Roberts, J. M. and Coller, H. A. (2010). Hijacking HES1: how tumors co-opt the anti-differentiation strategies of quiescent cells. *Trends Mol Med* **16**, 17-26.

Sasagawa, S., Takabatake, T., Takabatake, Y., Muramatsu, T. and Takeshima, K. (2002). Improved mRNA electroporation method for *Xenopus* neurula embryos. *Genesis* **33**, 81-5.

Sasai, Y., Kageyama, R., Tagawa, Y., Shigemoto, R. and Nakanishi, S. (1992). Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila* hairy and Enhancer of split. *Genes Dev* **6**, 2620-34.

Scheer, N., Groth, A., Hans, S. and Campos-Ortega, J. A. (2001). An instructive function for Notch in promoting gliogenesis in the zebrafish retina. *Development* **128**, 1099-107.

Schroeder, T., Fraser, S. T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Oka, C., Bornkamm, G. W., Honjo, T. and Just, U. (2003). Recombination signal sequence-binding protein Jkappa alters mesodermal cell fate decisions by suppressing cardiomyogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4018-23.

Schwanbeck, R., Martini, S., Bernoth, K. and Just, U. (2011). The Notch signaling pathway: molecular basis of cell context dependency. *Eur J Cell Biol* **90**, 572-81.

Schwarz, M., Cecconi, F., Bernier, G., Andrejewski, N., Kammandel, B., Wagner, M. and Gruss, P. (2000). Spatial specification of mammalian eye territories by reciprocal transcriptional repression of Pax2 and Pax6. *Development* **127**, 4325-34.

Schwarz, T. J., Ebert, B. and Lie, D. C. (2012). Stem cell maintenance in the adult mammalian hippocampus: A matter of signal integration? *Dev Neurobiol* **72**, 1006-15.

Scott, E. K., Mason, L., Arrenberg, A. B., Ziv, L., Gosse, N. J., Xiao, T., Chi, N. C., Asakawa, K., Kawakami, K. and Baier, H. (2007). Targeting neural circuitry in zebrafish using GAL4 enhancer trapping. *Nat Methods* **4**, 323-6.

Sernagor, E. (2006). Synaptogenesis and early neural activity. *Retinal Development* **24**, 265-283.

Shih, H. P., Kopp, J. L., Sandhu, M., Dubois, C. L., Seymour, P. A., Grapin-Botton, A. and Sander, M. (2012). A Notch-dependent molecular circuitry initiates pancreatic endocrine and ductal cell differentiation. *Development* **139**, 2488-99.

Shimojo, H., Ohtsuka, T. and Kageyama, R. (2008). Oscillations in notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. *Neuron* **58**, 52-64.

- Shimojo, H., Ohtsuka, T. and Kageyama, R.** (2011). Dynamic expression of notch signaling genes in neural stem/progenitor cells. *Front Neurosci* **5**, 78.
- Shkumatava, A., Fischer, S., Muller, F., Strahle, U. and Neumann, C. J.** (2004). Sonic hedgehog, secreted by amacrine cells, acts as a short-range signal to direct differentiation and lamination in the zebrafish retina. *Development* **131**, 3849-58.
- Shkumatava, A. and Neumann, C. J.** (2005). Shh directs cell-cycle exit by activating p57Kip2 in the zebrafish retina. *EMBO Rep* **6**, 563-9.
- Silva, A. O., Ercole, C. E. and McLoon, S. C.** (2003). Regulation of ganglion cell production by Notch signaling during retinal development. *J Neurobiol* **54**, 511-24.
- Sive, H. L., Grainger, R. M. and Harland, R. M.** (2000). Early development of *Xenopus laevis* : A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*.
- Spence, J. R., Aycinena, J. C. and Del Rio-Tsonis, K.** (2007a). Fibroblast growth factor-hedgehog interdependence during retina regeneration. *Dev Dyn* **236**, 1161-74.
- Spence, J. R., Madhavan, M., Aycinena, J. C. and Del Rio-Tsonis, K.** (2007b). Retina regeneration in the chick embryo is not induced by spontaneous Mitf downregulation but requires FGF/FGFR/MEK/Erk dependent upregulation of Pax6. *Mol Vis* **13**, 57-65.
- Spence, J. R., Madhavan, M., Ewing, J. D., Jones, D. K., Lehman, B. M. and Del Rio-Tsonis, K.** (2004). The hedgehog pathway is a modulator of retina regeneration. *Development* **131**, 4607-21.
- Steinbeisser, H., Fainsod, A., Niehrs, C., Sasai, Y. and De Robertis, E. M.** (1995). The role of gsc and BMP-4 in dorsal-ventral patterning of the marginal zone in *Xenopus*: a loss-of-function study using antisense RNA. *EMBO J* **14**, 5230-43.
- Stenkamp, D. L., Frey, R. A., Prabhudesai, S. N. and Raymond, P. A.** (2000). Function for Hedgehog genes in zebrafish retinal development. *Dev Biol* **220**, 238-52.
- Stephens, W. Z., Senecal, M., Nguyen, M. and Piotrowski, T.** (2010). Loss of adenomatous polyposis coli (apc) results in an expanded ciliary marginal zone in the zebrafish eye. *Dev Dyn* **239**, 2066-77.
- Stigloher, C., Chapouton, P., Adolf, B. and Bally-Cuif, L.** (2008). Identification of neural progenitor pools by E(Spl) factors in the embryonic and adult brain. *Brain Res Bull* **75**, 266-73.
- Stockhausen, M. T., Sjolund, J. and Axelson, H.** (2005). Regulation of the Notch target gene Hes-1 by TGFalpha induced Ras/MAPK signaling in human neuroblastoma cells. *Exp Cell Res* **310**, 218-28.

Sumazaki, R., Shiojiri, N., Isoyama, S., Masu, M., Keino-Masu, K., Osawa, M., Nakauchi, H., Kageyama, R. and Matsui, A. (2004). Conversion of biliary system to pancreatic tissue in Hes1-deficient mice. *Nat Genet* **36**, 83-7.

Taelman, V., Van Campenhout, C., Solter, M., Pieler, T. and Bellefroid, E. J. (2006). The Notch-effector HRT1 gene plays a role in glomerular development and patterning of the *Xenopus* pronephros anlagen. *Development* **133**, 2961-71.

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.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-72.

Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-76.

Takahashi, M., Palmer, T. D., Takahashi, J. and Gage, F. H. (1998). Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina. *Mol Cell Neurosci* **12**, 340-8.

Takashima, S. and Hartenstein, V. (2012). Genetic control of intestinal stem cell specification and development: a comparative view. *Stem Cell Rev* **8**, 597-608.

Takatsuka, K., Hatakeyama, J., Bessho, Y. and Kageyama, R. (2004). Roles of the bHLH gene Hes1 in retinal morphogenesis. *Brain Res* **1004**, 148-55.

Tallafuss, A. and Bally-Cuif, L. (2003). Tracing of her5 progeny in zebrafish transgenics reveals the dynamics of midbrain-hindbrain neurogenesis and maintenance. *Development* **130**, 4307-23.

Terada, K., Kitayama, A., Kanamoto, T., Ueno, N. and Furukawa, T. (2006). Nucleosome regulator Xhmg3 is required for cell proliferation of the eye and brain as a downstream target of *Xenopus* rax/Rx1. *Dev Biol* **291**, 398-412.

Tiedemann, H. B., Schneltzer, E., Zeiser, S., Hoesel, B., Beckers, J., Przemeck, G. K. and de Angelis, M. H. (2012). From dynamic expression patterns to boundary formation in the presomitic mesoderm. *PLoS Comput Biol* **8**, e1002586.

Tomita, K., Ishibashi, M., Nakahara, K., Ang, S. L., Nakanishi, S., Guillemot, F. and Kageyama, R. (1996). Mammalian hairy and Enhancer of split homolog 1 regulates differentiation of retinal neurons and is essential for eye morphogenesis. *Neuron* **16**, 723-34.

- Tran, H. T., Sekkali, B., Van Imschoot, G., Janssens, S. and Vleminckx, K.** (2010). Wnt/beta-catenin signaling is involved in the induction and maintenance of primitive hematopoiesis in the vertebrate embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 16160-5.
- Trimarchi, J. M., Stadler, M. B. and Cepko, C. L.** (2008). Individual retinal progenitor cells display extensive heterogeneity of gene expression. *PLoS One* **3**, e1588.
- Tropepe, V., Coles, B. L., Chiasson, B. J., Horsford, D. J., Elia, A. J., McInnes, R. R. and van der Kooy, D.** (2000). Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* **287**, 2032-6.
- Tsuji, S., Cho, K. W. and Hashimoto, C.** (2003). Expression pattern of a basic helix-loop-helix transcription factor Xhair2b during *Xenopus laevis* development. *Dev Genes Evol* **213**, 407-11.
- Turner, D. L., Snyder, E. Y. and Cepko, C. L.** (1990). Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron* **4**, 833-45.
- Ueo, T., Imayoshi, I., Kobayashi, T., Ohtsuka, T., Seno, H., Nakase, H., Chiba, T. and Kageyama, R.** (2012). The role of Hes genes in intestinal development, homeostasis and tumor formation. *Development* **139**, 1071-82.
- van Amerongen, R. and Nusse, R.** (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* **136**, 3205-14.
- van Es, J. H., van Gijn, M. E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D. J., Radtke, F. et al.** (2005). Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* **435**, 959-63.
- Van Raay, T. J., Moore, K. B., Iordanova, I., Steele, M., Jamrich, M., Harris, W. A. and Vetter, M. L.** (2005). Frizzled 5 signaling governs the neural potential of progenitors in the developing *Xenopus* retina. *Neuron* **46**, 23-36.
- Van Raay, T. J. and Vetter, M. L.** (2004). Wnt/frizzled signaling during vertebrate retinal development. *Dev Neurosci* **26**, 352-8.
- VanDussen, K. L., Carulli, A. J., Keeley, T. M., Patel, S. R., Puthoff, B. J., Magness, S. T., Tran, I. T., Maillard, I., Siebel, C., Kolterud, A. et al.** (2012). Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development* **139**, 488-97.
- Vergara, M. N. and Del Rio-Tsonis, K.** (2009). Retinal regeneration in the *Xenopus laevis* tadpole: a new model system. *Mol Vis* **15**, 1000-13.

- Vernon, A. E. and Philpott, A.** (2003). The developmental expression of cell cycle regulators in *Xenopus laevis*. *Gene Expr Patterns* **3**, 179-92.
- Vetter, M. L. and Brown, N. L.** (2001). The role of basic helix-loop-helix genes in vertebrate retinogenesis. *Semin Cell Dev Biol* **12**, 491-8.
- Viczian, A. S., Bang, A. G., Harris, W. A. and Zuber, M. E.** (2006). Expression of *Xenopus laevis* Lhx2 during eye development and evidence for divergent expression among vertebrates. *Dev Dyn* **235**, 1133-41.
- Viczian, A. S., Solessio, E. C., Lyou, Y. and Zuber, M. E.** (2009). Generation of functional eyes from pluripotent cells. *PLoS Biol* **7**, e1000174.
- Waldner, C., Sakamaki, K., Ueno, N., Turan, G. and Ryffel, G. U.** (2006). Transgenic *Xenopus laevis* strain expressing cre recombinase in muscle cells. *Dev Dyn* **235**, 2220-8.
- Wall, D. S., Mears, A. J., McNeill, B., Mazerolle, C., Thurig, S., Wang, Y., Kageyama, R. and Wallace, V. A.** (2009). Progenitor cell proliferation in the retina is dependent on Notch-independent Sonic hedgehog/Hes1 activity. *J Cell Biol* **184**, 101-12.
- Wallace, V. A.** (2008). Proliferative and cell fate effects of Hedgehog signaling in the vertebrate retina. *Brain Res* **1192**, 61-75.
- Wan, J., Zheng, H., Chen, Z. L., Xiao, H. L., Shen, Z. J. and Zhou, G. M.** (2008). Preferential regeneration of photoreceptor from Muller glia after retinal degeneration in adult rat. *Vision Res* **48**, 223-34.
- Wan, J., Zheng, H., Xiao, H. L., She, Z. J. and Zhou, G. M.** (2007). Sonic hedgehog promotes stem-cell potential of Muller glia in the mammalian retina. *Biochem Biophys Res Commun* **363**, 347-54.
- 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.
- Wang, Y., Dakubo, G. D., Thurig, S., Mazerolle, C. J. and 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.
- Wang, Y. P., Dakubo, G., Howley, P., Campsall, K. D., Mazarolle, C. J., Shiga, S. A., Lewis, P. M., McMahon, A. P. and Wallace, V. A.** (2002). Development of normal retinal organization depends on Sonic hedgehog signaling from ganglion cells. *Nat Neurosci* **5**, 831-2.

Webb, K. J., Coolen, M., Gloeckner, C. J., Stigloher, C., Bahn, B., Topp, S., Ueffing, M. and Bally-Cuif, L. (2011). The Enhancer of split transcription factor Her8a is a novel dimerisation partner for Her3 that controls anterior hindbrain neurogenesis in zebrafish. *BMC Dev Biol* **11**, 27.

Wehman, A. M., Staub, W., Meyers, J. R., Raymond, P. A. and Baier, H. (2005). Genetic dissection of the zebrafish retinal stem-cell compartment. *Dev Biol* **281**, 53-65.

Werdien, D., Peiler, G. and Ryffel, G. U. (2001). FLP and Cre recombinase function in *Xenopus* embryos. *Nucleic Acids Res* **29**, E53-3.

Westenskow, P. D., McKean, J. B., Kubo, F., Nakagawa, S. and Fuhrmann, S. (2010). Ectopic Mitf in the embryonic chick retina by co-transfection of beta-catenin and Otx2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**, 5328-35.

Wetts, R. and Fraser, S. E. (1988). Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina. *Science* **239**, 1142-5.

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**, 254-63.

Wettstein, D. A., Turner, D. L. and Kintner, C. (1997). The *Xenopus* homolog of *Drosophila* Suppressor of Hairless mediates Notch signaling during primary neurogenesis. *Development* **124**, 693-702.

Wheeler, G. N., Hamilton, F. S. and Hoppler, S. (2000). Inducible gene expression in transgenic *Xenopus* embryos. *Curr Biol* **10**, 849-52.

White, E. and DiPaola, R. S. (2009). The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res* **15**, 5308-16.

Wilson, J. M., Sato, K., Chernoff, E. A. and Belecky-Adams, T. L. (2007). Expression patterns of chick Musashi-1 in the developing nervous system. *Gene Expr Patterns* **7**, 817-25.

Witkovsky, P., Gallin, E., Hollyfield, J. G., Ripps, H. and Bridges, C. D. (1976). Photoreceptor thresholds and visual pigment levels in normal and vitamin A-deprived *Xenopus* tadpoles. *J Neurophysiol* **39**, 1272-87.

Xu, H., Sta Iglesia, D. D., Kielczewski, J. L., Valenta, D. F., Pease, M. E., Zack, D. J. and Quigley, H. A. (2007a). Characteristics of progenitor cells derived from adult ciliary body in mouse, rat, and human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**, 1674-82.

Xu, S., Sunderland, M. E., Coles, B. L., Kam, A., Holowacz, T., Ashery-Padan, R., Marquardt, T., McInnes, R. R. and van der Kooy, D. (2007b). The proliferation and expansion of retinal stem cells require functional Pax6. *Dev Biol* **304**, 713-21.

Xue, X. and Harris, W. (2011). Using myc genes to search for stem cells in the ciliary margin of the *Xenopus* Retina. *Dev Neurobiol* DOI: [10.1002/dneu.20887](https://doi.org/10.1002/dneu.20887).

Yamaguchi, M., Tonou-Fujimori, N., Komori, A., Maeda, R., Nojima, Y., Li, H., Okamoto, H. and Masai, I. (2005). Histone deacetylase 1 regulates retinal neurogenesis in zebrafish by suppressing Wnt and Notch signaling pathways. *Development* **132**, 3027-43.

Yamaguti, M., Cho, K. W. and Hashimoto, C. (2005). *Xenopus* hairy2b specifies anterior prechordal mesoderm identity within Spemann's organizer. *Dev Dyn* **234**, 102-13.

Yang, X. J. (2004). Roles of cell-extrinsic growth factors in vertebrate eye pattern formation and retinogenesis. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 91-103.

Yoshii, C., Ueda, Y., Okamoto, M. and 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.

Young, M. J., Ray, J., Whiteley, S. J., Klassen, H. and Gage, F. H. (2000). 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.

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. et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-20.

Yurco, P. and Cameron, D. A. (2005). Responses of Muller glia to retinal injury in adult zebrafish. *Vision Res* **45**, 991-1002.

Yurco, P. and Cameron, D. A. (2007). Cellular correlates of proneural and Notch-delta gene expression in the regenerating zebrafish retina. *Vis Neurosci* **24**, 437-43.

Zaghloul, N. A. and Moody, S. A. (2007). Alterations of rx1 and pax6 expression levels at neural plate stages differentially affect the production of retinal cell types and maintenance of retinal stem cell qualities. *Dev Biol* **306**, 222-40.

Zaghloul, N. A., Yan, B. and Moody, S. A. (2005). Step-wise specification of retinal stem cells during normal embryogenesis. *Biol Cell* **97**, 321-37.

Zhang, J., Gray, J., Wu, L., Leone, G., Rowan, S., Cepko, C. L., Zhu, X., Craft, C. M. and Dyer, M. A. (2004). Rb regulates proliferation and rod photoreceptor development in the mouse retina. *Nat Genet* **36**, 351-60.

Zhang, X. M. and Yang, X. J. (2001). Regulation of retinal ganglion cell production by Sonic hedgehog. *Development* **128**, 943-57.

Zhou, Y., Ching, Y. P., Kok, K. H., Kung, H. F. and Jin, D. Y. (2002). Post-transcriptional suppression of gene expression in *Xenopus* embryos by small interfering RNA. *Nucleic Acids Res* **30**, 1664-9.

Zuber, M. E. (2010). Eye field specification in *Xenopus laevis*. *Curr Top Dev Biol* **93**, 29-60.

Zuber, M. E., Gestri, G., Viczian, A. S., Barsacchi, G. and Harris, W. A. (2003). Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development* **130**, 5155-67.

Zuber, M. E., Perron, M., Philpott, A., Bang, A. and Harris, W. A. (1999). Giant eyes in *Xenopus laevis* by overexpression of XOptx2. *Cell* **98**, 341-52.

VI. ANNEXE

ANNEXE: ARTICLES

Article n°1

M. Locker, W. El Yakoubi, N. Mazurier, J.-P. Dullin, M. Perron (2010)

A decade of mammalian retinal stem cell research

Archives of Italian Biology

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, Djojotubro et al. pointed out that CB-derived cell lines rapidly accumulated severe chromosomal aberrations upon prolonged cultivation and demonstrated tumorigenicity (Djojotubro 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.

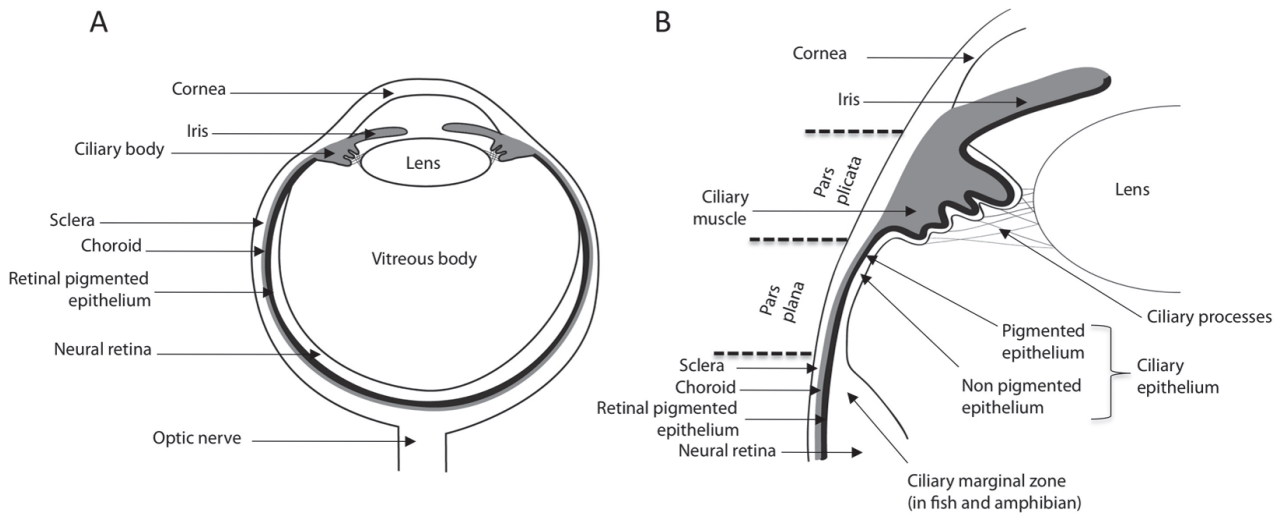


Fig. 1. - A. Schematic diagram of an adult vertebrate eye transverse section. B. Magnification of the region containing the ciliary body (CB). The CB can be subdivided in two zones: a flat region called *pars plana* and a folded one called *pars plicata*. The ciliary epithelium (CE) includes an outer 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; Djojotubroto 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 $\beta 1$ or $\beta 2$ (TGF $\beta 1/2$) 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-Smoothened* (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 ontogeny, 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-

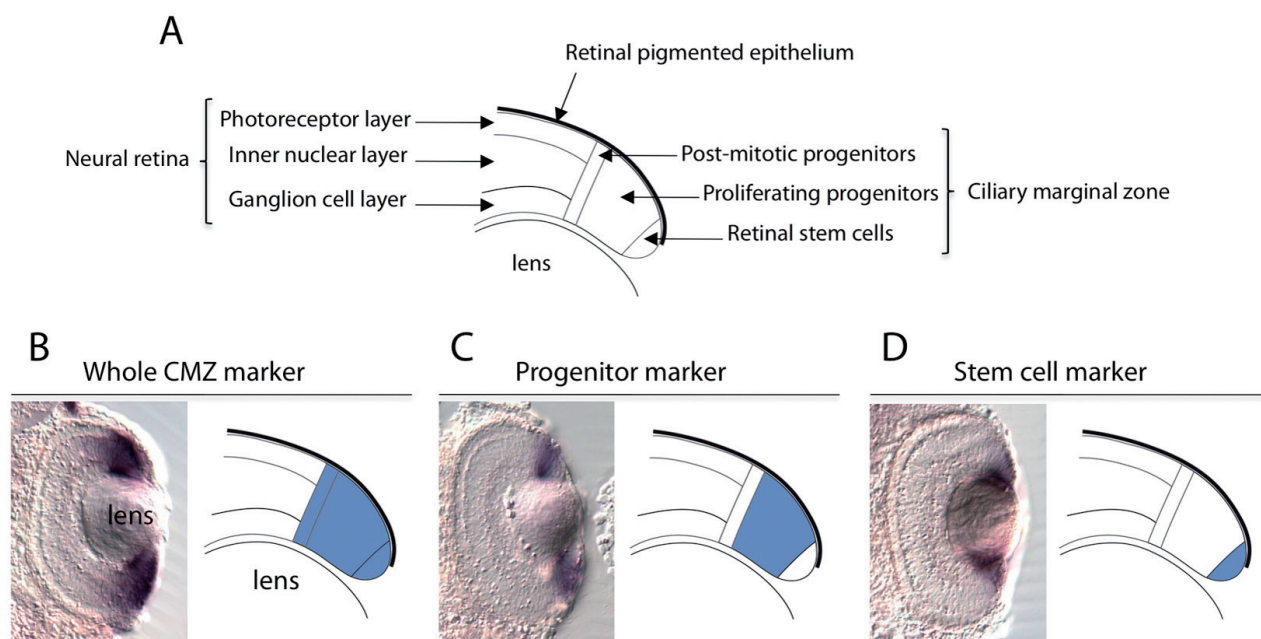


Fig. 2. - A. Schematic of a ciliary marginal zone (CMZ) in the periphery of a *Xenopus* tadpole retina at stage 41. The spatial organisation in this region mirrors the temporal sequence of retinal development, with stem cells residing in the most peripheral margin. Noticeably, the CB is not represented 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

- Abdoh 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.
- Kohno 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.

Article n°2

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

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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

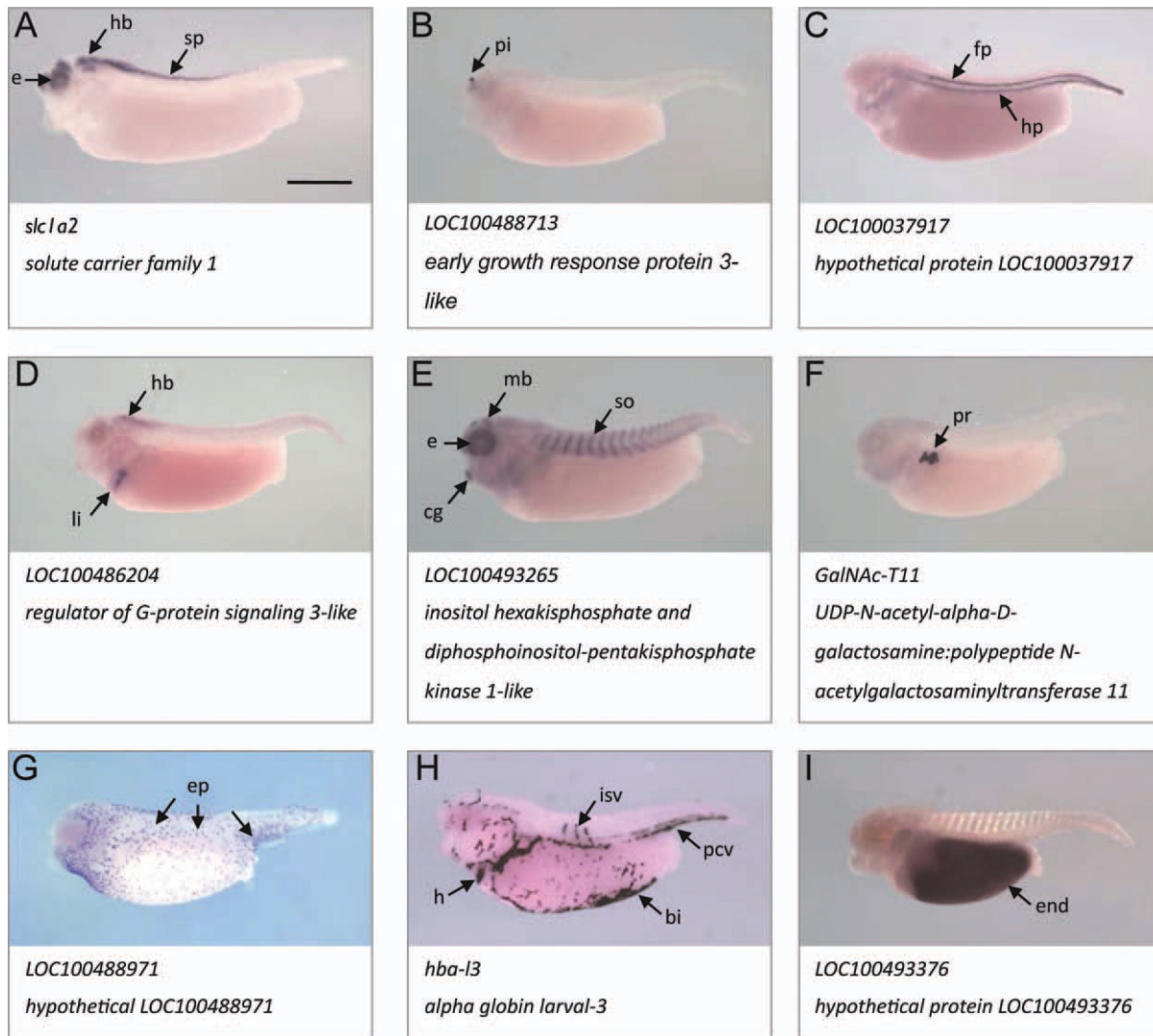


Figure 1 Diversity of whole mount expression profiles retrieved from the screen. Examples of expression patterns obtained from the screen following whole mount *in situ* hybridization on stage 39 *Xenopus tropicalis* tadpoles. As expected from the origin of the cDNA libraries, a large proportion of the 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.,

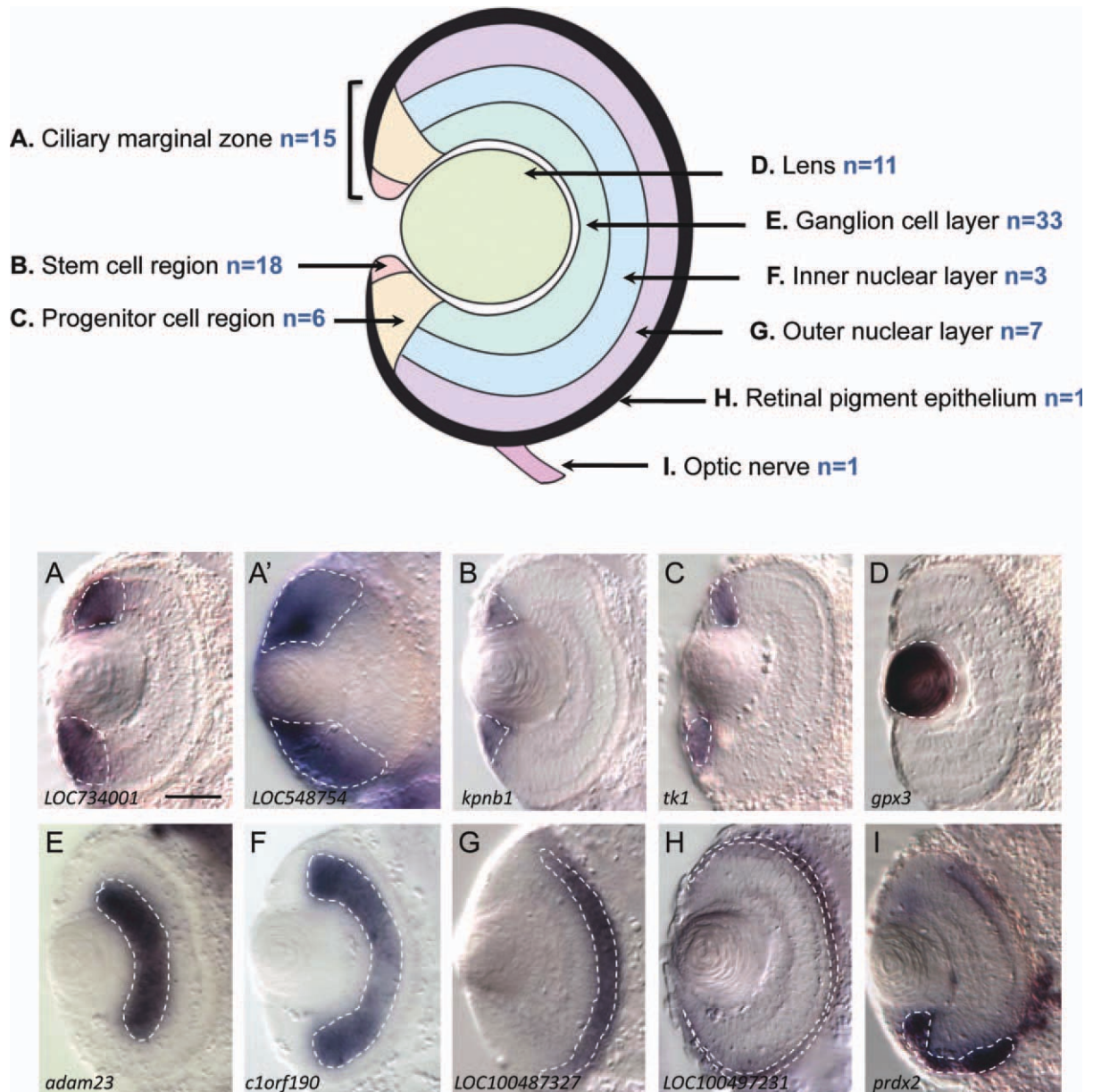


Figure 2 Classification of specific retinal markers retrieved from the screen. Schematic diagram illustrates the chosen subdivisions of the tadpole retina. n indicates the number of markers retrieved from the screen that exhibit specific expression in only one of these compartments. Pictures below are 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 μm . [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>randpl</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>mcm5p</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 (Optx2)*, 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*, *kpnb1*, *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,

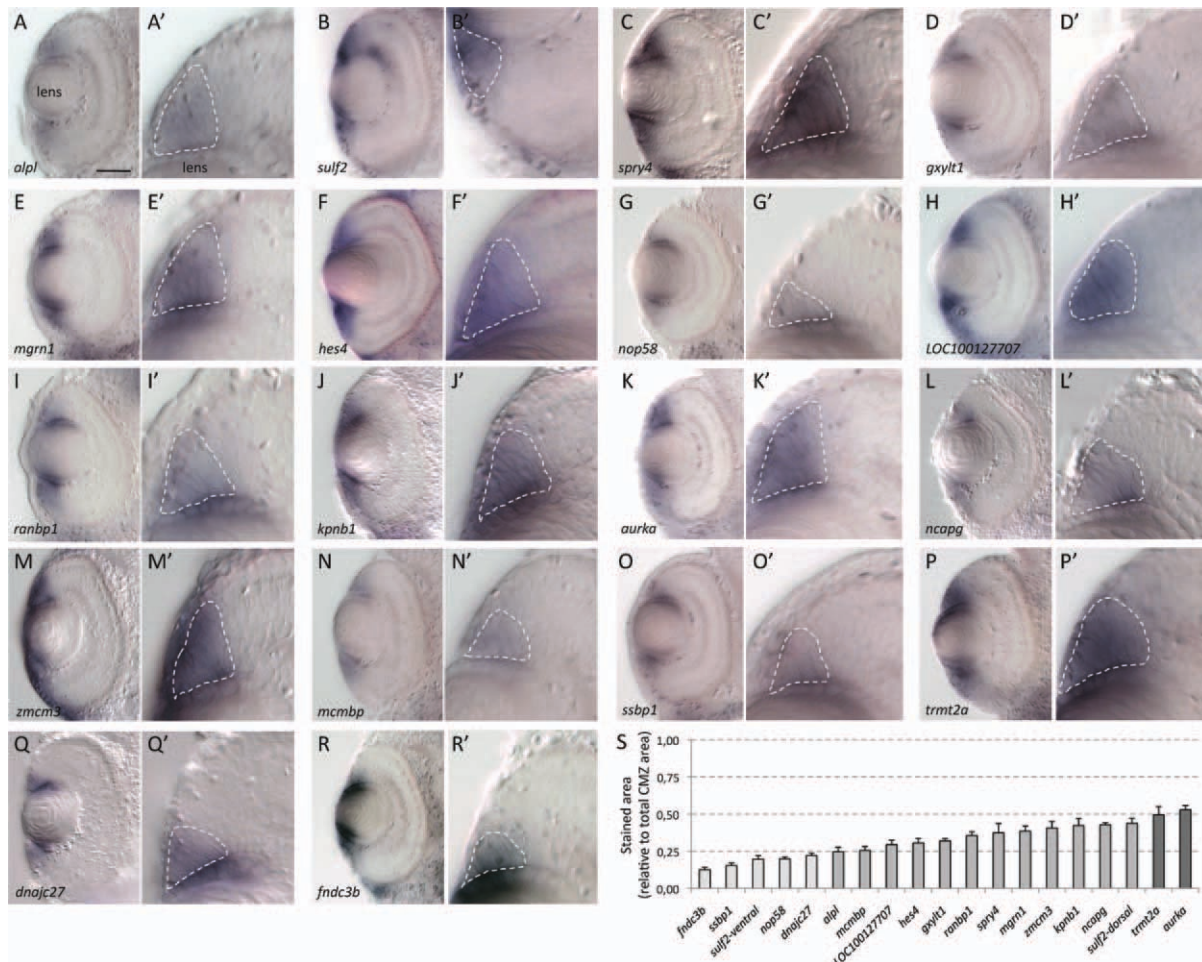


Figure 3 Novel retinal stem cell markers retrieved from the screen. A–R: Stage 39 retinal sections showing the specific expression in retinal stem cells of the 18 clones isolated from the screen (gene symbol is indicated on each panel). A'–R': Magnification of the corresponding dorsal CMZ (except for *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 [*gxylt1*; 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

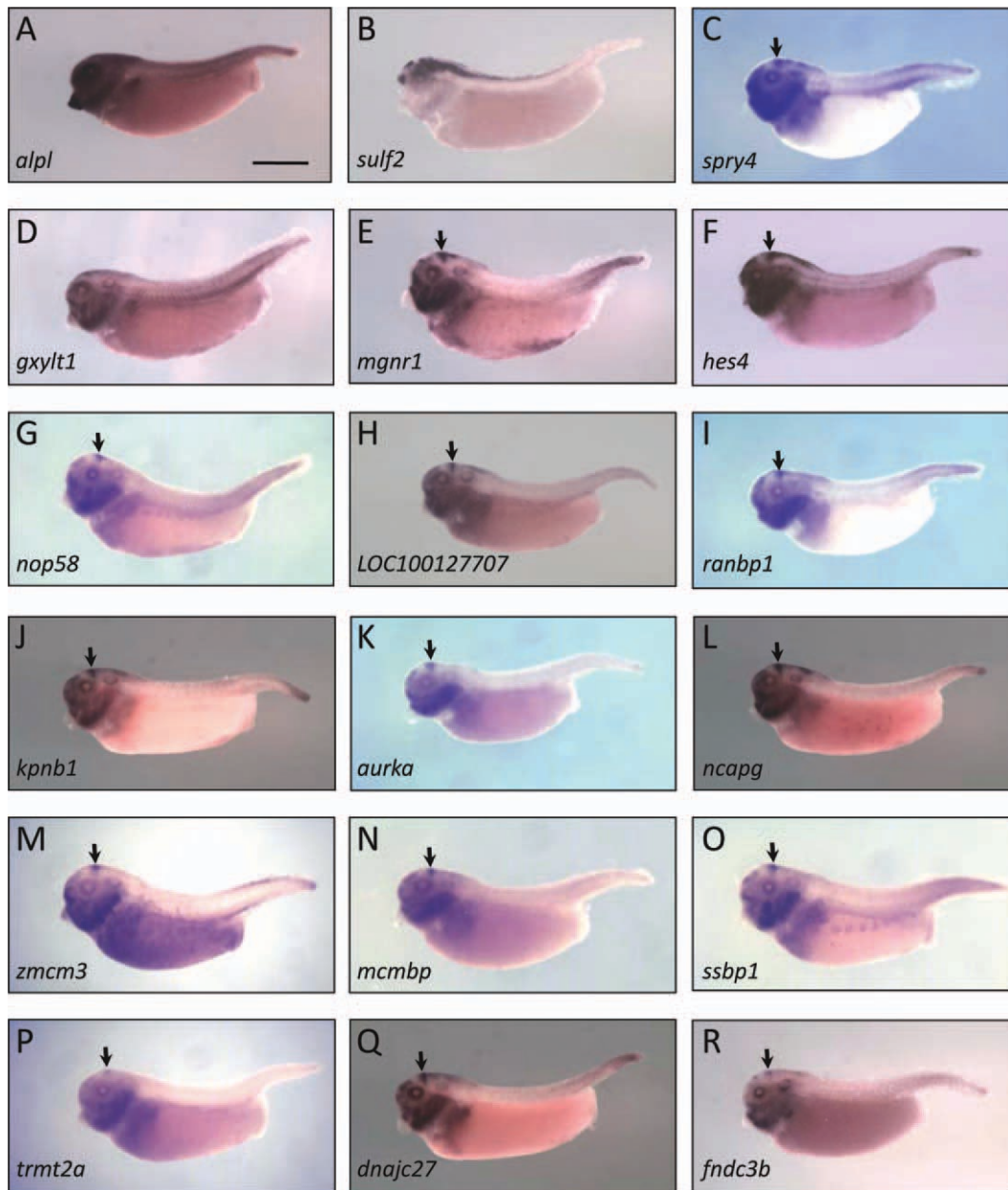


Figure 4 Expression of novel retinal stem cell markers in whole tadpoles. Whole mount expression patterns on stage 39 tadpoles of the 18 retinal stem cell markers. Most clones exhibit a strikingly similar expression profile, strongly suggesting that they form a synexpression group. In particular, in 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 μm . [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.

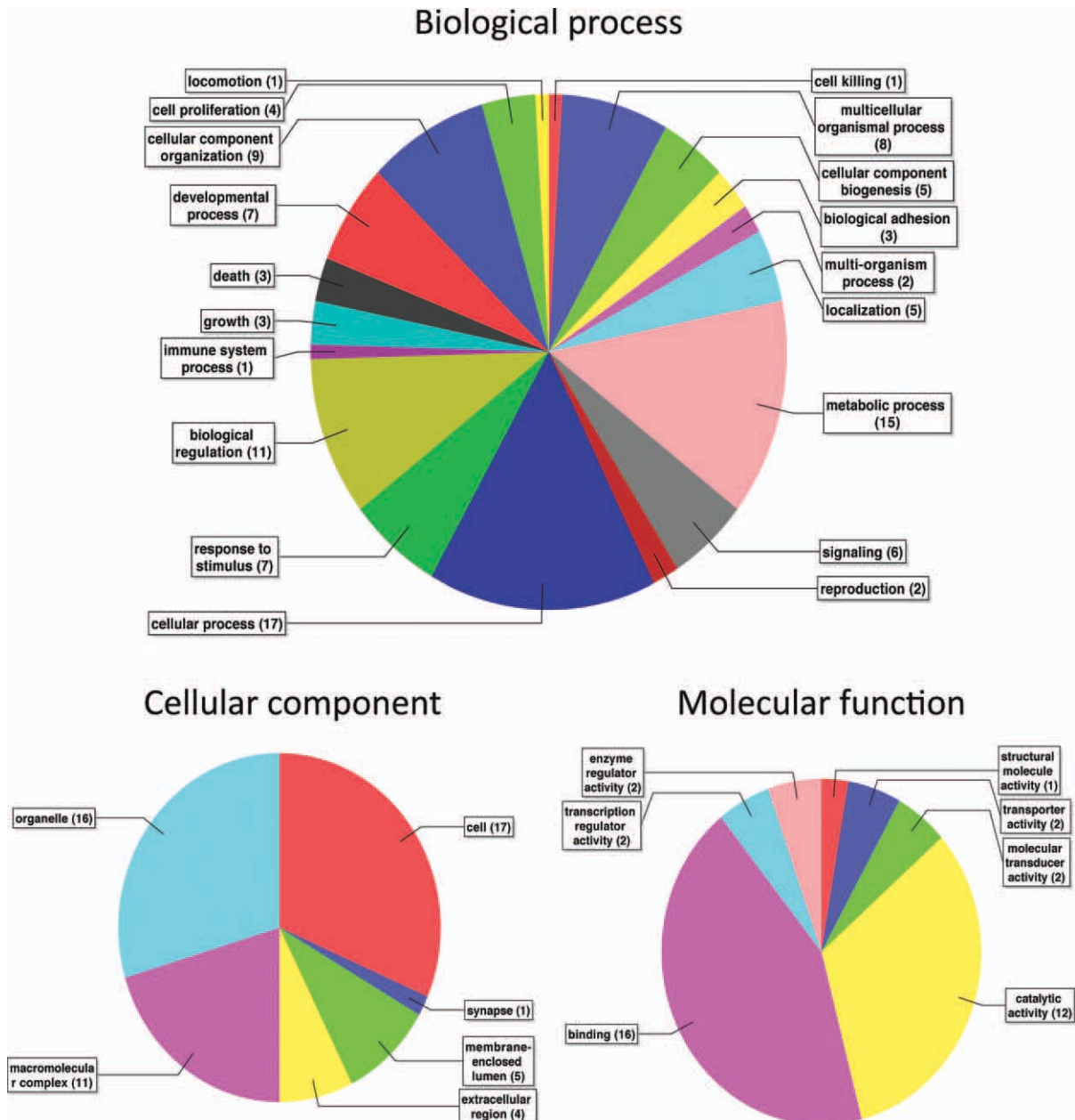


Figure 5 Combined graph of GO annotation for the 18 retinal stem cell markers retrieved from the screen. These pie charts depict the results of a GO annotation made on the 18 retinal stem cell markers using the biological process, the molecular function or the cellular component thesaurus. [Color figure 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 [mcm3p; 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

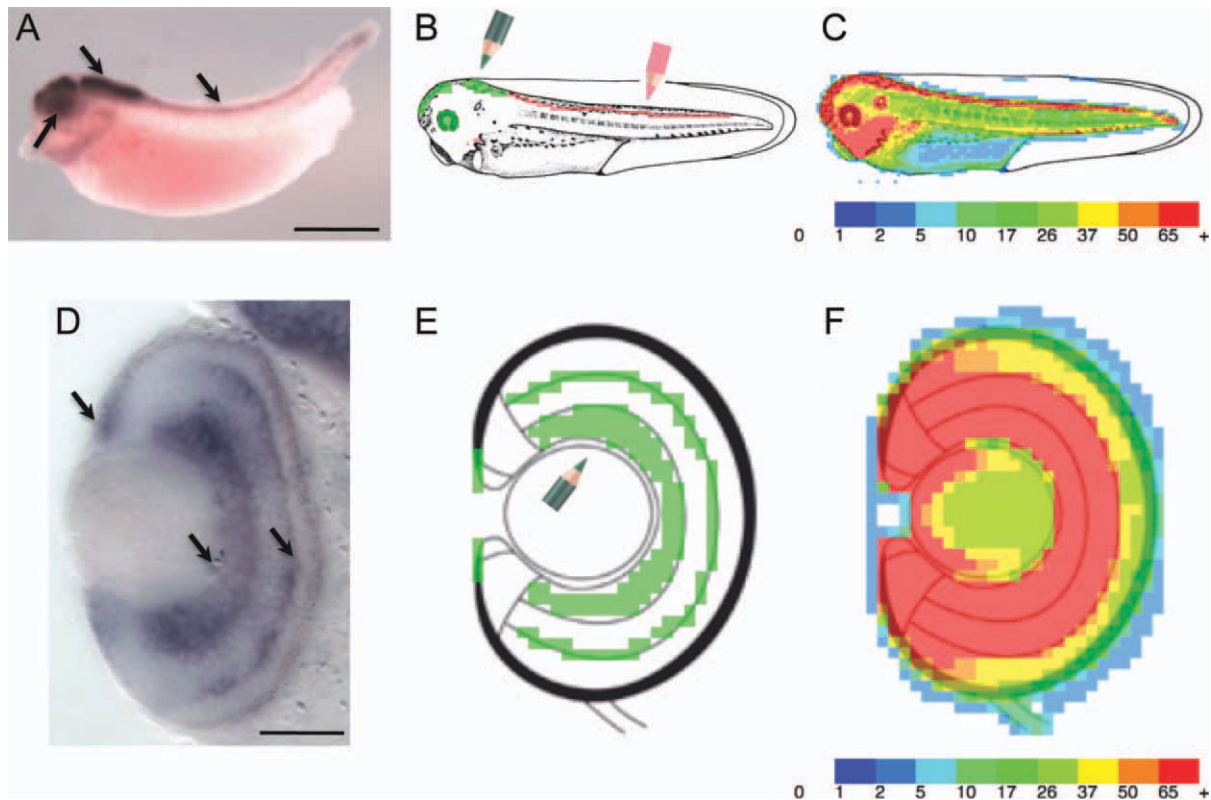


Figure 6 XenMARK annotation of *in situ* hybridization patterns from both whole tadpoles and retinal sections. Illustration of the annotation process of whole mount (A,B) or retinal (D,E) expression patterns using the XenMARK bioinformatic tool. The procedure consists in manually transferring the expression 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 pericocular 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.

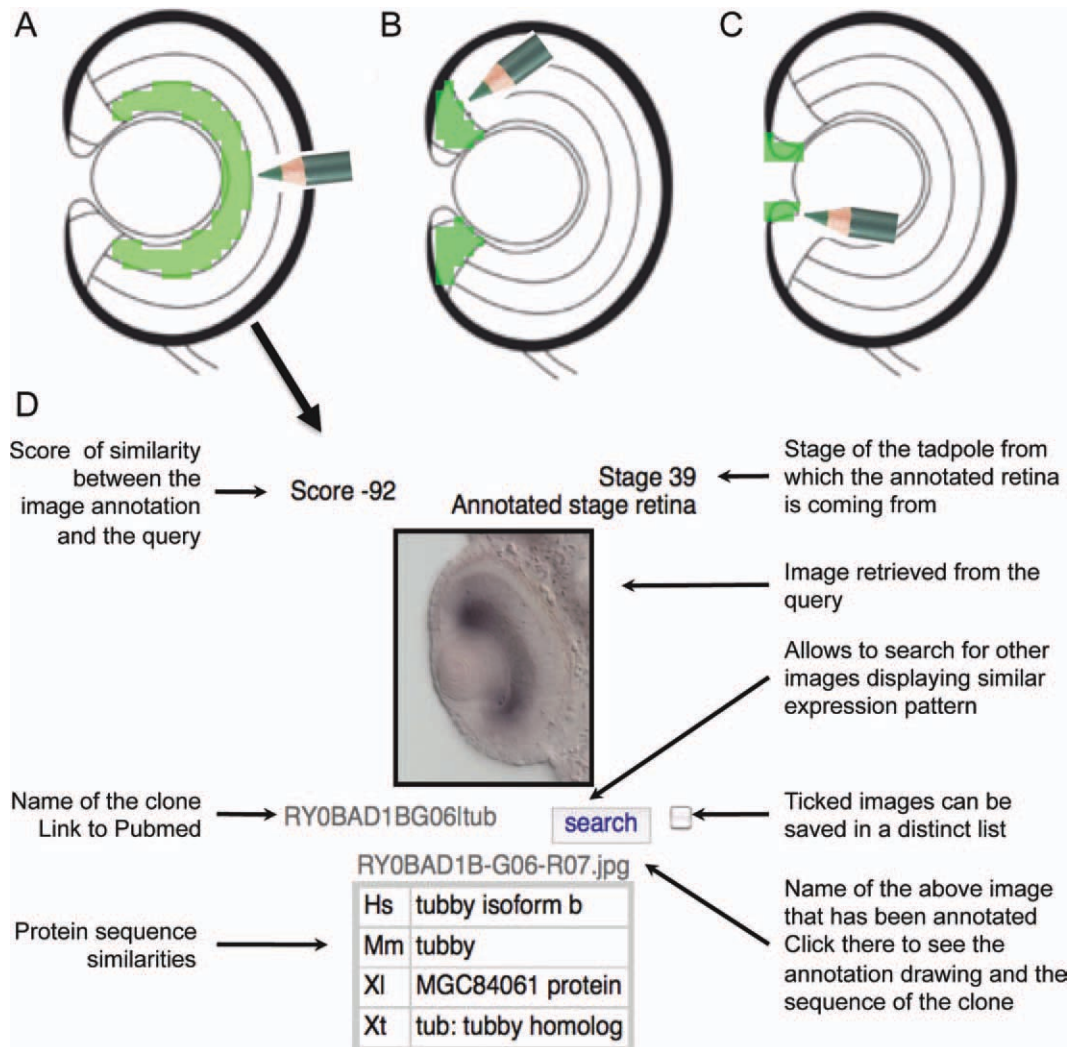


Figure 7 Retrieving retinal markers of interest from the XenMARK database. Using the “Search by expression tool,” one can mark-up the area of interest on the retinal section diagram, such as the ganglion cell layer (A), the progenitor cell region (B), or the stem cell containing area (C). Results of 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. Wholemout *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 photo-transduction. *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.
- Kermer 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-glycosylated 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.

Article n°3

Helene Auger, Raphael Thuret, Warif El Yakoubi and Nancy Papalopulu (2012)

**A Bromodeoxyuridine (BrdU) based protocol for characterizing
proliferating progenitors in *Xenopus* embryos ;**

Xenopus Protocols, 2nd edn, sous presse dans *Methods Mol. Biol.*

A Bromodeoxyuridine (BrdU) based protocol for characterizing proliferating progenitors in *Xenopus* embryos

Helene Auger^{1*}, Raphael Thuret^{1*}, Warif El Yakoubi² and Nancy Papalopulu^{1,3}

* Equal contributors

¹Faculty of Life Sciences,
Michael Smith Building
University of Manchester
Oxford Road
Manchester M13 9PT
United Kingdom

²Université Paris-Sud
UPR CNRS 3294
91405 Orsay
France

³Corresponding Author

Address:
Faculty of Life Sciences
Michael Smith Building
University of Manchester
Oxford Road
Manchester M13 9PT
UK
Phone: 0044 161-306 8907
Fax: 0044 161-275 5082
E-mail: Nancy.Papalopulu@manchester.ac.uk

Abstract

BrdU is a thymidine analogue that is incorporated into DNA during the S-phase of the cell cycle. BrdU incorporation can be used to quantify the number of cells that are in S-phase in the time period that BrdU is available. Thus, BrdU incorporation is an essential method in the quantitative analysis of cell proliferation, during normal embryonic development or after experimental manipulation. It is a reliable and versatile method that can be easily combined with immunohistochemistry and *in situ* hybridization to relate cell proliferation with gene expression. BrdU incorporation has been used in all model organisms; here, we describe a protocol adapted for use in *Xenopus* embryos.

Key words

Xenopus, neural progenitor, neurons, cell cycle, EdU, BrdU

1. Introduction

Control of cell division is key for correct embryonic growth, patterning and organogenesis. As we understand more about the integration of cell signaling and transcription factor function with cell cycle control, it has become increasingly important to be able to monitor the proliferative properties of a tissue, and how these may change upon experimental manipulation of gene expression.

Here, we describe the characterization of proliferating progenitors based on BrdU incorporation, adapted for use in *Xenopus* embryos. BrdU is incorporated into DNA during the S-phase of the cell cycle. Consequently, it is widely used as a marker of S-phase, although it is technically a marker for DNA synthesis, which could also occur during other processes, such as DNA repair (1). The use of BrdU immunohistochemistry for the study of cell proliferation in a developing embryo was described in a seminal paper in the late 80s (2). Since then, BrdU incorporation has most often been used to identify sites of proliferation and determine the number of dividing cells in a tissue.

Changes in the number of BrdU positive cells have often been taken as an indication of increase or decrease in proliferation. An increase in BrdU positive cells in a tissue may indicate that cells have failed to become post-mitotic or that there has been a change in cell cycle kinetics that causes a change in the number of cells that are in S-phase for the time that BrdU is available. However, the depth of information that one can derive from the absolute number of S-phase cells is limited.

More useful is the Labeling Index of a tissue, which is the proportion of cells labeled in the total proliferating population at any given time. Since the fraction of cells in S-phase over the total proliferating cells is proportional to the fraction of S-phase length over the total cell cycle length, the Labeling Index can be taken as a measure of the cell cycle length. For example, a decrease in the Labeling Index denotes an increase in cell cycle length [e.g. (3)]. This is based on the assumption that the length of the S-phase does

not change much, which agrees with findings reporting increase in the G-phases of the cell cycle during neurogenesis (4-6). Nonetheless, differences in S-phase length in various populations of neural progenitors have been recently reported (7). There are more accurate ways to estimate the length of the S-phase and of the total cell cycle, including cumulative BrdU labeling (2, 5), dual pulse labeling with BrdU and other thymidine analogues such as IdU, CldU or EdU (8-11, see **Note 1**) or FACS analysis (6).

Theoretically, cumulative and dual pulse labeling are equivalent and presuppose that all cells studied are proliferating, are uniformly distributed in the cell cycle and the population grows at a steady state (2, 5, 11). The aim of those methods is to estimate the number of cells in S-phase at various time points in order to extrapolate the length of the S-phase and of the total cell cycle.

Cumulative BrdU incorporation requires saturation of the cycling population to be reached, which can be challenging (see 2, 5 for discussion). Dual S-phase pulse labeling only requires two injections of different thymidine analogs in a short time range that will be later on distinguished by immunochemistry (8, 9, 11). However, discriminating thymidine analogs such as IdU, CldU and BrdU is tedious and can require some important set up, since all those molecules are structurally close to each other and present a potentially comparable affinity for different anti-BrdU antibodies (8, see **Note 2**).

The recent development of EdU molecule eases the use of the dual phase labeling method. EdU is a new kind of thymidine analog, which can be directly coupled with a fluorophore by a copper catalyzed reaction (12). This presents two main advantages, namely that it doesn't require DNA denaturation and that it is not an antibody-based detection system. This technology can then be easily associated with BrdU detection in order to perform dual pulse labeling (10), especially since particular clones of anti-BrdU

antibody, commercially available, have been shown to not cross-react with EdU (see **Note 2**).

To address whether changes in the proliferating cell population are accompanied by changes in cell differentiation, it is useful to combine S-phase labeling with immunohistochemistry or *in situ* hybridization for cell type specific markers. Such combination allows BrdU/EdU labeling also to be used in characterizing the fate of progeny of cells that have been dividing at the time of labeling, and to determine the birth-date of a cell type of interest.

Here, we provide a detailed account of how these different protocols can be combined. The reader is referred to other publications on the theoretical aspects of using dual pulse labeling or cumulative S-phase labeling to calculate cell-cycle length (2,5,11). We focus on neural tissue, but as far as we know, these protocols can be applied to any tissue in the embryo. The method presented here starts with BrdU delivery (see **Note 3**), it includes an optional *in situ* hybridization step and then, it is split into two alternative paths: route A involves immunostaining on sections, while route B involves whole mount immunostaining, followed by sectioning (see **Fig. 1**). Route A gives better quality results in terms of cellular definition, however, route B is preferable if a whole mount image of the embryo or tissue is desired, prior to sectioning. The *in situ* hybridization step should be performed prior to immunohistochemistry, which may include one or two antibodies. One antibody is for BrdU and the other can be either a cell cycle antibody (e.g. PH3, (6, 13) or a cell type specific antibody (e.g. Sox3 for neural progenitors or Myt1 for post-mitotic neurons, (13, 14).

2. Materials

2.1 BrdU or EdU injection in *Xenopus laevis* embryos (see Note 3)

1. Injection buffer: 1% Ficoll in 0.1X MMR (0.1x MMR is made as a 10X stock solution and diluted 100 times with distilled water. 10X MMR stock solution: 1M NaCl, 20mM KCl, 10mM MgCl₂, 20mM CaCl₂, 50mM HEPES, pH 7.5, sterilize by autoclaving.)
2. Injection needles: GC100TF-10 glass capillaries (Harvard Apparatus Cat. No. 30-0038) are pulled with a Flaming/Brown micropipet puller Model P-87 (Sutter Instruments Co.) Conditions used are temp = ramp test, pull = 50, vel = 100, and time = 5
3. Microloader tips (Eppendorf)
4. Air-pulse based nano-injector type Pico-Spritzer
5. 10mM BrdU solution (Roche)
6. 1mM EdU solution (Life Technology, part of Click-iT® EdU Imaging kit, dilute EdU according to manufacturer's recommendations)
7. 60 mm Petri dish coated with nylon mesh (Spectrum, Spectra Mesh Cat. No. 146410)

2.2 Fixing samples

1. Wheaton glass scintillation vials (20mL, VWR)
2. Freshly prepared MEMFA: 0.1M MOPS pH 7.4, 2mM EGTA, 1mM MgSO₄, 3.7% Formaldehyde

2.3 Whole mount *in situ* hybridization

1. 100µg/mL Digoxigenin (DIG) RNA probe
2. PTw: 1X PBS, 0.1% Tween-20 (Sigma)
3. 100% Methanol, 50% Methanol in distilled deionised water, 25% Methanol in PTw

4. 0.1M Triethanolamine (TEA) adjusted to pH 7.8
5. Autoclaved 2mL screw cap tubes
6. Acetic anhydride
7. 4% formaldehyde in PTw
8. Hybridization buffer: 50% formamide, 5X SSC, 1mg/mL Torula RNA, 100µg/mL heparin, 1X Denhardt's, 0.1% Tween-20, 0.1% CHAPS
9. 60°C water bath
10. Probe hybridization solution: 100µg/mL probe in hybridization buffer
11. 20X SSC stock: 3M NaCl, 0.3M Sodium Citrate, pH 7.0
12. 2X SSC, 0.2X SSC
13. RNase cocktail (Ambion) diluted in 2X SSC (dilute 10µL of RNase cocktail per mL of 2X SSC)
14. Heat Treated Lamb Serum (HTLS): Incubate lamb serum at 60°C for 1 hour, aliquot in 50mL Falcon tubes and store at -20°C.
15. 2X Maleic Acid Buffer (MAB) stock: 200mM Maleic acid, 300mM NaCl, pH 7.5
16. 1X MAB
17. 1X MAB, 2% BMB
18. 1X MAB 2% BMB 20% HTLS
19. Sheep anti-DIG antibody coupled to alkaline phosphatase (Roche) diluted 1:2000 in 1X MAB, 2% BMB, 20% HTLS
20. Alkaline phosphatase (AP) buffer: 100mM Tris pH 9.5, 50mM MgCl₂, 100mM NaCl, 0.1% Tween-20
21. NBT/BCIP chromogenic substrate diluted in AP buffer. Add 4.5µL of 75mg/mL of NBT (Roche) and 3.5µL of 50mg/mL of BCIP (Roche) per mL of AP buffer
22. Wheaton glass vials (4mL, VWR)
23. 100% Methanol, 50% Methanol in 1X PBS

2.4 Route A: Immunostaining on sections

2.4.1 Sectioning

1. 15% fish gelatin (Sigma), 15% sucrose dissolved in distilled de-ionized water for embryos up to NF stage 30. Use within a week of preparation.
2. 25% fish gelatin (Sigma), 15% sucrose dissolved in distilled de-ionized water for embryos from NF stage 30 onwards. Use within a week of preparation.
3. Cryomolds (Fischer)
4. Cryostat (Leica)
5. OCT compound (Lamb)
6. Superfrost plus slides (VWR)

2.4.2 Combining BrdU/EdU detection and immunostaining on sections

1. 2N HCl in fresh 1X PBS
2. 1X PBS, 0.1% Triton X-100
3. 1X PBS, 0.1% Triton X-100, 5% HTLS
4. 1X PBS, 0.5% Triton X-100, 5% HTLS
5. Click iT® Reaction cocktail (Life Technologies, part of Click-iT® EdU imaging kit, prepare reagents and cocktail according to manufacturer's guidelines)
6. Primary and secondary antibodies (such as anti-BrdU, anti-Acetylated Tubulin, anti-Myt1 and anti-Sox3, see **Note 3**).
7. Mowiol mounting media: mix 6 mL of glycerol, 2.4 g of Mowiol 4-88 (Calbiochem) and 6 mL of distilled de-ionized water. Mix at room temperature for 2 hours. Add 12 mL of 200mM Tris-HCl pH 8.5 and incubate at 50°C with occasional shaking until the Mowiol has completely dissolved. Filter on 0.45-µm membrane filter and store aliquots at -20°C.

8. DAPI diluted at 10 mg/mL in distilled de-ionized water (Sigma). Make 50 μ L aliquots and keep at -20°C
9. Slides tank type Coplin jar
10. Glass coverslips (22x50, thickness N°1, VWR).
11. Nail varnish

2.5 Route B: *Whole mount immunostaining followed by sections.*

2.5.1 *Combining BrdU detection and whole mount immunostaining*

1. 100% Methanol, 50% Methanol in 1X PBS
2. 2N HCl in fresh 1X PBS
3. BBT: 1% BSA (Sigma), 0.1% Triton X-100 (Sigma) in 1X PBS
4. HTLS (see above 2.3. item 14)
5. BBT+ 5% HTLS
6. Primary and secondary antibodies (such as anti-BrdU, anti-Acetylated Tubulin, anti-Myt1 and Sox3, see **Note 3**).
7. PTw (see above 2.3. item 2)
8. 2mL screw cap tubes
9. Wheaton glass scintillation vials (20mL, VWR)

2.5.2 *Sectioning*

See section 2.4.1.

3. Methods

3.1 BrdU or EdU injection in *Xenopus laevis* embryos

1. Fill up an injection needle with 5 μ L of BrdU or EdU solution using a microloader tip. Install the needle on the holder, break the needle tip and set up the injector in order to obtain a 4.2nL drop using an ocular micrometer for measurement. Place embryos in injection buffer on a dish coated with nylon mesh or use forceps to immobilize them and inject them as required depending on their stage of development (see **Note 4**).
2. Let embryos recover in injection buffer for the required amount of time (see **Note 5**).

3.2 Fixing samples

1. Once the embryos have reached the developmental stage of interest, remove the vitelline membrane (if still present) with fine forceps and fix embryos in MEMFA for 1h at room temperature (see **Note 6**).
2. Wash three times in 100% Methanol and store at least overnight in 100% Methanol at -20°C.

3.3 Whole mount *in situ* hybridization

This protocol is a standard *in situ* protocol using chromogenic reaction except that the Proteinase K treatment is omitted in order to keep any antigen intact for further immunostaining (for Fluorescent In Situ Hybridization, FISH, please chapter XXXX in the same issue). This method works both in *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis* (see **Note 7**).

N.B.: This protocol can be run in three days, in which case, **step 11** should be reached on day 1 and **step 21** (4th 1X MAB wash) on day 2.

1. Gradually rehydrate fixed embryos by 5 minutes washes from 100% Methanol to 50% Methanol in ddH₂O and then 25% Methanol in PTw.
2. Wash three times in PTw.
3. Wash embryos twice for 5 minutes in 5ml 0.1M TEA pH 7.8.
4. Add 12,5µL acetic anhydride to the second TEA wash and rock for 5 minutes.
Add another 12,5µL acetic anhydride and rock for 5 more minutes.
5. Wash twice 5 minutes in 5mL PTw.
6. Refix for 20 minutes with 4% formaldehyde in PTw.
7. Wash five times in PTw for 5 minutes.
8. Aliquot 500µL hybridization buffer into 2mL screw cap tubes. Transfer embryos into the buffer carrying over as little PTw as possible.
9. Once the embryos have settled through the dense buffer, remove the buffer and replace with another 500µL of hybridization buffer.
10. Pre-hybridize for 4-6 hours at 60°C.
11. Replace hybridization buffer with 500 µL of probe solution (hybridization solution with probe at 1µg/mL). Hybridize overnight at 60°C.
12. Remove probe and keep at -20°C. Probe can be reused several times. Replace probe with hybridization buffer and put at 60°C for 10 minutes.
13. Wash three times for 20 minutes at 60°C in pre-warmed 2x SSC.
14. Treat with RNase cocktail for 30 minutes at 37°C.
15. Wash for 10 minutes in 2X SSC at room temperature.
16. Wash twice for 30 minutes in 0.2xSSC at 60°C.
17. Wash twice in 1X MAB, 10 - 15 minutes per wash at room temperature.
18. Pre-block for between 15 minutes and 1 hour in 0.5mL 1X MAB + 2% BMB.
Dilute 2mL 10% BMB stock 1 in 5 with 8mL 1X MAB.

19. Block for 1hour in 0.5mL 1X MAB + 2% BMB + 20% HTLS. Add 2mL 10% BMB and 2mL HTLS to 6mL 1X MAB.
20. Incubate with 0.5mL of anti-DIG antibody diluted in 1X MAB + 2% BMB + 20% HTLS. Incubate for 4 hours at room temperature or overnight at 4°C.
21. Transfer the embryos to a 50mL Falcon tube containing 1X MAB. Wash 8 times for 20 minutes each in 1X MAB. One of the washes must be done overnight at 4°C. For each wash, Falcon tubes are laid horizontally in a blue tray and rocked, including overnight wash.
22. Transfer the embryos into Wheaton glass vials. Wash twice for 5 minutes at room temperature with 2mL of AP buffer.
23. Replace the AP buffer with 2mL of AP buffer with the chromogenic substrate diluted in. Rock in the dark at room temperature. In order to accelerate the color reaction, samples can be incubated the same way at 30°C.
24. Once the color has developed sufficiently, wash the samples in 50% Methanol in 1X PBS for 5 minutes then wash twice in 100% Methanol for a total of two hours maximum. This step will allow the inactivation of the alkaline phosphatase and the removal of excess color reaction. Embryos kept for more than two hours in Methanol will turn black and be useless for analysis.
25. Rehydrate gradually the sample in 1X PBS. From this point, you should proceed to route A or route B protocol in the next 24 hours. You can store the samples in 1X PBS at 4°C overnight if needed but not for longer.

3.4 Route A: Immunostaining on sections (see Note 8)

3.4.1 Sectioning

1. Freshly prepare some fish gelatin (15% for embryos up to NF30, 25 % for later stages, see Note 9).

2. If needed (continuing from item 3.2.2), gradually rehydrate the fixed samples in 1X PBS to finally put them in fish gelatin. Let them embed at least overnight at room temperature on a rocker.
3. Mount them in embedding moulds of the appropriate size. First put a bed of fish gelatin and let set on dry ice. Then place each sample and orient it with forceps under the dissecting microscope quickly enough to keep the fish gelatin bed frozen. Mark the mould in order to locate the sample, top up with fish gelatin and let freeze on dry ice.
4. Once set, mark the position of the sample on the block on the dry ice cold block with a pencil and let the block cool to cryostat temperature for at least 10 minutes. Mount it on the cryoblock holder with OCT compound and let it set. Set up your block on the cryostat head, let it cool down to object temperature for 5 minutes and start sectioning. First, trim between 30 and 50 μm until the sample is reached. Section at 12 μm and gather sections on superfrost slides (see **Note 10**).
5. Keep slides in -80°C for at least one hour before processing for immunostaining.

3.4.2 Combining BrdU/EdU detection and immunostaining on sections (see Fig. 2 and Note 11 and 12)

1. Take slides out of the -80° and let them dry under a fume hood on a tray for one hour.
2. Dip slides in acetone for 2 minutes and rehydrate them in 1X PBS 0.1% Triton X-100 in a slide tank type Coplin jar then draw a boundary with a PAP pen.
3. Block 30 min in 1X PBS, 0.5% TritonX-100 5% HTLS, incubate 30 minutes in the dark in a humidity chamber with 100 μL per slide of Click-iT[®] Reaction cocktail. Subsequently wash three times for 5 minutes with 1X PBS 0.1% Triton X-100.

4. In order to perform BrdU staining, incubate the slides in 2N HCl for 30 minutes at 37°C. Then wash three times for 10 minutes in 1X PBS 0.1% Triton X-100 (see **Note 13**)
5. Block with 1X PBS 0.1% Triton X-100 5% HTLS for 30 minutes in a humidity chamber.
6. Incubate with primary antibodies (against BrdU and your antigen of interest, see **Note 14**) for 2 hours at room temperature or overnight at 4°C in a humidity chamber.
7. Wash three times for 10 minutes in 1X PBS, 0.1% Triton X-100 then block with 1X PBS, 0.1% Triton X-100, 5% HTLS for 30 minutes in a humidity chamber.
8. Incubate with fluorescent-labeled secondary antibodies for an hour at room temperature. Usually, secondary fluorescent antibodies will be used from 1:300 to 1:500 (see **Note 15**).
9. Wash 3 times 10 minutes in 1X PBS, 0.1% Triton X-100.
10. Incubate with DAPI diluted at 5 µg/mL for 10 minutes and wash three times for 10 minutes in 1X PBS.
11. Take slides out of the washing tank and partially dry them before mounting them in Mowiol. Seal them with nail varnish.

3.5 Route B: *Whole mount immunostaining followed by sections.*

3.5.1 *Combining BrdU detection and whole mount immunostaining*

1. If needed quickly rehydrate the samples in 50% Methanol, 50% BBT for 2 minutes (continuing from item 3.2.2).
2. Wash the samples in scintillation vials in BBT for 1 hour twice.
3. Treat the samples with 2N HCl for one hour at room temperature, and then wash three times in 1X PBS for 5 minutes.

4. Transfer the samples into 2mL screw capped tubes and block for 1 hour in BBT + 5% HTLS.
5. Incubate overnight at 4°C in the same tubes in 1mL of primary antibodies diluted in BBT + 5% HTLS.
6. Transfer the embryos back into scintillation vials and wash in BBT for 1 hour 4 times.
7. Transfer the embryos back into 2mL screw capped tubes and block for 1 hour in BBT + 5% HTLS.
8. From now on, embryos have to be protected from light. Incubate overnight at 4°C in the same tubes in 1ml of secondary antibodies dilution in BBT+ 5%HTLS.
9. Transfer embryos back into scintillation vials and wash for 1 hour in BBT.
10. Wash embryos in PBT three times 1 hour and then overnight at 4°C.
11. The embryos can be imaged after immunostaining using either a stereomicroscope or a microscope get higher magnification images (confocal or not). Embryos can be cleared in Murray's solution (2 volumes of benzyl benzoate, 1 volume of benzyl alcohol) to allow visualization of deep structures. To do so, gradually dehydrate embryos in Methanol before transferring them in Murray's solution.

3.5.2 Sectioning

Follow the sectioning protocol presented in Route A (paragraph 3.4.1) to process stained embryos.

4. Notes

1. BrdU, CldU and IdU can be used at the same concentration range (10mM stock for BrdU and IdU, 100mM stock for CldU, see **Note 3** for administration) and are all identified by anti-BrdU antibodies that show variable affinities for these different analogs (8, 9, 11). EdU is another thymidine analog enabling a direct coupling with a fluorophore post-incorporation. We are injecting it at a concentration of 1mM, the same way we do for BrdU (see **Note 3**). The staining protocol is carried out according to manufacturer's guideline (Click-iT® EdU Imaging kits) and is routinely performed on sections. In the context of dual pulse labeling experiments, it is performed between rehydration and HCl treatment (steps 3.4.2.2. and 3.4.3.2.3.). EdU can easily replace BrdU but, in our hands, BrdU proved itself to be more reliable. Moreover, we have not attempted to combine *in situ* hybridization with EdU injection and staining.

2. Different efficient primary anti-BrdU antibodies are available. They are raised in rabbit (from Abbiotec), sheep (from Abcam), rat (from AbD Serotec) or mouse (from Roche or Phoenix), allowing the combination of BrdU staining with any other primary antibody directed against an antigen of interest without risking cross-reactivity. CldU (Invitrogen) can be used instead of BrdU, possibly with better sensitivity of detection (in this case, the primary antibody used is a rat anti-BrdU from AbD Serotec diluted at 1:2000). In case of dual pulse labeling using EdU and BrdU, anti-BrdU antibody clone MoBU-1 (Invitrogen, B35128) can be used without cross-reacting with EdU molecule.

3. BrdU can be administered in two ways: by soaking embryos in BrdU solution or by injecting embryos with BrdU. The soaking is routinely used by fish' researchers (8, 15). However, on a side-by-side comparison of soaking and injection in *Xenopus* early embryos (NF stage 10, soaking in 100µM BrdU in 0.1X MMR versus a single injection of 4.2nL of BrdU 10mM in the blastocoel), we have found that the later method leads to a more homogeneous distribution of BrdU signal, particularly in deep tissues. Moreover,

injection has the advantage of using less quantity of thymidine analogs, especially on late stages where animals need to be kept in big volumes of rearing media.

4. For early embryos (up to NF stage 12), one injection in the blastocoel is sufficient for labeling the entire embryo, whereas two medial injections in the neural region are preferable in embryos from NF stage 12 to NF stage 25. The number of injections is increased to 3, for embryos up to NF stage 35 and 4, from NF stage 35 to NF stage 40. From this stage, tadpoles secrete mucus and the epidermis is tougher, which makes injection more difficult. However, injecting in the gills from NF stage 40 enables homogenous BrdU distribution. Ensure that you comply with appropriate animal experimentation regulations in your country.

5. Cells that are in S-phase during the injection start to incorporate BrdU immediately. In our hands, BrdU incorporation can be detected by immunostaining after 10-20 minutes of injection. The length of incubation after injection determines the number of proliferating cells that will be labeled by BrdU. This depends on the length of the cell cycle, which may vary in a tissue and stage specific manner, and the length of time for which BrdU is available. It may be important to consider how long BrdU is available for labeling after a single injection ("pulse"). One way to do this is to administrate a saturating amount of BrdU to a set of animals and fix some for BrdU analysis in regular intervals, for example, every 30 min. The percentage of BrdU positive cells should increase linearly, reaching a plateau after a certain period of time, which is equal to the time that BrdU is available for labeling after a single injection in this system (also called bioavailability, retention or clearance time). In practice, the curve may not reach a "flat" plateau as BrdU positive cells continue to divide. In this case, the inflection point of the curve represents the BrdU retention time. Using such a protocol, we found that the clearance time of BrdU in early gastrula embryo (NF stage 9.5) is about 90 minutes and that 1.5 hrs incubation labels most cells in the ectoderm

(around 83%, H. Auger. unpublished observations). In other systems, it has been estimated that BrdU was available for 2hrs in adult rodent brain and 4hrs in adult fish brain (16, 17). BrdU molecules incorporated into the DNA are thought to be diluted to undetectable levels after about three cell divisions (18).

6. Tadpoles from NF stage 50 are fixed overnight at 4°C. After three washes in PBS, the CNS or any other tissue of interest can be dissected in PBS in order to facilitate further processing by reducing the size of the sample.

7. The Proteinase K treatment takes place between steps 3.3.2 and 3.3.3. Usually, we treat embryos for ten minutes at room temperature with Proteinase K diluted in PTw (10ng/L for *X.laevis*, 1.5 ng/L for *X.tropicalis*). A mild proteinase K treatment could be needed in some cases to allow a good penetration of the probe. If so, tests should be performed in order to optimize the results of combined *in situ* hybridization and immunochemistry.

8. Immunostaining on sections gives better results than sectioning whole mount immunostained embryos, especially if the aim is to count stained cells. This might be partly due to a more efficient penetration of the antibodies on sections compared to whole mount embryos.

9. Fish gelatin is used instead of the classically used OCT embedding because OCT does not penetrate tissues (19). Hence, fish gelatin lead to better results in terms of conservation of tissue integrity.

10. Thickness of the sections can be increased to 25µm, but it might affect how well sections stick on slides. The overall results obtained on thick sections (25µm) is usually less clear than on thin sections (12µm) due to an overlap of signal, giving light blurriness to stained samples.

11. In the example shown in Figure 2 (Immunostaining on sections), the embryos were thin-sectioned at 12µm. Thicker sections (from 20 to 30 µm) may be preferred if

the samples have already been processed for *in situ* hybridization in order to be able to clearly identify the signal (**Notes 8 & 10**).

12. Omit step 3.4.2.3. if no EdU has been injected.

13. HCl is essential for BrdU staining. Any good antibody, that does not require any tricky pre-treatment, has good chances of working after this treatment.

14. The concentration of primary antibody used depends on the antibody itself. For instance, the primary anti-BrdU antibody commonly used in our lab (Roche anti-BrdU Cat. No. 11 170 376 001) is used at 1:200. We have also made primary antibodies for Myt1, used at 1:1000 and Sox3, used at 1:2000.

15. Secondary fluorescently labeled antibodies used in our lab mainly come from Molecular Probes and are generally diluted at 1:400.

5. References

1. Taupin, P. (2007) BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res Rev* 53, 198-214.
2. Nowakowski, R. S., Lewin, S. B., Miller, M. W. (1989) Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol* 18, 311-318.
3. Chapouton, P., Adolf, B., Leucht, C., Tannhauser, B., Ryu, S., Driever, W., Bally-Cuif, L. (2006) her5 expression reveals a pool of neural stem cells in the adult zebrafish midbrain. *Development* 133, 4293-4303.
4. Calegari, F., Haubensak, W., Haffner, C., Huttner, W. B. (2005) Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *J Neurosci* 25, 6533-6538.
5. Salomoni, P., Calegari, F. (2010) Cell cycle control of mammalian neural stem cells: putting a speed limit on G1. *Trends Cell Biol* 20, 233-243.
6. 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, 3036-3048.
7. Arai, Y., Pulvers, J. N., Haffner, C., Schilling, B., Nusslein, I., Calegari, F., Huttner, W. B. (2011) Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nat Commun* 2, 154.
8. Alunni, A., Hermel, J. M., Heuze, A., Bourrat, F., Jamen, F., Joly, J. S. (2010) Evidence for neural stem cells in the medaka optic tectum proliferation zones. *Dev Neurobiol* 70, 693-713.
9. Conboy, M. J., Karasov, A. O., Rando, T. A. (2007) High incidence of non-random template strand segregation and asymmetric fate determination in dividing stem cells and their progeny. *PLoS Biol* 5, e102.
10. Gomez-Nicola, D., Valle-Argos, B., Pallas-Bazarra, N., Nieto-Sampedro, M. (2011) Interleukin-15 regulates proliferation and self-renewal of adult neural stem cells. *Mol Biol Cell* 22, 1960-1970.
11. Martynoga, B., Morrison, H., Price, D. J., Mason, J. O. (2005) Foxg1 is required for specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis. *Dev Biol* 283, 113-127.
12. Salic, A., Mitchison, T. J. (2008) A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2415-2420.
13. Sabherwal, N., Tsutsui, A., Hodge, S., Wei, J., Chalmers, A. D., Papalopulu, N. (2009) The apicobasal polarity kinase aPKC functions as a nuclear determinant and regulates cell proliferation and fate during *Xenopus* primary neurogenesis. *Development* 136, 2767-2777.
14. Zhang, C., Basta, T., Jensen, E. D., Klymkowsky, M. W. (2003) The beta-catenin/VegT-regulated early zygotic gene *Xnr5* is a direct target of SOX3 regulation. *Development* 130, 5609-5624.
15. Rothenaigner, I., Krecsmarik, M., Hayes, J. A., Bahn, B., Lepier, A., Fortin, G., Gotz, M., Jagasia, R., Bally-Cuif, L. (2011) Clonal analysis by distinct viral vectors identifies bona fide neural stem cells in the adult zebrafish telencephalon and characterizes their division properties and fate. *Development*.
16. Zupanc, G. K., Ott, R. (1999) Cell proliferation after lesions in the cerebellum of adult teleost fish: time course, origin, and type of new cells produced. *Exp Neurol* 160, 78-87.

17. Hayes, N. L., Nowakowski, R. S. (2000) Exploiting the dynamics of S-phase tracers in developing brain: interkinetic nuclear migration for cells entering versus leaving the S-phase. *Dev Neurosci* 22, 44-55.
18. Kiel, M. J., He, S., Ashkenazi, R., Gentry, S. N., Teta, M., Kushner, J. A., Jackson, T. L., Morrison, S. J. (2007) Haematopoietic stem cells do not asymmetrically segregate chromosomes or retain BrdU. *Nature* 449, 238-242.
19. Fagotto, F., Brown, C. M. (2008) Detection of nuclear beta-catenin in *Xenopus* embryos. *Methods Mol Biol* 469, 363-380.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Federico Calegari, Muriel Perron and Morgan Locker for many useful discussions and protocols. This work was funded by a Wellcome Trust Senior Research Fellowship to NP. HA and RT are Research Associates, funded by the Wellcome Trust.

Figures legend

Figure 1: Overview of the method. Following BrdU injection, two different routes can be taken. Route A involves immunostaining on sections while Route B involves whole mount immunostaining followed by sectioning.

An optional step for *in situ* hybridization can be added following BrdU injection.

Figure 2: Characterization of proliferating neural progenitors and newborn neurons in NF stage 14 embryo. Embryos were injected with BrdU at NF stage 14 and grown at 18°C for 24 hours allowing them to reach NF stage 28. They were then fixed in MEMFA and processed following Route A protocol. After *in situ* hybridization for Sox3, the sample was thin sectioned (12µm) and processed for immunostaining against BrdU and Myt1.

A. Bright field image of a section of the sample showing Sox3 signal in the spinal chord.

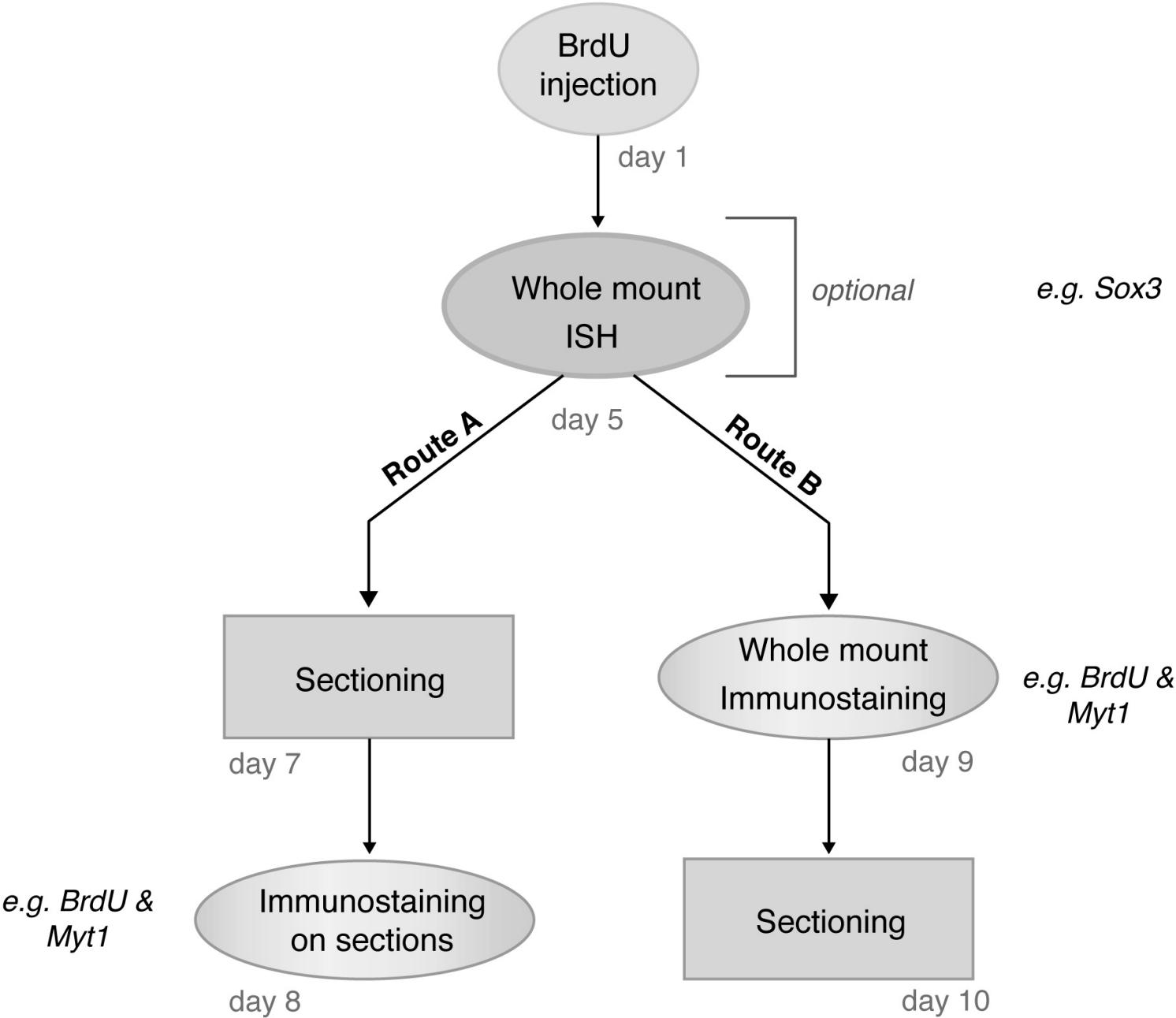
Inlay shows the entire section through the embryo.

B. Fluorescent image of the same section showing BrdU (red), Myt1 (green) and DAPI (blue). Newly born neurons are double positive for BrdU and Myt1 (yellow, arrowhead) and proliferating progenitors are only positive for BrdU (red, arrow)

C. Merge image combining bright field and fluorescent images.

Scale bar: 100µm

Figure 1



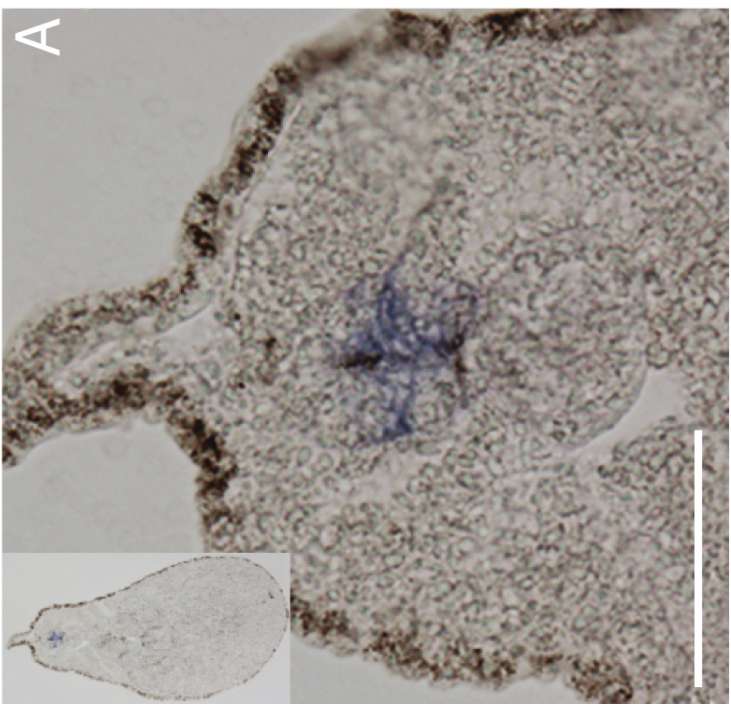
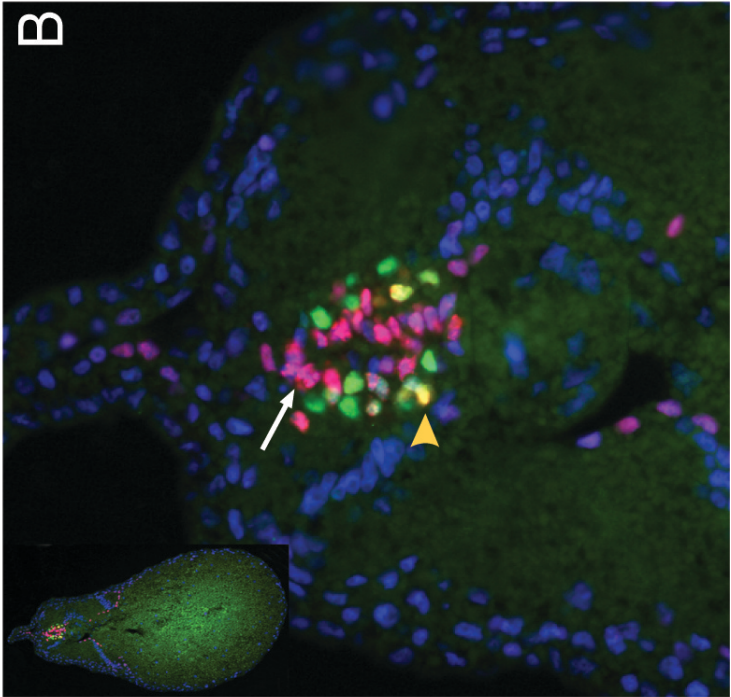
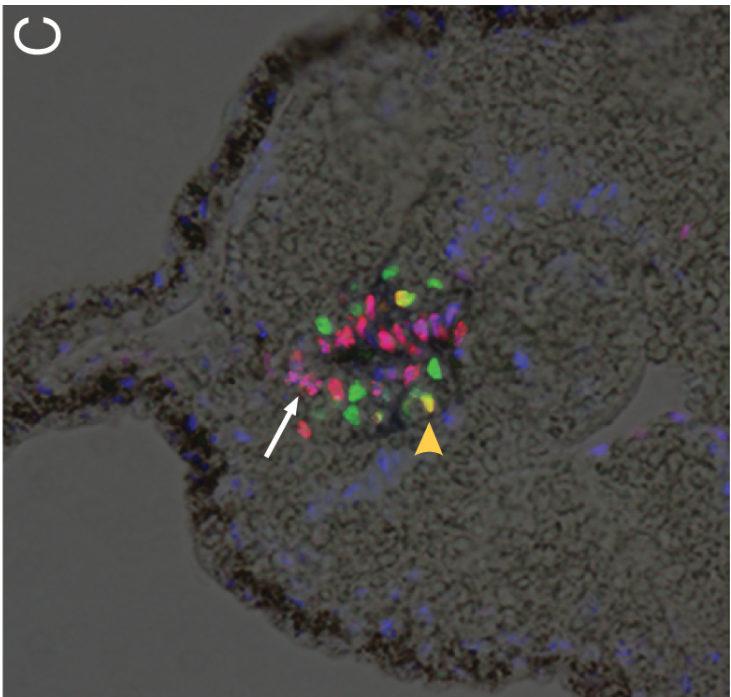


Figure 2

ANNEXE: PROTOCOLES

Protocole n°1 : fécondation *in vitro*

a. STIMULATION DE LA PONTE CHEZ LES FEMELLES

Une semaine avant la ponte, les femelles reçoivent une injection d'hormone gonadotrope chorionique dans les sacs lymphatiques dorsaux, pour stimuler la folliculogénèse. Une seconde injection a lieu la veille de la ponte, en fin de journée. On peut ainsi recueillir les œufs dans des boîtes de Pétri en pressant l'abdomen des femelles le lendemain matin.

b. PRELEVEMENT DE GAMETES MALES

On endort le mâle dans du MS222 afin de pouvoir l'opérer et prélever les testicules. Les testicules sont ensuite écrasés dans du MBS 1X.

c. FECONDATION IN VITRO

On recouvre les œufs de la solution contenant les spermatozoïdes afin de provoquer la fécondation, elle a lieu au bout d'environ 5 min. On ajoute du MBS 0,1 X sur les embryons afin qu'ils ne se déshydratent pas. Rapidement on observe le retournement des œufs bien fécondés qui ne laissent voir que le pôle animal, pigmenté.

d. TRAITEMENTS DES EMBRYONS

Pour faciliter les injections, on enlève une enveloppe protectrice des embryons appelée la gangue avec de la cystéine 2% à pH 8, diluée dans du MBS 0,1X. Les embryons sont ensuite abondamment rincés en MBS 0,1X, puis triés.

Protocole n°2 : Clonage

a. AMPLIFICATION DE L'INSERT

- Préparation du « pré-mix PCR » (pour 50 μ L)
 - i. - 5 μ L de Tampon 10X
 - ii. - 0,25 μ L de dNTP 10mM
 - iii. - 1,25 μ L de MgCl₂ 50 mM
 - iv. - 37 μ L d'H₂O
- v. □ Ajouter par tube :
 - 43,5 μ L de « pré-mix PCR »
 - 100 ng de plasmide dans 1 μ L
 - 2,5 μ L d'amorces 5' (10 μ M)
 - 2,5 μ L d'amorces 3' (10 μ M)
 - 0,5 μ L de Taq polymérase (Invitrogen)
- Programme de PCR : 35 cycles, température d'hybridation 68°C, élongation 1mn30.
- Purification (Kit nucleospin extraction II, Macherey-Nagel)

b. DIGESTION DE L'INSERT ET DU VECTEUR

- 2h à 37°C dans la solution suivante:
 - 5 μ g de plamide ou 40 μ L de produit de PCR
 - 5 μ L de tampon correspondant à l'enzyme ou au couple d'enzyme de restriction
 - 2 μ L de chaque enzyme de restriction
 - 5 μ L de BSA 10X si nécessaire
 - QSP 50 μ L avec H₂O
- Déphosphorylation du vecteur digéré :
 - Ajouter au tube après digestion 1 μ L de phosphatase alcaline
 - Incuber 15 min à 37°C
 - Ajouter à nouveau 1 μ L d'Alcaline Phosphatase
 - Incuber à nouveau 15 min à 37°C
- Purification de l'insert et du vecteur digérés (Kit nucleospin extraction II, Macherey-Nagel)

c. LIGATION

- Ligation 1h à température ambiante dans la solution suivante:
 - 400 ng de vecteur digéré
 - 200 ng d'insert
 - 4 μ L de tampon de ligation 5X
 - 1 μ L de T4 DNA Ligase (Rapid DNA ligation, Roche)
 - QSP à 20 μ L H₂O
- Faire un tube de témoin négatif (sans insert)

d. TRANSFORMATION, SELECTION DES CLONES ET EXTRACTION D'ADN PLASMIDIQUE

- Décongeler un tube de 50 μ L de bactéries compétentes (DH5 α) sur glace
- Ajouter 5 μ L du produit de ligation
- Laisser le tube sur la glace pendant 30 min
- Mettre 20 secondes au bain-marie à 37°C
- Remettre sur glace 2 min
- Ajouter 950 μ L de LB et mélanger délicatement
- Incuber 1h à 37°C
- Centrifuger 4min à 7000G
- Éliminer 900 μ L du surnageant.
- Resuspendre le culot dans les 100 μ L restant
- Étaler sur boîte LB + antibiotique en condition stérile, sous flamme
- Le jour suivant, piquer plusieurs colonies, les mettre en culture dans 2mL de LB + antibiotique et les incuber à 37°C toute la nuit sous agitation

e. EXTRAIRE L'ADN PLASMIDIQUE A L'AIDE DU KIT « NUCLEOSPIN PLASMID QUICKPURE » (MACHEREY-NAGEL)

Protocole n°3 : Hybridation *in situ*

a. SOLUTIONS

PTw

PBS1X, 0,1%Tween20

Bleaching Solution (pour 10 mL)

500µL Formamide (5%)
6,45mL H₂OmqA
250µL 20XSSC (0,5%)
2,8mL H₂O₂ 30% (10%)

Tampon d'hybridation (pour 100 mL)

SSC 20X 25mL (5X)
Formamide 50mL (50%)
Blocking Reagent 1g (1%)
Dissoudre dans une bouteille en faisant un bain marie à 60°C
RNAt 100 mg (1mg/mL)
Héparine 50mg/ml 200µL (0,1mg/mL)
Tween-20 10% 1mL (0,1%)
EDTA 0,5M 1mL (5mM)
Chaps 10% 100mg (0,1%)
Ajuster avec H₂OmqA
Aliquoter et conserver à -20°C

2XSSC + 0,1% chaps (pour 100mL)

10mL de SSC20X
90mL d'H₂OmqA
100mg de caps

0,2XSSC + 0,1% chaps (pour 100mL)

1mL de SSC20X
99mL d'H₂OmqA
100mg de caps

TN10X (pour 2L)

Tris 242,2g (2M)
NaCl 175,32g (3M)
PH 7,5
Filtrer et stériliser

TNX (pour 100mL)

TN10X 10mL (1X)
TritonX100 10% 1mL (0,1%)
Ajuster avec H₂OmqA

« Blocking Buffer » 2% (pour 100mL)

100mL de TNX

2g de Blocking Reagent

Chauffer à +60°C pour dissoudre

Aliquoter et conserver à -20°C

NTMT (pour 10mL)

1mL Tris 1M pH 9,5

200µL NaCl 5M

500µL MgCl₂ 1M

10µL Tween-20 100%

8,3mL H₂O_{mq}

20µL Levamisole 1M

b. COLORATION RED-GAL

- PBS 1X, MgCl₂ 2mM **2x5min**
- PBS 1X, MgCl₂ 2mM, NP40 0.02% **3x5min**
- Tampon de coloration (PBS 1X, K₃Fe(CN)₆ 20mM, K₄Fe(CN)₆ 20mM, MgCl₂ 2mM, NP40 0.02%) **5min**
- Révélation après ajout de Red-Gal 1mg/ml dans le tampon de coloration à 37°C
10 à 30min
- Arrêt de la coloration en PBS 1X, EDTA 20mM

Pour l'hybridation *in situ*, les embryons sont ensuite rincés au PBS 1X puis déshydratés dans des bains de concentration croissante en MetOH. Ils sont ensuite conservés à -20°.

c. REHYDRATATION ET DECOLORATION DES EMBRYONS

- MetOH 100% **3 min**
- MetOH 75% ds PTw **3 min**
- MetOH 50% ds PTw **3 min**
- MetOH 25% ds PTw **3 min**
- PTw **2x3 min**
- Bleaching Solution **5-15 min** (selon stade)
- PTw **3x5 min**

d. PRETRAITEMENTS ET PREHYBRIDATION

- Proteinase K à 10 µg/mL **5 min**
- Glycine 2 mg/mL **2x5 min**
- PTw **2x5 min**
- PFA 4% + glutaraldéhyde 0,2% **20 min**
- PTw **3x5 min**
- Borohydrure Sodium Solution 0,1% **20 min**
- PTw **3x5 min**
- Tampon d'hybridation **2x5 min RT puis 2h à 65°C**
- Répartir les embryons dans les puits de la plaque du robot

e. ÉTAPES SE DEROULANT DANS LE ROBOT (MAIS POUVANT ETRE REALISEES MANUELLEMENT)

- Hybridation (sonde à 1-2 µg/mL) **la nuit à 63°C**
- Rinçage en tampon d'hybridation **15 mn**
- Rinçage en tampon d'hybridation, 2xSSC + 0,1% chaps (50:50) **15min à RT**
- Rinçage en 2x SSC + 0,1% chaps **2x40 min à +65°C**
- Rinçage en 0,2x SSC + 0,1% chaps **2x40 min à +65°C**
- Rinçage en TNX **15 min à RT**
- Blocking Buffer **2h à RT**
- Anticorps anti DIG dilué 1/2000 dans Blocking Buffer **la nuit à +4°C**
- Rinçage en TNX **5x1h à RT**
- NTMT, 2mM Levamisole **2x10 min à RT**
- Révélation en NBT/BCIP (3,5µL/mL de tampon NTMT)
- Arrêt ds PTw, EDTA 1mM **3x5 min à RT**

f. INCLUSION ET COUPES AU VIBRATOME

- Post-fixation en PFA 4%, glutaraldéhyde 0,25% **20 min à RT**
- Inclusion en agarose « low melting » 4%
- Coupes au vibratome
- Montage des coupes entre lames et lamelles

Protocole n°4 : Immunomarquage sur coupe cryostat

- Réhydratation en PBS 1X **10 min**
- Si immunomarquage anti-BrdU : traitement HCl 2N **45 mn**
- Lavages en PBS 1X **3x5 mn**
- Saturation des sites non spécifiques en PBS 1X, triton 0,1%, goat serum 5% (PBST-GS) **20 mn**
- Incubation dans l'anticorps primaire dilué dans du PBST-GS (monoclonal anti-XAR1 1/10^{ème}, polyclonal anti-CRALBP 1/1000^{ème}, monoclonal anti-Calbindin 1/100^{ème}, monoclonal anti-rhodopsin 1/100^{ème}, monoclonal anti-syntaxin 1/500^{ème}, monoclonal anti-BrdU 1/10^{ème}, polyclonal anti-PH3 1/500^{ème}) **la nuit à 4°C**
- Lavages en PBS 1X **3x5 mn**
- Incubation dans l'anticorps secondaire dilué dans du PBST-GS (1/1000^{ème}, Alexa Fluor, Molecular probes) **2h à température ambiante**
- Lavages en PBS 1X **3x5 mn**
- Coloration nucléaire au Hoechst **10 mn**
- Lavages en PBS 1X **2x5 mn**
- Montage des lames en fluorsave (Calbiochem)

Protocole n°5 : Immunomarquage sur coupes paraffine

a. FIXATION

- | | |
|--|--------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Fixation des embryons en PFA 4% | toute la nuit à 4°C |
| <input type="checkbox"/> EtOH 70% | 3x30 min |
| <input type="checkbox"/> EtOH 90% | 1h |
| <input type="checkbox"/> EtOH 100% | 3x1h |
| <input type="checkbox"/> 100% Butanol | toute la nuit à RT |
| <input type="checkbox"/> Praffine | toute la journée à 65°C |
| <input type="checkbox"/> Coupes microtome | |

b. DEPARAFFINAGE

- | | |
|------------------------------------|----------------|
| <input type="checkbox"/> Xylène | 2x5 min |
| <input type="checkbox"/> EtOH 100% | 5 min |
| <input type="checkbox"/> EtOH 95% | 5 min |
| <input type="checkbox"/> EtOH 80% | 5 min |
| <input type="checkbox"/> EtOH 70% | 5 min |
| <input type="checkbox"/> EtOH 50% | 5 min |
| <input type="checkbox"/> PBS 1X | 2x5 min |

c. DEMASQUAGE

- | | |
|---|--------------------|
| <input type="checkbox"/> Démasquage en sodium citrate (10mM, pH 6.0), Tween 20 0.05% : Chauffer au micro-ondes à forte puissance, jusqu'à bouillir. | |
| <input type="checkbox"/> Rechauffer à faible Puissance | 9 min |
| <input type="checkbox"/> Laisser refroidir | 20 min à RT |
| <input type="checkbox"/> lavage en H2O | 3x5 min |

d. PERMEABILISATION

- | | |
|--|--------------------|
| <input type="checkbox"/> PBS 1X | 5 min |
| <input type="checkbox"/> PBS 1X, Triton X-100 0.2% | 45 min à RT |
| <input type="checkbox"/> PBS 1X | 3x5 min |

e. BLOCKING ET ANTICORPS

- | | |
|---|----------------------------|
| □ PBS 1X, GS 10%, BSA 1X | 1h |
| □ L'anticorps primaire dilué dans du PBS-GS-BSA | Toute la nuit à 4°C |
| □ PBS 1X | 3x5 min |
| □ L'anticorps secondaire dilué dans du PBS-GS-BSA | 2h à RT |
| □ Lavages en PBS 1X | 3x5 mn |
| □ Coloration nucléaire au Hoechst | 10 mn |
| □ Lavages en PBS 1X | 2x5 mn |
| □ Montage des lames en fluorsave (Calbiochem) | |

Protocole n°6 : Rétro-transcription et PCR quantitative en temps réel

a. SOLUTIONS

RNA Later :

EDTA 0,5M	4ml
Citrate de sodium disodique 1M (filtrées 3 μ m et autoclavées)	1,25ml
Citrate de sodium trisodique 1M (filtrées 3 μ m et autoclavées)	1,25ml
Sulfate d'ammonium	47,2g (ne se dissout que si 100ml)
Ajuster pH 5,2 avec H ₂ SO ₄	
Qsp 100ml avec H ₂ O	(éventuellement chauffer 50°-60° pour bien dissoudre)

b. DISSECTION DES RETINES

- Anesthésier les embryons dans du MS222 à 0,4g/L
- Disséquer les rétines sous la loupe avec des pins
- Récupérer les rétines dans un tube 1,5ml contenant déjà 1ml de RNA later

c. RNA EXTRACTION

Utilisation du Kit Macherey Nagel: Nucleospin RNA XS

- 4 lavages au PBS1X suivis d'une centrifugation de 30 secondes à 10000g pour éliminer le RNA later
- Lyse des tissus
 - * Ajouter 204 μ L du MIX TCEP + RA1 (4 μ L de TCEP dans 200 μ L de tampon RA1 par tube)
 - * Vortex 2x5 secondes
 - * Homogénéisation mécanique avec un pilon
- RNA carrier
 - * Ajouter 5 μ L de la working solution RNA carrier (préparer 1 μ L de RNA carrier dans 99 μ L de tampon RA1)
 - * Vortex 2x5 secondes
 - * Centrifugation 1 seconde à 1000g
 - * Charger sur une colonne placée sur un tube de 1,5ml

* Centrifugation 30 secondes à 11000g.

□ Filtration de l'échantillon

* Ajouter 200 μ L d'éthanol 70%.

* Charger sur une colonne placée sur un tube de collection

* Centrifugation 30 secondes à 11000g

* Ajouter 100 μ L de MDB

* Centrifugation 30 sec à 11 000g

□ Digestion de l'ADN

* Ajouter 25 μ L de la solution rDNase (pour un tube, préparer auparavant 3 μ l de rDNase dans 27 μ l de tampon rDNase)

* Incubation 15min à température ambiante

□ Lavages

* Ajouter 100 μ L tampon RA2

* Incubation 2 min à température ambiante

* Centrifugation 30 sec à 11000g

* Ajouter 400 μ L tampon RA3

* Centrifugation 30 sec à 11 000g

* Ajouter 200 μ L tampon RA3

* Centrifugation 2 min à 11000g

□ Elution

* Place la colonne dans un tube eppendorf de 1,5mL annoté

* Ajouter 30 μ L d'eau RNase free

* Centrifugation 30 sec à 11 000g

□ Conservation des échantillons d'ARN à -20°C

d. EXPERION

Sortir le kit 15min minimum avant pour un retour à RT

□ Préparation des électrodes

* 800 μ L d'électrode cleaning 2min

* 800 μ L d'eau 1x5 min puis 1x1 min

* Laisser sécher (capot ouvert) 1min

□ Préparation des échantillons d'ARN et du ladder

* Ajouter 1,3 μ L d'ARN (dans un tube 0,2mL si dénaturation dans machine qPCR)

- * 1,3ul de Ladder
 - 2min à 70°C (machine qPCR ou au bain marie)
 - 5min dans la glace
 - Centrifuger et conserver dans la glace

□ Préparation des réactifs

- * la matrice G:
 - Transférer 600μL du tube de Matrice G dans un spin filter (fourni avec le kit)
 - Centrifuger 10min à 1500g
 - La matrice G est stable pendant 4 semaines, puis la refiltrer
- * la matrice GS: (volume bon pour 3 puces, se garder 34h à l'abri de la lumière)
 - Mettre 65ul G (bien vortexer avant de pipeter)
 - Ajouter 1ul Stain et vortexer (stable 1 jour au noir)

□ Préparation de la puce - AUCUNE BULLE -

- * Déposer 9μL de GS dans le puits d'amorçage GS (jaune surligné)
 - Amorçage code **B1** (attention aux flèches)
- * Déposer 9μL de GS dans le second puit GS non surligné
- * Déposer 9μL de G dans le puits de rinçage G
- * Préparer un tube contenant 70μl de Loading Buffer
 - Dans les puits 1 à 12 et le puit L: 5μL de Loading Buffer
 - Dans les puits 1 à 12: 1μL d'échantillon d'ARN dénaturé (ou 1μl d'eau)
 - Dans le puit L 1μL de ladder dénaturé
- * VORTEXER (Power/Mix/Arrêt automatique)
- * Installer dans l'appareil Experion

□ Logiciel Experion

- * Create New run
 - Assay: RNA-Eukaryotes total RNA stdsens
 - Projet
 - Run
- * START, puis indiquer le nombre d'échantillon

□ Rinçage des électrodes

- * 800μL d'eau 1min
- * Laisser sécher (capot ouvert) 30 secondes
- * 800μL d'électrode cleaning 5min
- * 800μL d'eau 4x1min

□ Résultats

- * Cliquer sur l'onglet Run summary
- * Clic gauche/Copy table to clipboard
- * Puis coller dans Word/Excel

□ RT-PCR (synthèse d'ADNc)

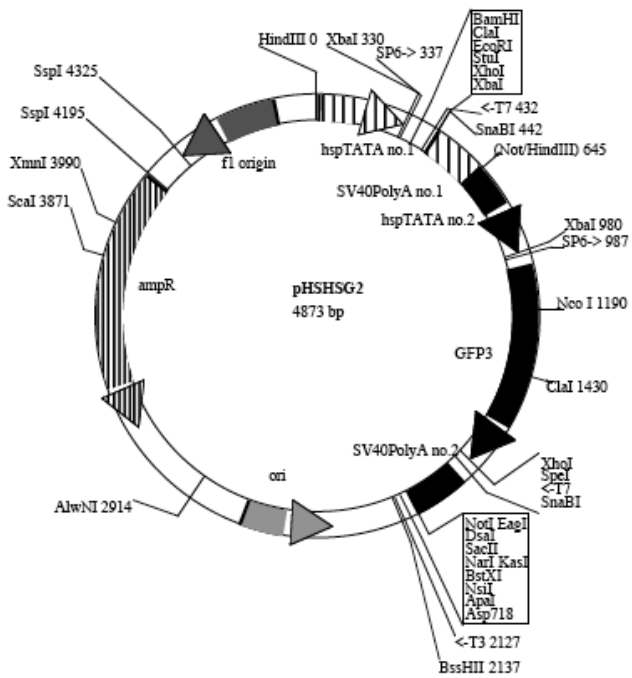
* Mix de réaction

- | | |
|--|------|
| ○ 5x iScript reaction mix | 4µl |
| ○ iScript reverse transcriptase | 1µl |
| ○ Nuclease-free water | xµl |
| ○ RNA template (100 fg to 1 µg ARN total)* | xµl |
| ○ Total volume | 20µl |

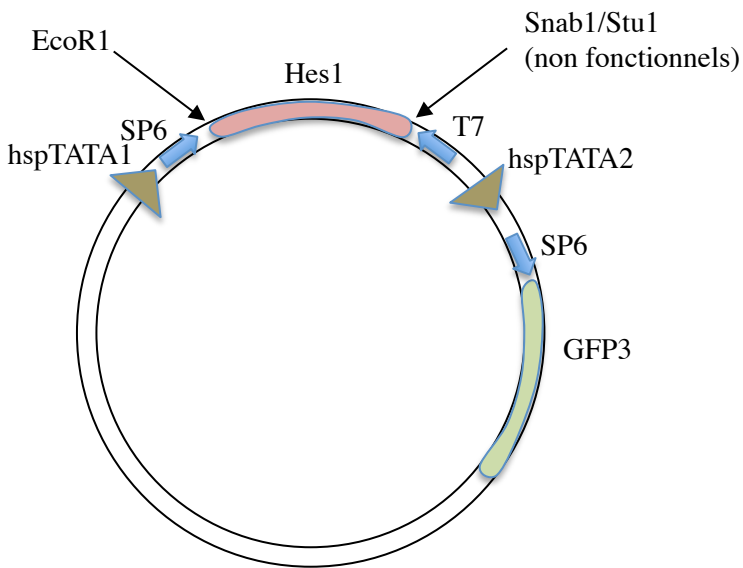
* Incubate complete reaction mix (programme iScript)

- 5 min à 25°C
- 30 min à 42°C
- 5 min à 85°C

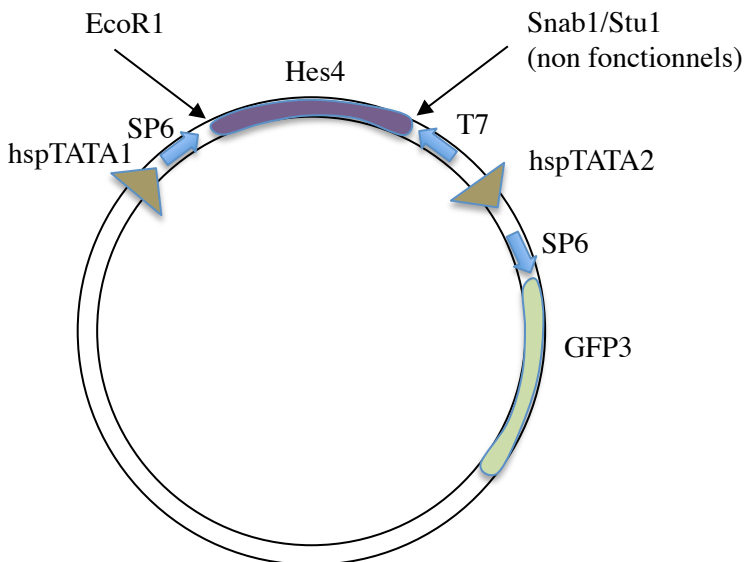
3. ANNEXE III : CONSTRUCTIONS



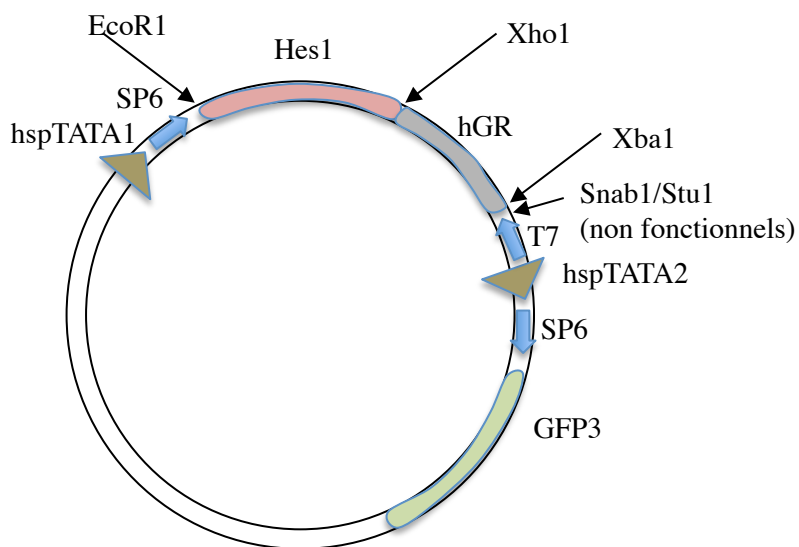
Plasmide : pSHSG2
 Construit par: Stefan Hoppler



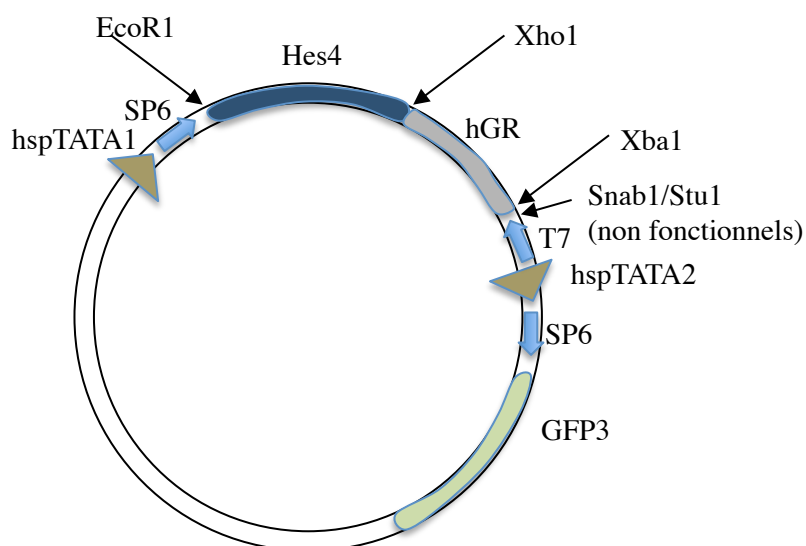
Nom:
 Hes1-pSHSG2
 Cloning site:
 5'-EcoR1, 3'-Snab1 (insert)/Stu1(backbone)



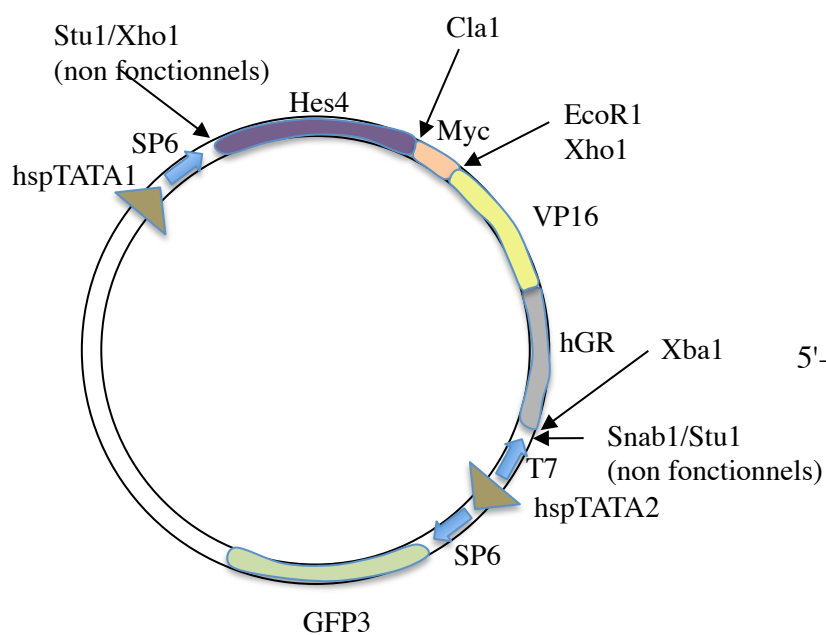
Nom:
 Hes4-pSHSG2
 Cloning site:
 5'-EcoR1, 3'-Snab1 (insert)/Stu1(backbone)



Nom:
Hes1GR-pHSHSG2
Cloning site:
5'-EcoR1, 3'-Snab1 (insert)/Stu1(backbone)



Nom:
Hes4GR-pHSHSG2
Cloning site:
5'-EcoR1, 3'-Snab1 (insert)/Stu1(backbone)



Nom:
Hes4VP16GR-pHSHSG2
Cloning site:
5'-Xho1-blunt, 3'-Snab1 (insert)/Stu1(backbone)

Rôle des répresseurs transcriptionnels *Hes1/4* dans la maintenance des cellules souches rétiniennes chez *Xenopus laevis*

Contrairement aux mammifères, la rétine des amphibiens et des poissons croît tout au long de la vie de l'animal grâce à l'activité de cellules souches neurales présentes dans une région de neurogenèse continue appelée zone marginale ciliaire (ZMC). Leur caractérisation moléculaire et la compréhension des mécanismes qui sous-tendent leur activité et leur maintenance pourraient trouver des applications majeures dans le traitement par thérapie cellulaire des patients atteints de pathologies neurodégénératives de la rétine.

Au cours de ma thèse, je me suis principalement penché sur deux problématiques majeures : quelle est l'origine ontologique de ces cellules souches adultes et comment se maintiennent-elles au cours de la rétino-genèse embryonnaire ? J'ai abordé ces deux questions *via* l'analyse descriptive et fonctionnelle de deux gènes, *Hes1* et *Hes4*, identifiés dans mon laboratoire comme des marqueurs spécifiques des cellules souches rétiniennes. Ces gènes codent pour des répresseurs transcriptionnels de type bHLHO.

L'étude de leur dynamique d'expression au cours du développement montre que ces gènes marquent un territoire restreint, situé initialement à la frontière entre l'épithélium pigmenté rétinien (EPR) présomptif et la rétine neurale, dont l'évolution au cours du temps suggère qu'il est à l'origine de la cohorte des cellules souches adultes. Ces résultats permettent pour la première fois de proposer que ces dernières seraient ségréguées très tôt au cours de l'embryogenèse rétinienne des cellules destinées à se différencier.

Je me suis ensuite posé la question du rôle de *Hes1/4* dans la maintenance de ces cellules souches présomptives. Mes expériences de gain de fonction suggèrent que ces gènes contribuent de façon autonome cellulaire (i) à les empêcher de se différencier vers un destin EPR ou neuronal, (ii) à les maintenir en prolifération et (iii) à ralentir leurs divisions. Enfin, j'ai également travaillé à positionner les gènes *Hes1/4* dans le réseau de signalisation qui contrôle les cellules souches rétiniennes en étudiant leur régulation par les voies Wnt, Hedgehog et Notch. L'ensemble de mes données me permet de proposer un modèle selon lequel les facteurs *Hes1/4*, sous contrôle positif de la voie Wnt, permettent au cours du développement la maintenance à l'état indifférencié et en prolifération lente d'une population cellulaire destinée à former la cohorte des cellules souches adultes de la ZMC.