La coopération entre cellules ganglionnaires de la rétine façonne la connectivité du système visuel

Alice Louail

▶ **To cite this version:**

Alice Louail. La coopération entre cellules ganglionnaires de la rétine façonne la connectivité du système visuel. Neurobiologie. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS212 . tel-02922889

HAL Id: tel-02922889
https://theses.hal.science/tel-02922889

Submitted on 26 Aug 2020

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.

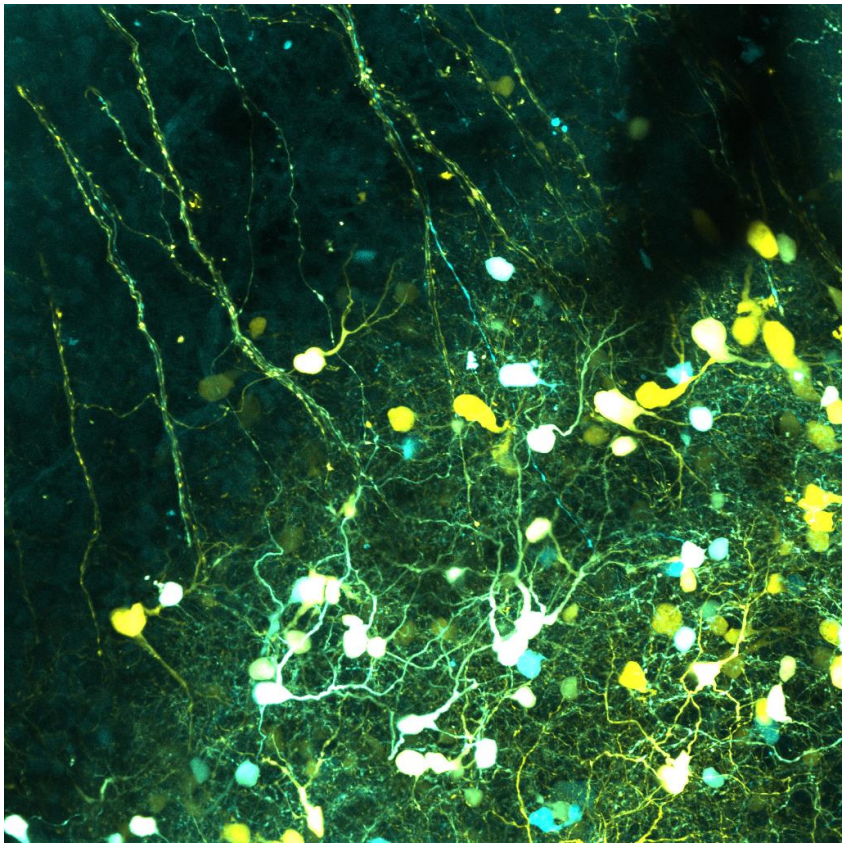
SORBONNE UNIVERSITE

Ecole doctorale cerveau cognition comportement – ED 158

Institut de la Vision, équipe "Mécanismes de développement des cartes sensorielles"

La coopération entre cellules ganglionnaires de la rétine façonne la connectivité du système visuel

par **Alice LOUAIL**



Thèse de doctorat en Neurosciences, sous la direction de **Xavier NICOL**

Présentée le 19 septembre 2019 devant un jury composé de :

Dr Isabelle BRUNET	Rapportrice
Dr Michael REBER	Rapporteur
Dr Patricia GASPAR	Examinatrice
Dr Nicolas GERVASI	Examinateur
Dr Xavier NICOL	Examinateur

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord toutes les personnes avec lesquelles j'ai travaillé pendant ces presque 5 années à l'Institut. Merci aussi bien l'équipe Nicol que l'équipe du 3e et 4e de l'IdV, qui ont fait de ces années de thèse un plaisir. J'espère trouver dans la suite de ma carrière autant de partage et d'entraide, d'éclats de rire quotidiens et d'échanges de tout type (scientifiques, internationaux, alimentaires ou festifs).

Je remercie très affectueusement Sandrine pour l'accueil chaleureux qu'elle m'a réservé à mon arrivée à l'IdV. Tu as permis la réalisation de mon projet en étant le cerveau de la biologie moléculaire du labo, et tu m'as d'ailleurs laborieusement appris toutes les bases du clonage. Enfin, toutes les discussions avec toi et ton soutien indéfectible, même après ton départ de l'équipe, font que je remercie une super collègue, mais aussi une amie.

Je remercie Xavier, évidemment, pour m'avoir ouvert les portes de son labo. Merci pour ta disponibilité : la porte de ton bureau a toujours été ouverte, mais tu m'as aussi laissé étudier mes propres pistes de recherche sur mon projet de thèse. Merci de t'être autant investi pour m'inculquer le côté obscur des statistiques et des mathématiques de base. Merci pour ta patience et pour ta confiance, qui m'a permis d'élaborer assez librement, mais toujours soutenue.

Je remercie aussi Fiona, qui a su et accepté de cloner les constructions moléculaires les plus tarabiscotées sorties de ma tête. Merci Sarah, qui a rendu mon bureau et les journées de labo beaucoup plus sympathiques, et à qui je souhaite le meilleur pour sa thèse. Je suis aussi très reconnaissante envers mes souris, sans lesquelles tout ce travail serait impossible ; et évidemment tous ceux qui m'ont appris à m'en occuper (Quenol, Julie).

Je remercie Sonia, qui a toujours été d'excellent conseil pendant ces années de thèse, après m'avoir permis d'entrer dans le monde de la recherche comme toute jeune stagiaire.

Je remercie aussi tous mes relecteurs, y compris mes parents et Margot ; mes amis *outsiders* (et surtout Léa), qui m'ont forcé à vulgariser mon travail et à sortir la tête des neurones de temps en temps. Merci à Prince, Aretha et les montagnes, pour avoir aidé à émerger des neurosciences.

Enfin, je remercie Oriol, pour avoir été le meilleur *co-worker/co-bencher* pendant mon doctorat. Grâce à toi le labo était toujours coloré et toujours occupé. Tu m'as appris la culture de neurones d'hippocampe et comment ne pas la contaminer au bout de 15 jours Tu m'as appris l'importance de la dérision dans ce métier, et comment trouver la part de magie dans la vie de chercheur, et dans la vie en général.

SOMMAIRE

Liste des abréviations **8**

INTRODUCTION **12**

1. Le système visuel **13**

1.1. La rétine 13

1.2. Les cellules ganglionnaires de la rétine 15

1.3. Le chiasma optique 19

1.4. Les cartes visuelles 21

1.5. Développement de la carte rétinotopique 24

1.6. Développement de la lamination 26

1.7. Développement de la carte œil-spécifique 27

2. Implication de l'activité rétinienne spontanée dans le développement des projections de la rétine **29**

2.1. L'activité spontanée dans la rétine 30

2.2. Les vagues cholinergiques durant la seconde phase d'activité spontanée 32

2.3. Rôle des cellules amacrines dans la propagation des vagues cholinergiques 33

2.4. Rôle des vagues calciques cholinergiques dans le développement des projections rétiniennes 34

3. Compétition **37**

3.1. Compétition entre axones 38

3.2. Importance de l'activité corrélée de cellules voisines dans la compétition entre axones 40

3.3. Stabilisation synaptique dans les cibles visuelles intermédiaires 41

4. Rôle de l'AMP cyclique dans le développement des projections de la rétine **45**

4.1. Les adénylate cyclases 45

4.2. Régulation de la concentration d'AMPc 46

4.3. Signalisation en aval de l'AMP cyclique 50

4.4. Signaux locaux d'AMP cyclique 52

4.5. Rôle de l'AMPc dans le développement des projections rétiniennes 54

5. Autres mécanismes 56

5.1. Rôle de la mort cellulaire dans le développement des projections visuelles 56

5.2. Rôle de la sérotonine dans le développement des projections visuelles 57

5.3. Rôle de la microglie dans le développement des projections visuelles 58

MATERIEL & METHODES 62

RESULTATS 66

PARTIE 1 : Le rôle de l'AMP cyclique dans les interactions entre les CGR 67

1. La coopération entre les cellules ganglionnaires de la rétine participe au raffinement des axones rétiniens 67

2. La Cre recombinase est spécifiquement exprimée par les CGR ventro-temporales chez les souris *Ptf1aCre ; Tau-GFP* 104

3. Le développement de la connectivité dans les mécanismes coopératifs dépendants de l'AMPc 108

PARTIE 2 : Le rôle de l'activité électrique dans le développement et les interactions des CGR 113

PARTIE 3 : Le soma et l'axone, deux compartiments de signalisation AMP cyclique distincts 118

RESULTATS ANNEXES 124

PARTIE 1 : Interactions entre CGR ipsi-latérales dépendantes de l'AMPc 125

PARTIE 2 : Intensité des mécanismes coopératifs 126

PARTIE 3 : Impact du blocage de l'activité de quelques CGR sur le développement global de la carte binoculaire 129

DISCUSSION 131

1. Le développement des projections rétiniennes en l'absence d'AMPc 132

2. Le développement des synapses dans les mécanismes coopératifs 133

2.1. Morphologie des synapses 133

2.2. Transmission synaptique 134

3. Rôle du compartiment axonal dans la coopération entre CGR 135

3.1. Signaux axonaux d'AMPc 135

3.2. Traduction locale de protéines 137

4. Autres mécanismes potentiellement impliqués dans les mécanismes coopératifs 138

4.1. Signalisation rétrograde 138

4.2. Microglie 141

5. Rôle de l'activité des CGR pendant le développement des projections rétiniennes 142

5.1. L'absence d'activité électrique dans les CGR perturbe le développement de leur connectivité 142

5.2. L'activité relative des CGR adjacentes pourrait instruire le développement de la connectivité rétinienne 143

6. L'activité spontanée et la signalisation AMPc dans les interactions entre CGR pendant le développement de la connectivité visuelle 146

6.1. Deux composantes de l'activité électrique 146

6.2. La signalisation AMPc dans le compartiment somatique corrèle l'activité électrique des CGR 147

6.3. La signalisation AMPc dans le compartiment axonal agit en aval de l'activité synchrone des CGR pour co-stabiliser leurs synapses 147

ANNEXES 152

BIBLIOGRAPHIE 155

Liste des abréviations

AC : adénylate cyclase

ACh : acétylcholine

ADN : acide désoxyribonucléique

AKAP : *A-kinase anchoring protein*

AMPA : acide α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionique

AMPc : 3'-5'-adénosine-monophosphate cyclique

APP : *amyloid protein precursor*

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine-triphosphate

BDNF : *brain-derived neurotrophic factor*

β2nAChR : sous-unité β2 du récepteur nicotinique à l'acétylcholine

Ca^{2+} : calcium

CaM : calmoduline

CB : endocannabinoïdes

CFP : *cyan fluorescent protein*

CGLd : corps genouillé latéral dorsal

CGLv : corps genouillé latéral ventral

CGR : cellule ganglionnaire de la rétine

CGRip : cellule ganglionnaire de la rétine intrinsèquement photosensible

CREB : *cAMP responsive element binding protein*

CS : colliculus supérieur

CTNF : *ciliary neurotrophic factor*

Epac : *exchange protein activated by cAMP*

GABA : acide γ-aminobutyrique

GFP : *green fluorescent protein*

GMPc : 3'-5'-guanosine-monophosphate cyclique

JAM : molécule de jonction adhérente

LTD : *long term depression*

LTP : *long term potentiation*

MAOA : monoamine oxydase A

MAP : *microtubule associated protein*

MEC : matrice extra-cellulaire

MTN : *médial terminal nucleus*

NMDA : N-methyl-D-aspartate

NO : nerf optique

NSC : noyau supra-chiasmatique

ooDSGC : *on-on direction selective ganglion cell*

PDE : phosphodiesterase

PKA : protéine kinase A

PPSE : potentiel post-synaptique excitateur

PPSI : potentiel post-synaptique inhibiteur

RCPG : récepteur couplé aux protéines G

RBPMS : *RNA binding protein with multiple splicing*

SAC : *starburst amacrine cells*

SERT : *serotonin transporter*

SGS : *stratum griseum superficiate*

SNC : système nerveux central

Sncg : synucléine gamma

SO : *stratum opticum*

SOA : système optique accessoire

STD : *short term depression*

SYP : synaptophysine

TO : tractus optique

TTX : tetrodotoxine

V1 : cortex visuel primaire

VGLUT : *vesicular glutamate transporter*

YFP : *yellow fluorescent protein*

ZT : zone de terminaison

5-HT : sérotonine

INTRODUCTION

1. Le système visuel

Le système nerveux est composé de plus d'un milliard de neurones et de mille fois autant de synapses. Une question majeure en neurosciences développementales est de comprendre comment une connectivité si précise est établie entre ces neurones. Parmi les modèles utilisés pour décrire les connexions entre neurones, le système visuel est particulièrement adapté pour étudier le développement des axones. L'organisation des projections rétiniennes a en effet été décrite en détail dans la littérature, générant une connaissance approfondie de leur modèle de connectivité (Godement et al., 1984; Hong and Chen, 2011).

Les connexions entre la rétine et le cerveau sont très précises et sont facilement visualisables et manipulables. De nombreuses espèces animales sont utilisées comme modèle pour étudier leur système visuel : le poisson-zèbre, la drosophile, le furet, le rongeur, le chat, etc. Ce travail de thèse utilise comme système d'étude les projections rétiniennes de la souris.

1.1. La rétine

La rétine des mammifères est constituée de plusieurs couches de cellules entre lesquelles s'établissent des contacts synaptiques (**Figure 1**). Pendant le développement, six types de neurones et un type de cellules gliales sont générés, dans un ordre conservé au travers de l'évolution des espèces (Bassett and Wallace, 2012).

Les cellules ganglionnaires (CGR) sont produites en premier, suivies par les cellules horizontales, les cônes et les cellules amacrines. Puis, les bâtonnets, les cellules bipolaires et enfin la glie de Müller sont générés (Livesey and Cepko, 2001) (**Figure 2**). Les progéniteurs des divers types cellulaires de la rétine sont multipotents. Ils passent par des vagues de compétence et ainsi acquièrent puis perdent la capacité à générer certaines cellules post-mitotiques. La production de ces divers types cellulaires n'est ainsi pas séquentielle, puisque plusieurs types cellulaires différents peuvent être générés à un temps donné. L'exposition de

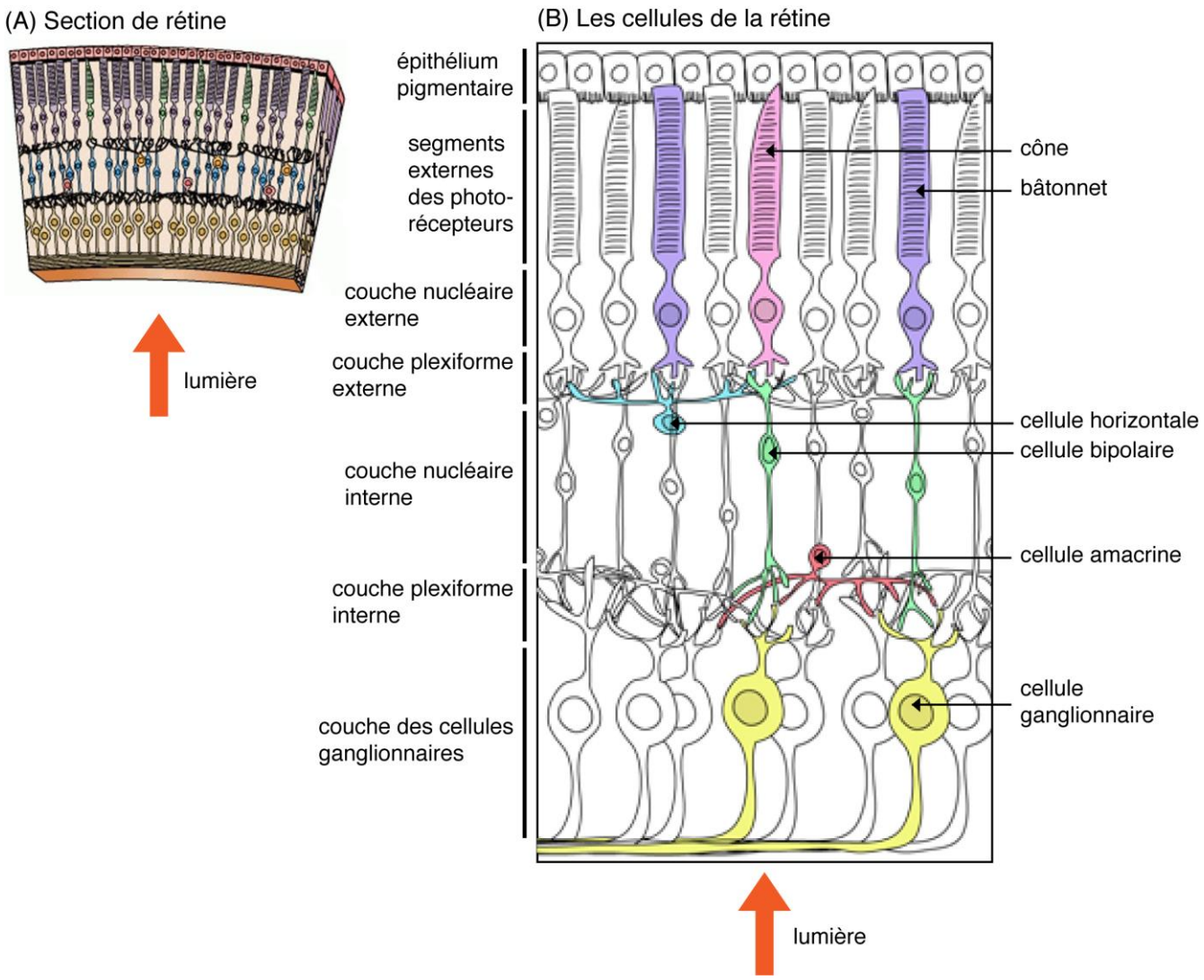


Figure 1 : La rétine. La rétine est constituée de plusieurs couches de cellules. Les couches nucléaires contiennent les corps cellulaires ; les couches plexiformes sont le siège des synapses (adapté de Purves *et al*., 2004).

cellules rétiniennes, à un moment où elles sont dans un état de compétence permettant de générer des cônes, à des facteurs environnementaux (par exemple CNTF, ciliary neurotrophic factor ou LIF, leukemia inhibitory factor) empêche leur différenciation en cônes. Dans un état de compétence particulier, la génération d'un type particulier de cellules est donc régulée par des signaux extrinsèques (Cepko et al., 1996). Chaque progéniteur peut également donner naissance à différents types cellulaires (Livesey and Cepko, 2001) . Les somas de ces cellules sont distribués dans trois couches nucléaires séparées par deux couches plexiformes où se trouvent les contacts synaptiques entre ces différentes cellules.

La couche la plus externe de la rétine contient les photorécepteurs, les cônes et les bâtonnets ; la couche nucléaire interne contient des interneurones : les cellules bipolaires, horizontales et

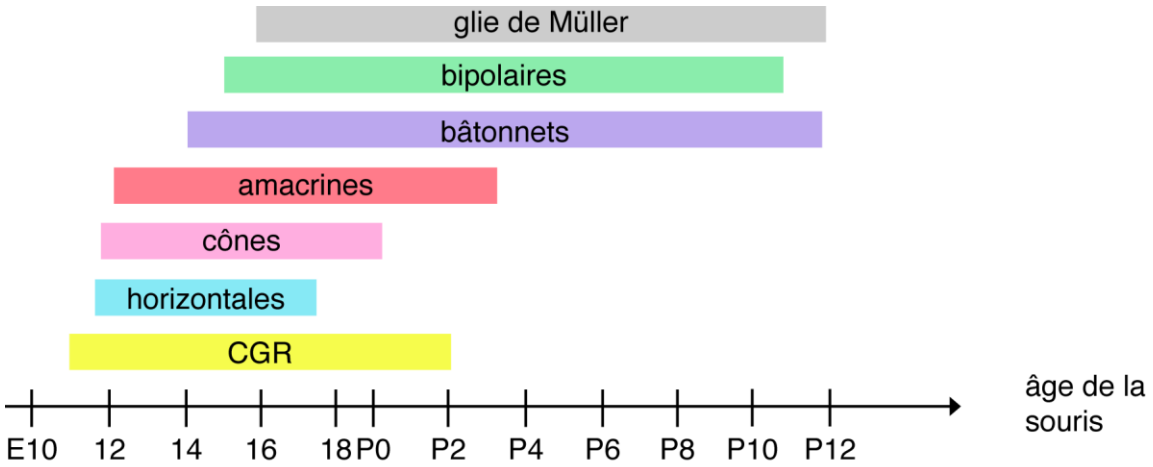


Figure 2 : La différenciation des cellules de la rétine. Chez la souris, les CGR sont les premières cellules à se différencier dans la rétine, suivies des cellules horizontales, des cônes et des amacrines. Les dernières cellules à se différencier sont les cellules bipolaires et gliales (adapté de Bassett *et al*., 2012).

amacrines (**Figure 1 ; B**). Enfin, la couche la plus interne de la rétine contient les cellules ganglionnaires de la rétine. Les photorécepteurs sont de deux types : les cônes qui permettent la vision photopique (ou des couleurs) et les bâtonnets qui permettent la vision scotopique (ou nocturne). Les photorécepteurs contiennent des pigments sensibles à la lumière, et sont connectés aux cellules bipolaires, qui régulent leur activité. L'absorption de la lumière par le pigment du photorécepteur initie une cascade de signalisation cellulaire qui active la transmission synaptique entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires (Purves et al., 2003). Les cellules bipolaires transmettent le message aux CGR auxquelles elles sont connectées. Les cellules amacrines, elles, sont connectées aux CGR, dont elles modulent l'activité au sein de la rétine.

Ce travail de thèse s'intéresse principalement aux CGR, les seuls neurones de la rétine qui transmettent les informations relatives à la stimulation rétinienne jusqu'au cerveau.

1.2. Les cellules ganglionnaires de la rétine

Les CGR partagent toutes les caractéristiques suivantes, à de rares exceptions près : leur soma est situé dans la couche des cellules ganglionnaires ; leurs dendrites, dépourvues d'épines, arborisent dans la couche plexiforme interne, et leur axone projette vers le nerf optique. Par ailleurs, certains marqueurs moléculaires incluent l'ensemble des CGR, comme la

protéine de surface Thy1 (Barnstable and Dräger, 1984) et la protéine de liaison à l'ARN RBPMS (RNA Binding Protein with Multiple Splicing) (Rodriguez et al., 2014). Elles reçoivent des synapses sur leurs dendrites, conduisent des potentiels d'actions et libèrent du glutamate au niveau de leurs terminaisons axonales. Les différents types de CGR projettent ainsi vers une combinaison de plus de 20 régions différentes du cerveau des mammifères (**Figure 3**) (Dhande et al., 2015; Hong and Chen, 2011). Les noyaux du système visuel peuvent être définis en trois catégories : (1) les circuits sous-corticaux responsables de l'état physiologique de l'animal, comme les rythmes circadiens ; (2) les circuits qui contrôlent les réflexes et les mouvements oculaires ; (3) les circuits qui encodent les informations visuelles complexes dans le colliculus supérieur (CS) et le corps genouillé latéral dorsal (CGLd). Le CGLd transmet vers

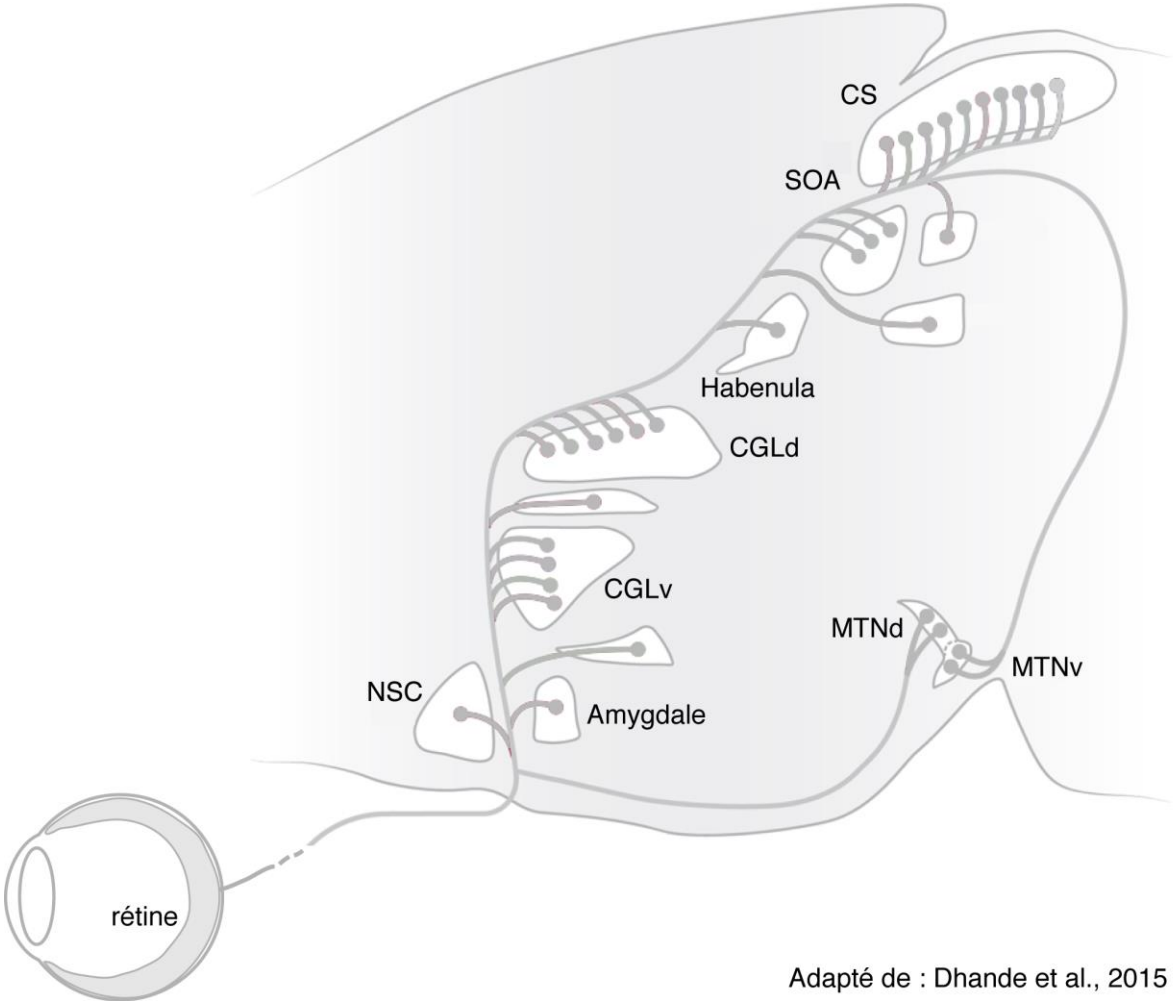
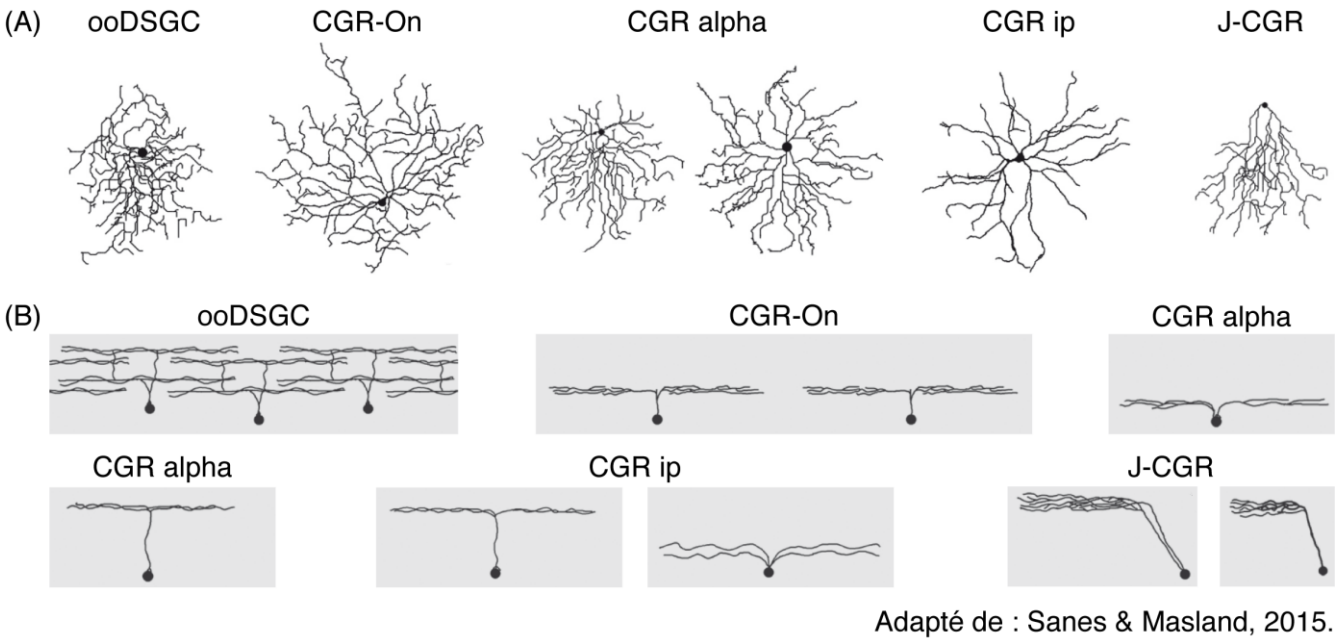


Figure 3 : Projection des CGR dans le cerveau. Les CGR projettent dans diverses régions du cerveau. Leurs cibles principales sont le CGLd et le CS, mais les CGR projettent dans de nombreux autres noyaux du cerveau. CS, colliculus supérieur ; SOA, système optique accessoire ; CGLd, corps genouillé latéral dorsal ; CGLv, corps genouillé latéral ventral ; NSC, noyau supra-chiasmatique ; MTNd, medial terminal nucleus dorsal ; MTNv, medial terminal nucleus ventral.

le cortex visuel les informations concernant la formation d'images, tandis que le CS transporte les informations non-visuelles, comme le contrôle des mouvements de la tête (Assali et al., 2014).

Historiquement, les CGR ont tout d'abord été distinguées en fonction de leur réponse à la lumière et de leur champ récepteurs (Kuffler, 1953). La combinaison d'études morphologiques, électrophysiologiques et moléculaires a permis de distinguer plus d'une trentaine de sous-types de CGR, recensés par Sanes & Masland en 2015. Quatre critères définissent un sous-type de CGR : leur morphologie et particulièrement celle de leurs dendrites, leur expression de gènes, leur espacement et leur propriétés physiologiques (Dhande et al., 2015; Sanes and Masland, 2015) (**Figure 4**). Quelques exemples de sous-types de CGR :

- Les CGR-On/Off spécifiques de l'orientation (On-Off directionally selective ganglion cells,



Adapté de : Sanes & Masland, 2015.

Figure 4 : Hétérogénéité des sous-types de CGR. Les différents types de CGR présentent des morphologies très variées, visibles en présentation "à plat" **(A)**, ou en coupe **(B)**.

ooDSGC). Elles s'activent spécifiquement en réponse à l'augmentation ou à la diminution de l'intensité lumineuse (respectivement CGR-On et CGR-Off) (Hong and Chen, 2011; Sanes and Masland, 2015) et répondent de façon optimale dans une direction préférentielle. Leur arbre dendritique, bi-stratifié, est retrouvé dans les sous-couches a et b de la couche plexiforme interne (Famiglietti and Kolb, 1976) et est en relation étroite avec les dendrites d'un sous-type de cellules amacrines, les cellules étoilées. Il en existe 4 types, qui diffèrent

selon leur direction préférentielle et leur modèle de projection : par exemple, les CGR spécifiques de l'orientation ventrale ou nasale sont ségrégées dans le CGLd (Sanes and Masland, 2015).

- Les CGR-On spécifiques de l'orientation, décrites par Barlow and Levick (Barlow et al., 1964), répondent spécifiquement à une augmentation de l'intensité lumineuse. Leur arbre dendritique est présent dans la sous-couche b de la couche plexiforme interne (Famiglietti and Kolb, 1976) et est également étroitement lié à ceux des cellules amacrines étoilées. Ces CGR projettent vers le système optique accessoire, dans lequel elles contrôlent le réflexe opto-cinétique (dans le noyau prétectal). On distingue 3 types, qui diffèrent également selon leur direction préférentielle.

- Les CGR alpha (CGRα) sont reconnaissables grâce à leur gros corps cellulaire et leur axone massif, et sont caractérisables avec un marquage de ostéopontine (Duan et al., 2015) ou neurofilament. Il existe 4 types de CGRα différentes, en fonction de leur réponse à la lumière, transitoire ou continue : (On-sustained, Off-sustained, On-transient, Off-transient). Ces 4 types de CGRα ont des activités électriques similaires, plus rapides que celles des autres types de CGR (Krieger et al., 2017).

- Les CGRip (CGR intrinsèquement photosensibles), expriment la mélanopsine, un photopigment. Elles répondent donc directement au stimulus lumineux, sans l'intervention des cônes ou des bâtonnets. Elles jouent un rôle majeur dans la gestion des rythmes circadiens ou du réflexe pupillaire et projettent vers le noyau supra-chiasmatique ou le noyau prétectal olivaire, respectivement (Berson et al., 2002; Hattar et al., 2002).

- Un autre type de CGR a été identifié grâce à leur expression de la molécule de jonctions adhérentes B (JAM-B (Kim et al., 2008). Les arbres dendritiques de ces cellules, baptisées J-CGR, sont particulièrement asymétriques et alignés dans une direction ventrale à dorsale dans la rétine.

Au sein du CS et du CGLd aussi, des sous-types distincts de CGR projettent dans des couches différentes, qui en retour projettent vers des noyaux différents du cerveau (voir plus loin, Hong and Chen, 2011). Par ailleurs, chaque rétine contacte les deux hémisphères du cerveau, mais une seule CGR projette dans un seul hémisphère. On distingue ainsi deux sous-populations : les CGR ipsi-latérales dont l'axone projette dans le même hémisphère que la rétine contenant le soma ; et les CGR contra-latérales, projetant dans l'hémisphère opposé. Les CGR ipsi-latérales sont localisées dans le croissant ventro-temporal (VT) de la rétine. La proportion de CGR ipsi-latérales est corrélée avec l'extension de la binocularité au travers de l'évolution. Chez la souris, les projections ipsi-latérales ne représentent que 5 % des CGR (Petros, 2008), chez l'homme, environ 50% (Hickey, 1981).

1.3. Le chiasma optique

Au cours du développement, les axones rétiniens poussent à la surface de la rétine jusqu'au disque optique. Des études *in vitro* ont montré que le cristallin sécrète des facteurs inhibant la croissance des axones des CGR. Il existe également des signaux locaux provenant du neuroépithélium qui guident les axones vers le disque optique (Herrera et al., 2017). La présence de molécules d'adhésion et le contact avec d'autres axones déjà présents aident également à diriger la croissance des axones des CGR vers le centre de la rétine. Les molécules de guidage Slit1 et Slit2 sont exprimées par la couche des CGR et la couche nucléaire interne de la rétine ; leur récepteur Robo2 est exprimé par les CGR (**Figure 5**). Chez les souris déficientes pour l'une de ces trois molécules, certains axones quittent la rétine prématurément (Erskine et al., 2000; Ringstedt et al., 2000). Ensuite, ils quittent l'œil en réponse à une molécule de guidage - nétrine1 (Höpker et al., 1999), exprimée par les cellules gliales du disque optique - et forment le nerf optique. La molécule de guidage nétrine est un signal répulsif pour les axones des CGR ayant atteint le disque optique. Il a été proposé que *via* la modulation des niveaux d'AMP cyclique (AMPc) à l'intérieur du cône de croissance, la réponse à la nétrine est convertie en un signal répulsif à leur arrivée au niveau du disque optique (Höpker et al., 1999) . Des signaux tels que Slit2 et Sema5A, exprimés autour du nerf

optique restreignent la croissance des axones à l'intérieur du nerf optique (Herrera, 2017) avant d'atteindre le chiasma (**Figure 5**).

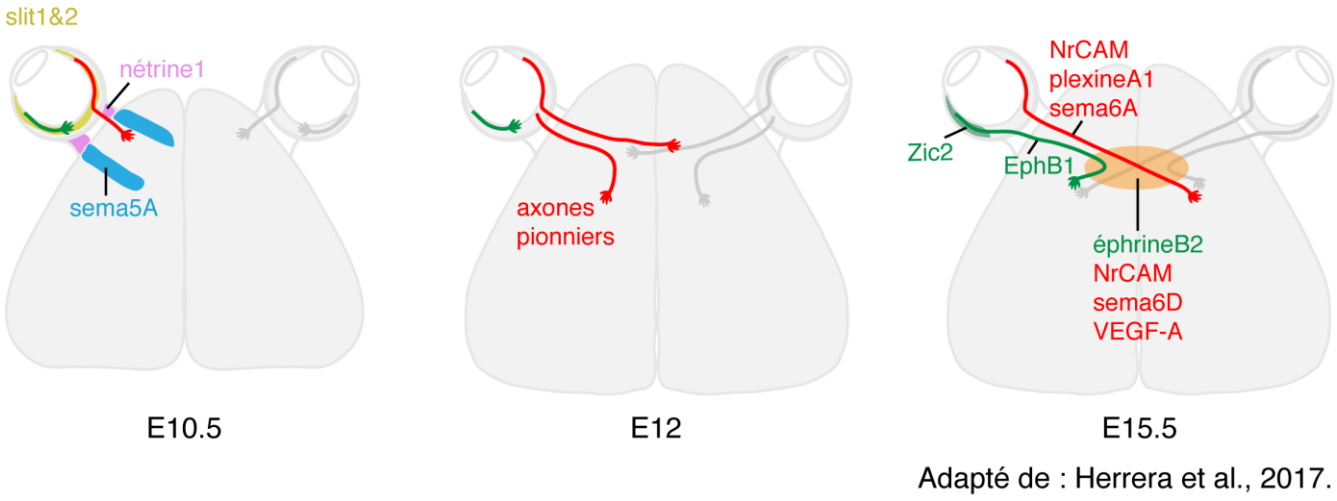


Figure 5 : Le guidage des axones rétiniens au chiasma optique. La croissance des axones rétiniens est dirigée par une combinaison de molécules de guidage, comme *Slit*, présentes dans l'environnement. A E10.5, les axones des CGR contra-latérales commencent à quitter la rétine, en réponse à la nétrine, exprimée au niveau du disque optique **(A)**. A E12, les axones pionniers arrivent au niveau du chiasma optique **(B)**. A E15.5, les axones contra-latéraux, qui expriment diverses molécules comme NrCAM ou plexine, traversent la ligne médiane. Les axones ipsi-latéraux, qui expriment EphB1, sont repoussés au niveau du chiasma, en réponse à éphrine B2 **(C)**.

Les axones rétiniens arrivent au niveau du chiasma optique entre 12 jours de développement embryonnaire (E12) et le jour de la naissance (P0). Les axones contra-latéraux arrivent au niveau du chiasma à E12.5 et entrent dans une palissade de cellules gliales. Un petit nombre d'axones, provenant de la région ventro-centrale, atteint le chiasma à E12,5 (Herrera et al., 2017). Certains de ces axones vont croiser la ligne médiane, d'autres projettent ipsi-latéralement. Ces axones vont guider les futurs axones ipsi-latéraux avant de dégénérer (**Figure 5**). Les CGR qui vont projeter ipsi-latéralement commencent à se différencier à E14,5, et expriment le facteur de transcription *Zic2*. Le nombre de CGR qui expriment Zic2 varie avec l'extension de la binocularité. Des études ont montré que ce facteur de transcription était nécéssaire et suffisant pour la spécification des CGR ipsi-latérales. Les souris n'exprimant pas Zic2 n'ont pas de projections ipsi-latérales dans le nerf optique (Herrera et al., 2003). Réciproquement, l'expression ectopique de Zic2 induit la présence d'un nombre aberrant de projections ipsi-latérales (García-Frigola et al., 2008). Zic2 induit l'expression à la membrane du récepteur tyrosine kinase EphB1 (**Figure 5**). EphB1 se lie à l'éphrine B2, exprimée par les cellules de la glie radiaire présentes au niveau de la ligne médiane et induit la répulsion des axones (Petros et al., 2009; Williams et al., 2003). L'expression ectopique *in utero* de EphB1

redirige la croissance des CGR, qui ne croisent plus la ligne médiane (Petros et al., 2009). Les axones contra-latéraux, eux, croisent la ligne médiane puisqu'ils n'expriment pas EphB1. Au contraire, ils expriment NrCAM, plexineA1 et sema6A ; qui sont aussi exprimés à la ligne médiane, comme *VEGF-A* (Erskine et al., 2011) et contribuent à la croissance des axones (**Figure 5**). Dès le nerf optique et tout au long du tractus optique, les axones ipsi- et contra-latéraux sont ségrégés, les axones ipsi-latéraux sont situés latéralement par rapport aux contra-latéraux (Sitko et al., 2017). Par ailleurs, la fasciculation des axones ipsi-latéraux augmente à mesure qu'ils avancent dans le tractus optique (Sitko et al., 2017).

1.4. Les cartes visuelles

Le CGLd et le CS sont les principales cibles primaires de la rétine. Chez la souris, les axones des CGR envoient une branche collatérale innervant le CGLd et poursuivent leur trajet pour aller innerver le CS (Dhande et al., 2011). Les neurones du CGLd contactent ensuite la couche IV du cortex visuel (V1). Le CGLd et le CS reçoivent des afférences de la rétine, mais également du cortex visuel (Dräger and Hubel, 1975). L'organisation précise des projections rétiniennes peut être observée à différents niveaux dans leurs cibles : elles dessinent (1) une carte rétinotopique dans laquelle la localisation relative des CGR est conservée (Huberman et al., 2008), (2) une spécificité laminaire dans laquelle différents sous-types de CGR projettent dans des couches différentes (Hong and Chen, 2011), (3) une carte œil-spécifique où les projections de chaque œil arborisent dans des régions différentes (Huberman et al., 2008). Cette organisation précise de la connectivité rétinienne est essentielle au traitement des informations visuelles par le cerveau.

La carte rétinotopique

Les CGR voisines dans la rétine contactent des cellules voisines dans leurs cibles. Dans ces cartes topographiques, les relations entre cellules adjacentes sont préservées dans les structures dans lesquelles projettent ces neurones (**Figure 6 ; gauche**). Dans le CGLd, l'axe

naso-temporal de la rétine projette sur l'axe ventro-latéral/dorso-médial. L'axe dorso-ventral de la rétine projette sur l'axe ventro-médial/dorso-latéral. Dans le CS, l'axe temporo-nasal de la rétine projette sur l'axe rostro-caudal du CS et l'axe dorso-ventral de la rétine projette sur l'axe latéro-médial du CS (Lund et al., 1974; Pfeiffenberger et al., 2006). Cette rétinotopie est également retrouvée à l'étape suivante des relais du système visuel, dans l'aire visuelle primaire du cortex (V1) (Kalatsky and Stryker, 2003).

Le traitement optimal de l'information visuelle requiert l'alignement des différentes cartes visuelles dans les cibles (Cang and Feldheim, 2013). Cela permet d'obtenir une transmission cohérente de l'information entre tous les noyaux du système visuel (Luo and Flanagan, 2007).

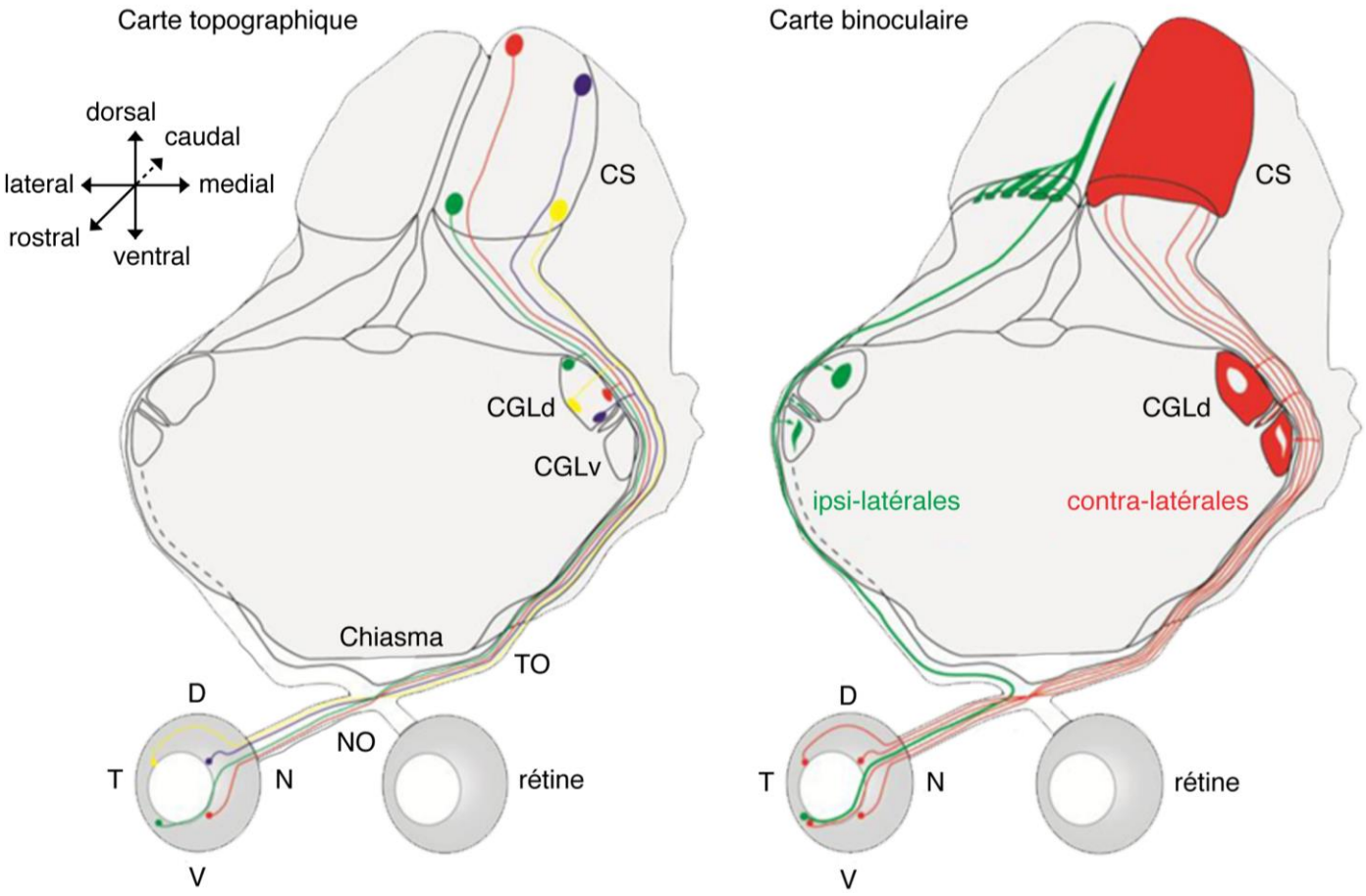


Figure 6 : Les cartes visuelles, topographiques (à droite) et œil-spécifique (à gauche). Les CGR voisines dans la rétine connectent des cellules voisines dans leurs cibles. Les CGR de la partie dorsale de la rétine (en bleu) projettent dans la partie ventrale du CGLd et la partie dorso-latérale du CS. Les CGR ventro-temporales connectent la partie dosale du CGLd et la partie ventro-médiale du CS.
Les projections contra-latérales et ipsi-latérales sont ségrégées dans le CGL et le CS. Les axones ipsi-latéraux (en rouge) sont regroupés en un amas au centre du CGLd, entouré par les axones contra-latéraux (en vert), qui sont exclus du territoire ipsi-latéral. Dans le CS, les axones ipsi-latéraux occupent la couche profonde, dans laquelle ils forment de petits amas. Les projections contra-latérales sont situées dans la couche superficielle.
CS, colliculus supérieur ; CGLd, corps genouillé latéral dorsal ; CGLv corps genouillé latéral ventral ; TO, tractus optique ; NO, nerf optique ; D, dorsal ; V, ventral ; T, temporal ; N, nasal (adapté de Assali *et al.*, 2014).

Les molécules de guidage pourraient encore une fois jouer un rôle dans l'alignement de ces cartes. L'expression ectopique d'éphrine A dans quelques CGR modifie le gradient d'éphrines dans la rétine et perturbe l'alignement des cartes rétino-colliculaire et cortico-colliculaire (Savier et al., 2017).

La lamination

Diverses lignées de souris transgéniques ont été identifiées récemment et permettent de marquer des sous-types différents de CGR, qui projettent vers des couches différentes du CS et du CGLd (Dhande and Huberman, 2014; Hong and Chen, 2011; Kim et al., 2010). Ainsi, il a été démontré que les CGR qui répondent spécifiquement au mouvement d'objets projettent vers les couches superficielles du CS, de la même manière que les ooDSGC et des J-CGR (Huberman et al., 2009; Kim et al., 2008). Enfin, les CGRα et les CGRip connectent la couche la plus profonde (**Figure 7**). Les différents sous-types de CGR forment ainsi une troisième carte dans l'épaisseur du CS, avec 4 *laminae* parallèles d'axones réparties entre le SGS supérieur et inférieur (Dhande and Huberman, 2014). Les dendrites des neurones colliculaires traversent toute l'épaisseur du CS (Mooney et al., 1985), ces neurones pourraient ainsi combiner les informations provenant de divers types de CGR.

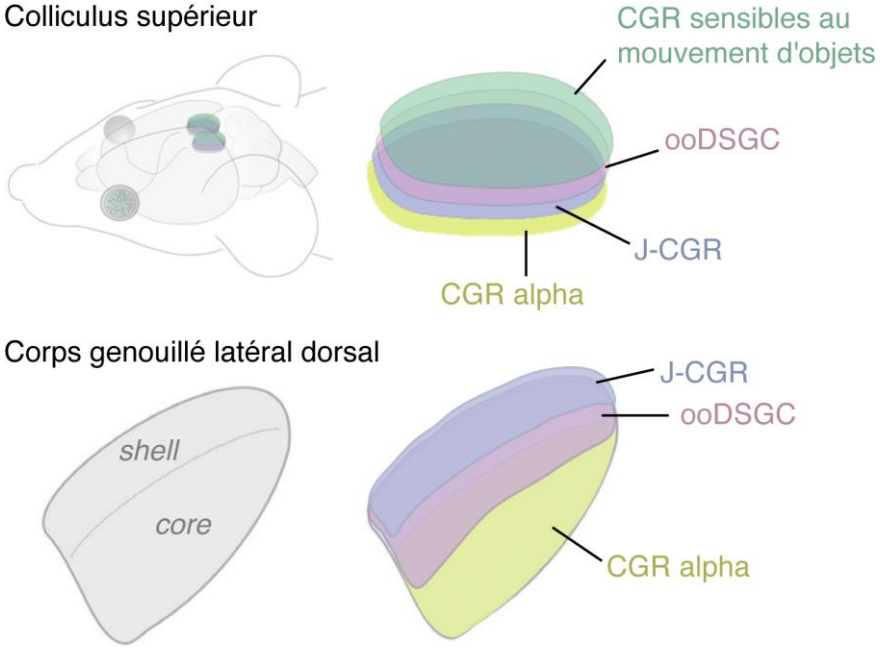


Figure 7 : La lamination des cibles visuelles. Les sous types de CGR projettent dans des couches différentes dans l'épaisseur du CS. Le CGLd est divisé en deux régions, la région profonde (*core*), et la région superficielle (*shell*). Les sous-types de CGR connectent préférentiellement l'une ou l'autre de ces régions.
ooDSGC, On-Off direction selective ganglion cell.

Le CGLd contient également au moins deux catégories de cartes laminaires (**Figure 7**). Les ooDSGC et les J-CGR arborisent dans la partie latérale (shell) du CGL, adjacent au tractus

optique (Huberman et al., 2009; Kim et al., 2008). Les CGRα, elles, connectent la partie plus profonde (core) du CGL (Huberman et al., 2009).

La carte oeil-spécifique

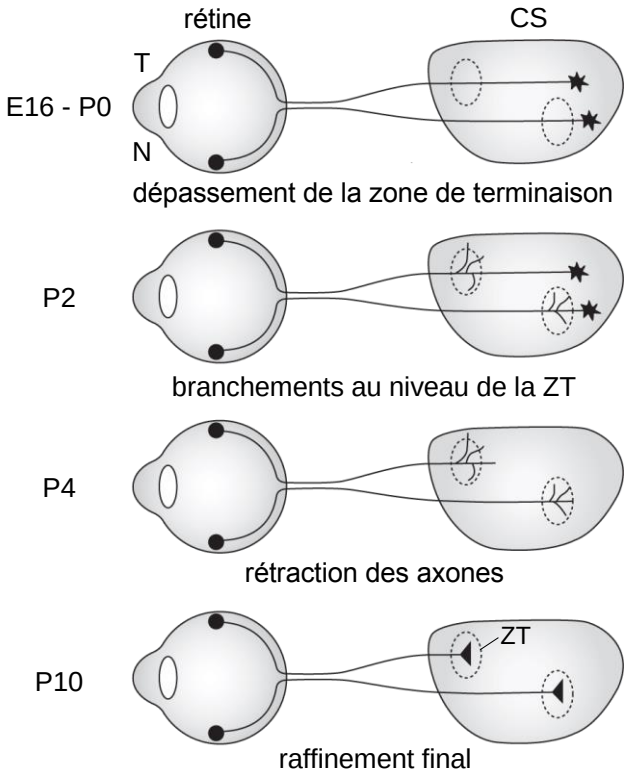
La carte œil-spécifique est essentielle à la vision binoculaire. Dans le thalamus, les axones ipsi-latéraux sont regroupés en un amas au centre du CGLd, entourés par les projections contra-latérales. Ces axones ipsi-latéraux, qui représentent 5% des CGR, occupent environ 10-12% de l'aire totale du CGLd et sont ségrégés : ils ne partagent que très peu (< 2%) voire aucun territoire avec ceux de l'œil opposé (**Figure 6**) (Guido, 2008). Dans le CS, les projections ipsi-latérales sont également organisées en amas dans la couche profonde ou stratum opticum (SO). Rostralement, ces amas sont multiples et localisés sur tout l'axe medio-latéral. Caudalement, seul le CS médial contient un amas d'axones ipsi-latéraux. Les axones contra-latéraux occupent toute la couche plus superficielle, le *stratum griseum superficiate* (SGS). Les projections issues de chaque œil occupent donc des couches différentes dans le CS. L'anatomie des territoires œil-spécifiques varie selon les espèces (Hickey, 1981; Huberman et al., 2003; Sherman and Spear, 1982) et en fonction de la proportion de CGR ipsi-latérales.

1.5. Développement de la carte rétinotopique

La rétinotopie a été étudiée plus en détail dans le CS que dans le CGLd (*e.g.* Cang and Feldheim, 2013). L'établissement de la rétinotopie suit plusieurs étapes dans le CS (**Figure 8**). Les cônes de croissance des axones rétiniens envahissent le CS en suivant une direction antéro-postérieure, et dépassent leur future zone de terminaison (ZT). Des branches se forment le long des axones, au niveau de la future ZT, puis les axones se rétractent pour former une arborisation dense et raffinée. Une dernière étape de raffinement à fine échelle de la

terminaison axonale a lieu entre P4 et P10 (Feldheim and O'Leary, 2010; Simon and O'Leary, 1992).

Des molécules de guidage répulsives, les éphrines, et leurs récepteurs tyrosines kinases Eph, sont exprimés dans tout le système visuel des vertébrés. Elles sont notamment exprimées en gradient dans la rétine ainsi que dans les cibles, CS et CGLd (Pfeiffenberger et al., 2005) (**Figure 8**). Les récepteurs EphA sont exprimés dans un gradient temporo-nasal dans la rétine par les CGR, les éphrines A dans un gradient postéro-antérieur dans le tractus optique et le CS. Les axones temporaux, exprimant fortement les recepteurs EphA, sont plus sensibles aux éphrines et donc exclus de la partie caudale du CS. La rétraction des axones rétiniens en réponse aux éphrines A dépend de l'activité électrique, mais est indépendante de la transmission synaptique des CGR (Nicol et al., 2007). Les éphrines B sont présentes en gradient médio-latéral (faible à forte expression) dans le CS (Hindges et al., 2002). La signalisation EphA/éphrine A établit donc la rétinotopie selon l'axe rostro-caudal, tandis que la signalisation EphB/éphrine B contrôle la topographie selon l'axe médio-latéral ; plus particulièrement la formation préférentielle de branches (*e.g.* Triplett and Feldheim, 2012).



Adapté de : Feldheim et al., 2010

Figure 8 : Développement de la carte rétinotopique dans le CS. Les axones rétiniens dépassent initialement leur zone de terminaison (ZT) dans le CS. A P2, des branches apparaissent à la future Z. Enfin, les axones se rétractent pour former une arborisation dense à la ZT.

La terminaison axonale, établie à la bonne ZT, est initialement large, puis s'affine pour devenir dense et précise (McLaughlin et al., 2003). Cette étape de raffinement des connexions rétinotopiques est concomitante avec la propagation de vagues d'activité calcique spontanée dans la rétine (**voir Introduction, section 2**) et est indépendante des molécules de guidage axonal. La délétion de ces molécules entraine la présence de ZT ectopiques, mais toutes denses et raffinées (Feldheim et al., 2004). En revanche, chez les souris donc l'activité rétinienne est abolie (β2nAChR-KO), les axones des CGR projettent à la localisation

rétinotopique correcte, mais forment des arborisations axonales anormalement larges et diffuses (Grubb et al., 2003; Pfeiffenberger et al., 2006).

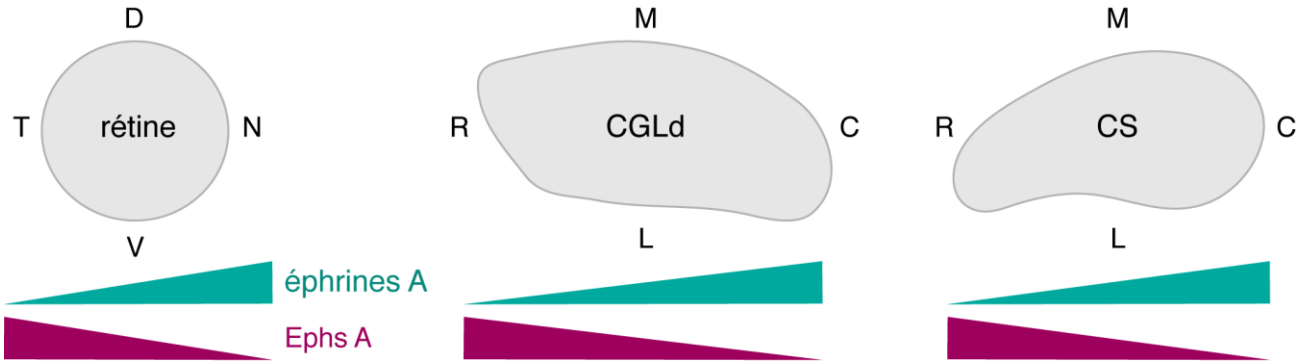


Figure 9 : Gradient d'éphrines et d'Ephs dans la rétine, le CGLd et le CS (d'après Pfeiffenberger, 2005)**.**

A la fin de la deuxième semaine post-natale, la rétinotopie est affinée à une très fine échelle. En effet, des enregistrements électrophysiologiques ont révélé qu'à P10, une cellule thalamique donnée reçoit des axones provenant d'entre 12 et 30 CGR et ayant une activité relativement faible. A P32, les cellules du CGLd sont connectées par seulement 1 à 3 afférences fortes (Jaubert-Miazza et al., 2005; Hooks and Chen, 2006). Des vagues d'activité glutamatergique, qui se propagent dans la rétine, sont impliquées dans cette étape finale de raffinement.

1.6. Développement de la lamination

Les rares études concernant le développement de la lamination ont été effectuées chez le poisson-zèbre, qui est un modèle communément utilisé pour l'étude du développement du système visuel. Chez le poisson-zèbre, les CGR projettent vers 4 couches différentes du tectum optique : le stratum opticum (SO), à la surface du tectum, et trois sous-couches du stratum firbosum griseum superficiale ($SFGS_B$, $SFGS_D$, $SFGS_F$). Chaque CGR contacte une seule sous-couche du tectum (Xiao et al., 2005). Les axones des CGR dont l'expression de Robo2 est altérée ne sont plus restreints à des sous-couches spécifiques mais sont retrouvés dans toute l'épaisseur du tectum. Slit1 est sécrété par les cellules tectales, et stabilisé dans la matrice extracellulaire (MEC) par la glie radaire (Xiao et al., 2011). La signalisation Slit/Robo instruit la lamination des CGR dans le tectum.

La délétion génétique de reelin, une protéine de la MEC, perturbe également la lamination des axones rétiniens dans le tectum du poisson-zèbre. Reelin est exprimée en gradient, avec des concentrations fortes dans la partie superficielle et faibles dans la partie profonde. La perturbation de ce gradient induit des défauts de lamination (Di Donato et al., 2018 .

Plusieurs protéines présentes dans la MEC sont donc essentielles au développement de la spécificité laminaire des CGR chez le poisson-zèbre. En revanche, la libération synaptique ne semble pas être impliquée (Nevin et al., 2008).

Chez la souris, certaines CGR projettent d'abord dans toute l'épaisseur du CS avant de se rétracter pour arboriser uniquement dans une sous-couche spécifique (Huberman et al., 2010).

1.7. Développement de la carte œil-spécifique

A P3-P4, les axones provenant de chaque œil sont surnuméraires et désordonnés. Les projections des deux yeux se chevauchent dans le CGLd (**Figure 10**). Des estimations de Guido *et al*. (2008) ont révélé qu'à P3, près de 60 % du CGLd était occupé par des projections

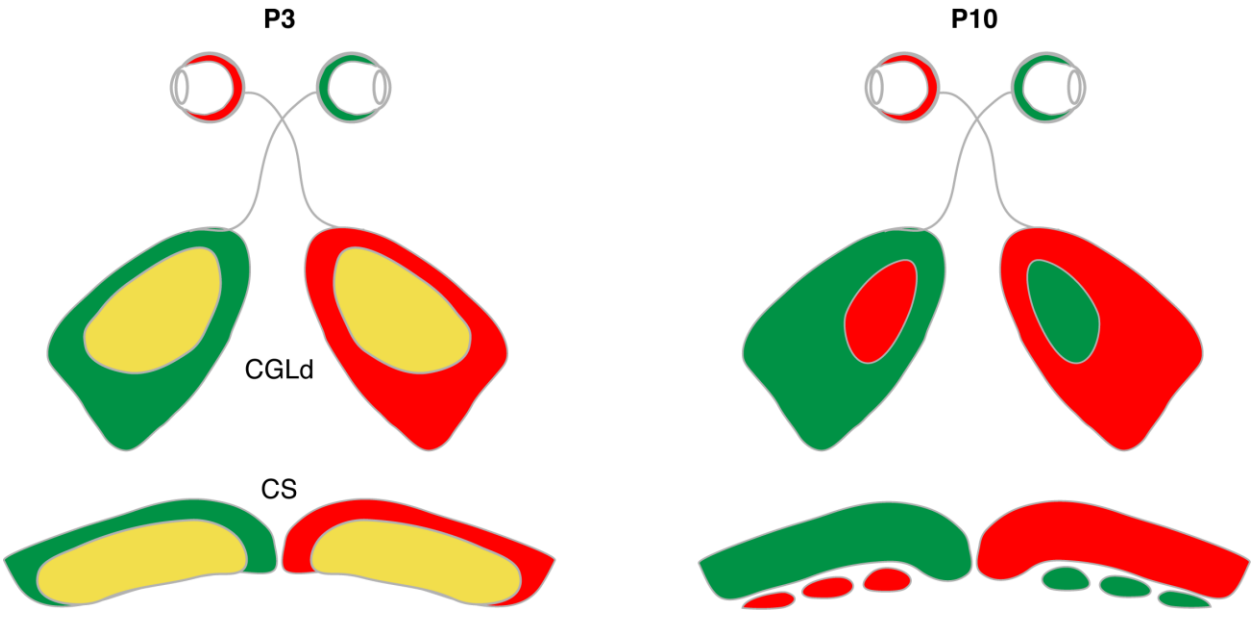


Figure 10 : Développement de la carte œil-spécifique. La carte binoculaire se développe progressivement. Les projections des deux se chevauchent à P3 (en orange), puis les connexions se raffinent pour former des territoires distincts à P10.

ipsi-latérales, qui se chevauchent à plus de 50 % avec les axones contra-latéraux. A P7, les axones ipsi-latéraux occupent toujours près de 25 % du CGLd. Puis, durant les deux premières semaines post-natales, les projections se raffinent, les axones contra-latéraux sont ainsi éliminés du territoire ipsi-latéral et réciproquement ; *via* des mécanismes compétitifs (Butts et al., 2007; Huberman et al., 2008).

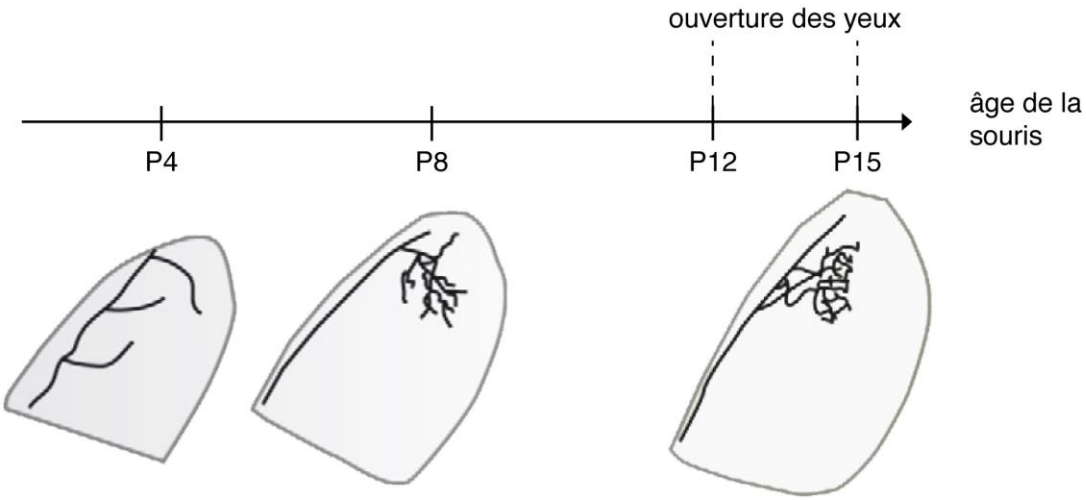


Figure 11 : Représentation des changements morphologiques des axones rétiniens dans le CGLd. (Hong & Chen, 2011).

A P10, les projections rétiniennes forment des territoires œil-spécifiques bien définis. A P8, des enregistrements électro-physiologiques ont montré qu'une cellule thalamique donnée reçoit encore des afférences provenant des deux yeux ; tandis qu'à P19, elle ne reçoit des afférences que d'un seul œil (Jaubert-Miazza et al., 2005). Les axones mal positionnés sont donc raffinés et éliminés du territoire correspondant aux projections de l'autre œil. Les synapses surnuméraires sont également éliminées. A P14, au moment de l'ouverture des yeux, les territoires sont bien ségrégés. Lors de cette ségrégation des projections de chaque œil, les axones montrent également des changements drastiques de morphologie. Au stade précoce où les projections atteignent à peine le CGLd (P3-4), les axones ne forment que peu de branches, qui sont localisées aléatoirement (Sretavan and Shatz, 1986). Progressivement, ces branches se rétractent et une arborisation axonale dense se forme à la localisation appropriée (**Figure 11**). Ces changements morphologiques sont accompagnés de modifications structurales des neurones post-synaptiques, impliquant l'extension et la rétraction de branches qui se stabilisent lorsque les synapses maturent (Hong and Chen, 2011).

De la même façon que dans le thalamus, les projections rétiniennes sont initialement mélangées dans le CS à P3-4. Puis, les axones ipsi-latéraux se rétractent pour arboriser

uniquement dans le SO (Godement et al., 1984; Wu et al., 2000). Les axones ipsi-latéraux se regroupent également en amas de plus en plus denses au cours des deux premières semaines post-natales.

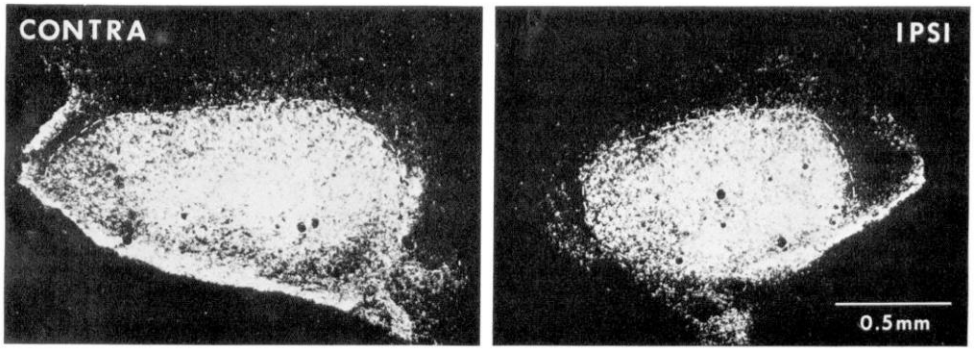


Figure 12 : Développement de la carte binoculaire chez le chat en l'absence d'interactions binoculaires. Autoradiographies montrant le CGLd d'un fœtus de chat après l'ablation d'un œil suivie d'une injection de traceur dans l'œil restant. Les deux CGLd sont recouverts par les projections provenant de l'œil restant (Sretavan & Shartz, 1986).

Les interactions compétitives inter-œil entre les axones des CGR sont indispensables pour la ségrégation des territoires œil-spécifiques. En effet, suite à l'ablation précoce d'un œil (chez le chat, la souris, le rat, ou le hamster - Fawcett et al., 1984; Godement et al., 1980; Sretavan and Shatz, 1986; Thompson and Holt, 1989), les axones des CGR de l'œil intact maintiennent leurs connexions dans l'ensemble du CGLd (**Figure 12**). Le blocage de l'activité spontanée dans la rétine altère également la compétition binoculaire qui sous-tend cette ségrégation œil-spécifique (Penn et al., 1998). Ainsi, l'œil le plus actif aura un territoire plus grand dans le CGLd.

2. Implication de l'activité rétinienne spontanée dans le développement des projections de la rétine

L'activité spontanée a été observée dans l'ensemble du système nerveux ; notamment la cochlée, le néocortex, le cervelet ou la rétine (Blankenship and Feller, 2009; Kirkby and Feller, 2013). Ce schéma général s'observe chez de nombreuses espèces animales, ce qui

suggère que cette activité spontanée est un composant essentiel de la maturation des circuits neuronaux. Elle est corrélée dans des cellules adjacentes, qui déchargent ainsi des potentiels d'action en même temps.

2.1. L'activité spontanée dans la rétine

La rétine présente une activité spontanée avant même l'ouverture des yeux. Cette activité a été révélée pour la première fois *in vivo* par des enregistrements électrophysiologiques de potentiels d'action dans les CGR d'embryons de rats (Galli and Maffei, 1988). Par la suite, elle a été mise en évidence chez de nombreuses espèces telles que le furet, la souris, la tortue ou encore le poisson-zèbre (Bansal et al., 2000; Feller et al., 1996; Marachlian et al., 2018; Sernagor et al., 2003).

Chez la souris, on distingue 3 périodes d'activité spontanée (Huberman et al., 2008) (**Figure 13**) :

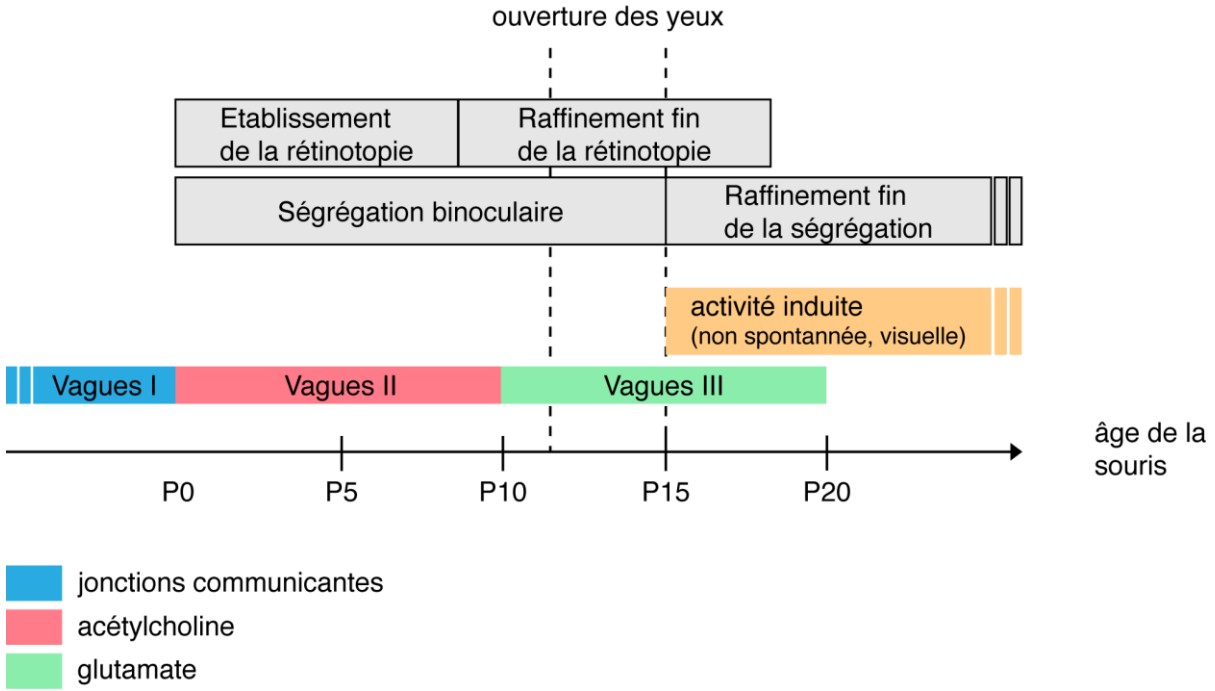


Figure 13: Phases d'activité rétinienne spontanée et étapes du développement des projections rétiniennes au cours du temps.

- Une première phase d'activité spontanée, durant la période embryonnaire a été mise en évidence chez le rongeur (Bansal et al., 2000; Syed et al., 2004). Ces vagues - plus rapides que les vagues de type 2 - se propagent à la fréquence d'environ 1 toutes les 90-120 secondes (Huberman et al., 2009). La période réfractaire des CGR observée dans les autres phases d'activité spontanée est absente (Syed et al., 2004). Elles impliquent un petit nombre de CGR (Bansal et al., 2000). Elles sont médiées par des jonctions communicantes entre les CGR et sont réduites lors de l'activation des récepteurs $GABA_B$ (Syed et al., 2004).

- Une seconde phase, de P0 à P10-P11, avec des vagues d'activité calcique spontanée régulées par l'acétylcholine (ACh) (Bansal et al., 2000; Feller et al., 1996). Elles sont initiées aléatoirement par une sous-population de cellules amacrines, les cellules amacrines étoilées, qui libèrent spontanément de l'ACh. Elles dépolarisent ainsi les cellules amacrines et ganglionnaires voisines qui expriment les récepteurs à l'ACh (nAChR). La transition entre les phases I et II dépend de la signalisation cholinergique (Blankenship and Feller, 2009).

- Une troisième phase d'activité spontanée glutamatergique, de P10 à P20 (Bansal et al., 2000). La transition entre les phases II et III dépend de la signalisation cholinergique (Bansal et al., 2000) et arrive au moment où les axones des cellules bipolaires commencent à établir des synapses avec les CGR. Elle dépend également de la signalisation glutamatergique, du récepteur ionotropique au glutamate VGLUT1, exprimé par les cellules bipolaires (Blankenship et al., 2009). Les vagues de type III sont initiées par les cellules bipolaires qui libèrent du glutamate et dépolarisent les CGR qu'elles connectent (Bansal et al., 2000; Wong et al., 2000). Leur fréquence est beaucoup moins élevée que celle des vagues de type II : une toutes les 4 minutes (Syed et al., 2004). L'utilisation d'antagonistes des récepteurs $GABA_{A/C}$ augmente l'amplitude, la fréquence et la vitesse des vagues de type III (Sernagor et al., 2003; Syed et al., 2004). Ces vagues sont restreintes à de petits groupes de CGR et se propagent à une vitesse très variable (en moyenne 200 $\mu m \cdot s^{-1}$) (Blankenship and Feller, 2009). Leur fréquence et leur taille diminuent avec la maturation de la rétine. Elles disparaissent au moment de l'ouverture des yeux, lorsque les CGR commencent à répondre à un stimulus lumineux (Masland, 1977).

2.2. Les vagues cholinergiques durant la seconde phase d'activité spontanée

Chez la souris, les vagues d'activité calcique spontanée ont été observées *in vitro* et *in vivo* à l'aide de techniques d'imagerie diverses telles que l'imagerie calcique, l'électrophysiologie ou la technique de patch-clamp (*e.g.* : Torborg and Feller, 2005) (**Figure 14**). Elles sont initiées environ toutes les 1 à 2 minutes et s'étendent sur une surface supérieure à 1 mm^2 dans la rétine, à une vitesse de 100-300 $\mu m \cdot s^{-1}$ (Bansal et al., 2000). Lors de la

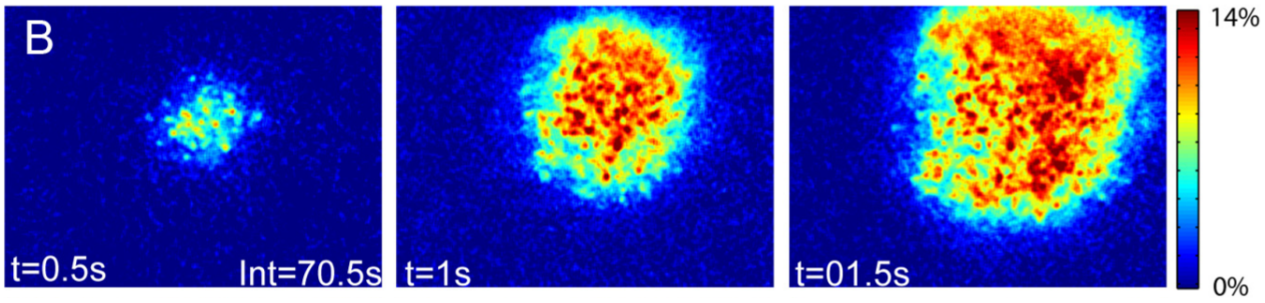


Figure 14: Exemple de propagation de vague calcique rétinienne spontanée (Ford et al., 2012).

propagation d'une vague, une CGR décharge des potentiels d'action pendant environ 3 secondes, à une fréquence de 10 Hz (Kirkby and Feller, 2013). Elles sont suivies d'une période réfractaire durant laquelle les CGR ne peuvent plus répondre à un stimulus (Feller et al., 1996). Chaque vague se propage sur de larges régions de la rétine, les activités électriques des groupes de CGR voisines de moins de 300 µm sont ainsi hautement corrélées (Feller et al., 1996; Meister et al., 1991; Wong, 1995). Des CGR adjacentes émettent ainsi des trains de potentiels d'action simultanément (**Figure 15**). La localisation de l'initiation des vagues n'est pas totalement aléatoire, puisqu'elles semblent s'initier préférentiellement dans la partie VT de la rétine, qui correspond à la région binoculaire, et se propager majoritairement vers la partie dorso-nasale (Ackman et al., 2012).

Les premières expériences de blocage de l'activité rétinienne ont été réalisées avec de la tétrodotoxine (TTX), un bloqueur des canaux sodiques voltage-dépendants, empêchant ainsi la formation de potentiels d'action. Cependant, la toxicité connue de la TTX et les résultats parfois contradictoires des études concernant la ségrégation œil-spécifique dans le CGLd et le CS (Cook et al., 1999; Fawcett et al., 1984) ont nécessité la création de modèles plus ciblés. Ainsi, deux modèles majeurs ont été utilisés par la suite pour étudier la propagation des vagues

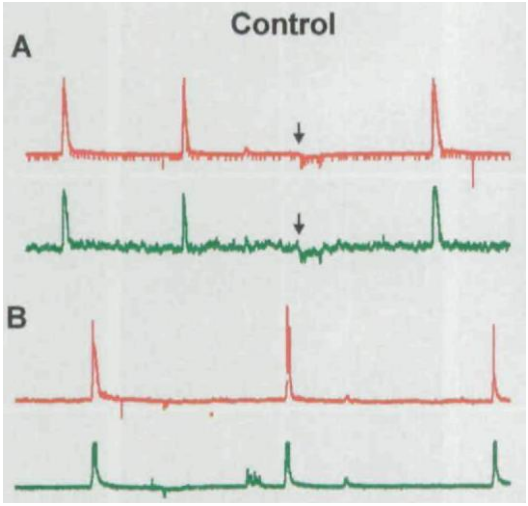


Figure 15 : Activité rétinienne spontanée de CGR adjacentes (Huberman et al., 2003). Exemples d'activité corrélée de deux paires (A et B) de CGR adjacentes (vertes et rouges, distance inter-soma < 25 µm). Les enregistrements électro-physiologiques de CGR adjacentes montrent des potentiels d'actions, ainsi que des hyperpolarisations (indiquées par les flèches), hautement corrélés.

de type II : la délétion génétique de la sous-unité β2 du récepteur à l'acétylcholine (β2nAChR) (Muir-Robinson et al., 2002; Rossi et al., 2001) ou l'injection intraoculaire d'épibatidine, un bloqueur des récepteurs cholinergiques (Feller et al., 1996). Ces modèles présentent une activité rétinienne résiduelle. Chez les souris β2nAChR-KO, les vagues de type I et III ne sont pas affectées, ce qui en fait un excellent modèle pour étudier le rôle des vagues cholinergiques. Les vagues calciques dépendantes de l'ACh sont remplacées par des vagues qui se propagent grâce aux jonctions communicantes. Ces vagues corrèlent l'activité de CGR voisines mais avec des propriétés spatiotemporelles différentes de celles des vagues cholinergiques (Kirkby et al., 2013). Les rétines traitées à l'épibatidine ont 50 % de leurs CGR inactives, les autres ont une activité plus importante et aléatoire (Cang et al., 2005; Sun et al., 2008).

Ces vagues entraînent des oscillations des niveaux d'AMPc et de protéine kinase A (PKA) (Dunn et al., 2006). Inversement, l'AMPc et le calcium (Ca^{2+}) peuvent moduler les vagues calciques. L'augmentation des niveaux d'AMPc par application locale d'agoniste augmente la vitesse, la taille et la fréquence des vagues (Stellwagen et al., 1999). La signalisation AMPc est décrite plus en détail dans le Chapitre 4.

2.3. Rôle des cellules amacrines dans la propagation des vagues cholinergiques

Les cellules amacrines étoilées (SAC, starburst amacrine cells), directement connectées aux CGR, sont la source de la libération d'acétylcholine à l'origine des oscillations calciques spontanées dans les CGR (Feller et al., 1996) . L'activité de CGR voisines n'est plus corrélée suite à l'ablation des SAC chez le furet (Huberman et al., 2003). L'application de TTX dans la

rétine a montré que cette libération d'acétylcholine était indépendante des canaux sodiques, contrairement à la libération de potentiels d'action dans les CGR (Stellwagen et al., 1999). La délétion progressive de β2nAChR spécifiquement dans les SAC (grâce à la technique de recombinaison homologue Cre/LoxP) perturbe la propagation des vagues calciques de type II dans la rétine, en réduisant la corrélation entre CGR voisines et la distance de propagation de ces vagues (Xu et al., 2016). Les auteurs ont ainsi montré que l'excitation mutuelle des cellules amacrines étoilées était indispensable à la propagation des vagues calciques et à la ségrégation œil-spécifique.

Il a également été décrit récemment que la signalisation AMPc spécifiquement dans les SAC régule la propagation des vagues calciques (Hsiao et al., 2019).

Les vagues calciques cholinergiques ont été extensivement décrites dans la littérature, grâce à des modèles expérimentaux et computationnels (*e.g*. Assali et al., 2014). En revanche, le rôle des cellules amacrines étoilées dans la propagation de ces vagues n'est que partiellement élucidé. Les modèles n'ont jusqu'ici pas permis de comprendre comment les paramètres biologiques, comme des variations de la conductance membranaire, impactent l'activité des SAC. Ces variations de conductance membranaires sont dues à des variations des canaux ioniques membranaires. Un modèle récemment publié propose un mécanisme plausible pour la génération de l'activité des SAC (Matzakos-Karvouniari et al., 2019) . Dans ce modèle, les paramètres essentiels contrôlant les décharges répétées des SAC sont des canaux calciques voltage-dépendants ; les phases de quiescence sont régulées par des canaux potassium calcium-dependants. Leur modèle reproduit les caractéristiques des SAC : des périodes d'activité oscillatoire forte suivies de périodes réfractaires.

2.4. Rôle des vagues calciques cholinergiques dans le développement des projections rétiniennes

Les vagues d'activité calcique spontanée se propagent dans la rétine en développement de la fin de la période embryonnaire jusqu'à la deuxième semaine post-natale et sont essentielles à la mise en place de la carte œil-spécifique (Burbridge et al., 2014; Penn et al., 1998).

Chez les souris β2nAChR-KO, les CGR ont une activité spontanée aléatoire et on observe des défauts majeurs tant au niveau rétinotopique que de la ségrégation binoculaire (Huberman et al., 2008; Rossi et al., 2001) (**Figure 16**). Les projections contra-latérales occupent tout le CGLd, y compris le territoire ipsi-latéral et des projections ipsi-latérales ectopiques sont présentes dans le territoire contra-latéral (Rossi et al., 2001; Xu et al., 2011). Dans le CS des souris β2nAChR-KO, des axones ipsi-latéraux ectopiques sont également retrouvés dans le SGS, normalement occupé uniquement par des projections contra-latérales (Xu et al., 2011). La ségrégation binoculaire est toutefois conservée à l'âge adulte (P28) dans le CGLd, bien que la position du territoire ipsi-latéral soit fortement perturbée. En revanche, la localisation des projections ipsi- et contra-latérales est altérée et les axones ipsi-latéraux forment plusieurs amas dans le CGLd (Muir-Robinson et al., 2002). Ces résultats suggèrent que la ségrégation est retardée et non complètement abolie. Il a été montré que la maturation des synapses est ralentie dans le CGLd de ces animaux (Stacy et al., 2005). Cependant, à l'âge adulte une cellule thalamique reçoit autant d'afférence chez les souris β2nAChR-KO que chez les contrôles (Grubb et al., 2003; Huberman et al., 2002). A P15, l'électroporation *in vivo* de neurones individuels a montré que les axones des souris β2nAChR-KO étaient correctement ramifiés, mais plus larges que les axones contrôles (Dhande et al., 2011). Les défauts de carte binoculaire observés dans le CGLd ne dépendent donc pas de la phase de guidage axonal et du positionnement à la bonne ZT, mais de la phase de raffinement des projections.

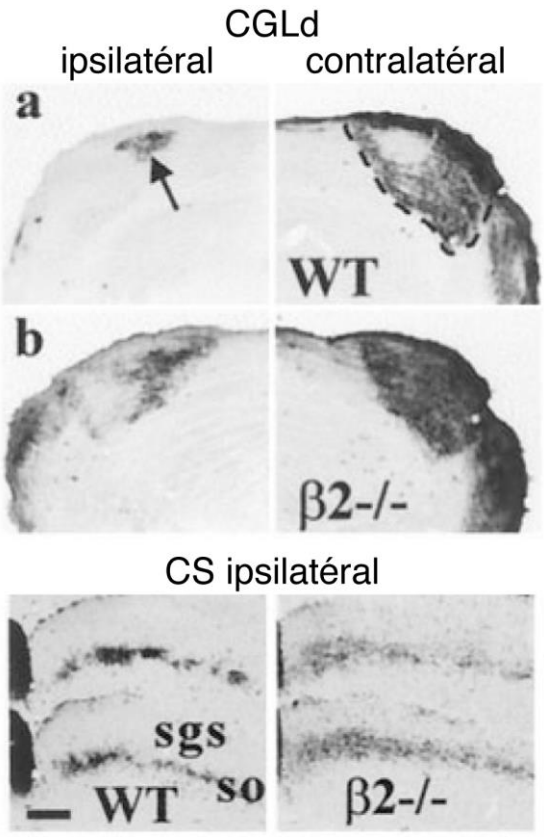


Figure 16: Organisation des projections rétiniennes dans le CGLd et le CS des souris β2nAChR-KO à P28. Dans le CGLd, le territoire ipsi-latéral est diffus et plus large chez les souris β2nAChR-KO (β2-/-) que chez les contrôles (WT). Dans le CS, les projections ipsil-latérales sont également plus diffuses, et ne forment pas les amas caractéristiques des animaux contrôles (Rossi et al., 2001).

Ces données démontrent l'importance de l'activité corrélée dans les CGR pour la ségrégation œil-spécifique ; en revanche, certaines données *in vivo* semblent accorder une importance moindre à cette activité au cours de la phase de guidage des

axones vers la cible appropriée. Ainsi, le blocage de l'activité rétinienne par l'expression ectopique de canaux potassiques Kir 2.1 qui hyperpolarisent les cellules (Benjumeda et al., 2013) n'entraine pas de défauts de topographie dans le CS, puisque les axones sont positionnés à la bonne ZT. En revanche, la densité d'axones est réduite suggérant que l'activité des CGR est nécessaire au maintien de ces projections rétiniennes. L'activité individuelle des cellules participe néanmoins à la réponse aux molécules de guidage pour la mise en place de la topographie, comme expliqué au paragraphe concernant le guidage des axones rétiniens par les éphrines (Nicol et al., 2007).

Le rôle de l'activité dans la formation des cartes visuelles est largement établi. En revanche, il reste encore à déterminer si cette activité est "permissive", c'est-à-dire que la seule présence suffit ; ou bien "instructive", c'est-à-dire que les caractéristiques spatio-temporales de cette activité sont nécessaires pour le développement des projections. Chez les souris β2(TG), la réinsertion du transgène β2nAChR spécifiquement dans les CGR de souris β2nAChR-KO induit la présence de vagues de taille réduite. Les défauts de rétinotopie observés chez les animaux β2nAChR-KO ne sont pas présents chez les souris β2(TG) ; en revanche, la ségrégation binoculaire est affectée de la même manière (Xu et al., 2011). Ces résultats suggèrent que l'activité à elle-seule n'est pas suffisante pour la ségrégation des territoires œil-spécifiques, en accord avec un rôle "instructif" de l'activité rétinienne.

Il a été montré que l'activité relative entre chacun des yeux, plutôt que leur activité absolue, gouverne la proportion de CGLd recouverte par les projections de chaque œil (Stellwagen and Shatz, 2002). L'inhibition monoculaire de l'activité spontanée par injection d'épibatidine, un agent pharmacologique antagoniste des récepteurs cholinergiques (Wong, 1995) ; ou l'augmentation de cette activité par injection monoculaire de forskoline, un activateur des adénylate cyclases transmembranaires, principales enzymes de synthèse de l'AMPc (Stellwagen and Shatz, 2002) ; entraînent une expansion dans le CGLd du territoire de l'œil le plus actif. En revanche, l'inhibition binoculaire de l'activité rétinienne affecte la ségrégation des territoires sans modifier leur taille (Penn et al., 1998). Ces résultats suggèrent l'existence de mécanismes différents impliqués dans la régulation de la taille et de la ségrégation des territoires œil-spécifiques. Grâce à la technique de l'optogénétique, une étude a récemment montré que la stimulation synchrone des deux yeux à P9 (dont l'activité est asynchrone dans

les conditions contrôles) perturbe la formation de la carte binoculaire, tant dans le CS que dans le CGLd. Dans ces souris, des projections ipsi-latérales sont retrouvées dans tout le SGS, dont elles sont normalement exclues à la fin de la période de raffinement des connexions. Dans le CGLd, la taille du territoire ipsi-latéral et la proportion de recouvrement entre les projections des deux yeux sont également augmentées (Zhang et al., 2012). La stimulation synchrone des deux rétines à P14 n'induit en revanche aucun défaut de ségrégation, démontrant l'existence d'une période critique avant l'ouverture des yeux. Réciproquement, la stimulation asynchrone des deux rétines provoque un accroissement de cette ségrégation binoculaire dans le CS. De façon intéressante, cet effet n'est pas observé dans le CGLd, suggérant l'implication de mécanismes différents dans le thalamus et le colliculus.

Enfin, les vagues rétiniennes spontanées induisent des oscillations correspondantes dans les neurones post-synaptiques du CGLd et du CS. La stimulation *in vitro* du tractus optique sur des tranches de CGLd entraîne ainsi une réponse des cellules thalamiques (Mooney et al., 1996) et colliculaires (Shah and Crair, 2008). L'imagerie calcique de neurones colliculaires et corticaux chez des souris éveillées a montré que des vagues d'activité calcique se propageaient dans le CS et V1, avec les mêmes propriétés spatio-temporelles que celles observées chez les CGR dans la rétine (Ackman et al., 2012).

3. Compétition

Le modèle actuel de développement des cartes sensorielles suggère que l'activité des CGR dans la rétine et la compétition entre les projections de chacun des yeux (inter-œil) sont responsables du raffinement de la carte binoculaire. Les mécanismes compétitifs de raffinement de connexions exubérantes dans le système nerveux immature ont été décrits en détail, en particulier dans le système visuel.

3.1. Compétition entre axones

La connectivité visuelle est façonnée par la combinaison de deux procédés développementaux récurrents dans le système nerveux : (1) la formation de synapses et d'arborisations axonales, et (2) le renforcement de certaines connexions et l'élimination de synapses et d'arborisations exubérantes (Campbell and Shatz, 1992; Hong and Chen, 2011; Sretavan and Shatz, 1986). La plupart des systèmes, y compris le système visuel, chaque neurone reçoit de nombreuses afférences provenant de neurones situés dans diverses régions du système nerveux central (SNC). Ces synapses sont initialement désordonnées, puis les connexions dans lesquelles l'activité des deux partenaires pré- et post-synaptiques sont corrélées sont renforcées et consolidées, à l'inverse de celles dans lesquelles l'activité des deux neurones n'est pas corrélée (Butts, 2002; Debski and Cline, 2002). Ce principe a été énoncé par Donald Hebb en 1949 : "*Cells that fire together, wire together*" (**Figure 17**) et ce raffinement de connexions permet l'obtention d'un assemblage complexe et organisé de neurones finement interconnectés. Cette combinaison d'addition puis élimination de synapses facilite une adaptation à l'environnement *via* des procédés dépendants de l'activité neuronale. Des progrès considérables ont conduit à la mise en évidence des signaux intrinsèques et extrinsèques qui contribuent à éliminer ces prolongements neuronaux mal positionnés (Goodman and Shatz, 1992). Des mécanismes compétitifs, dépendants de l'activité des neurones, contribuent au raffinement des arborisations axonales exubérantes dans de nombreux systèmes (e.g.

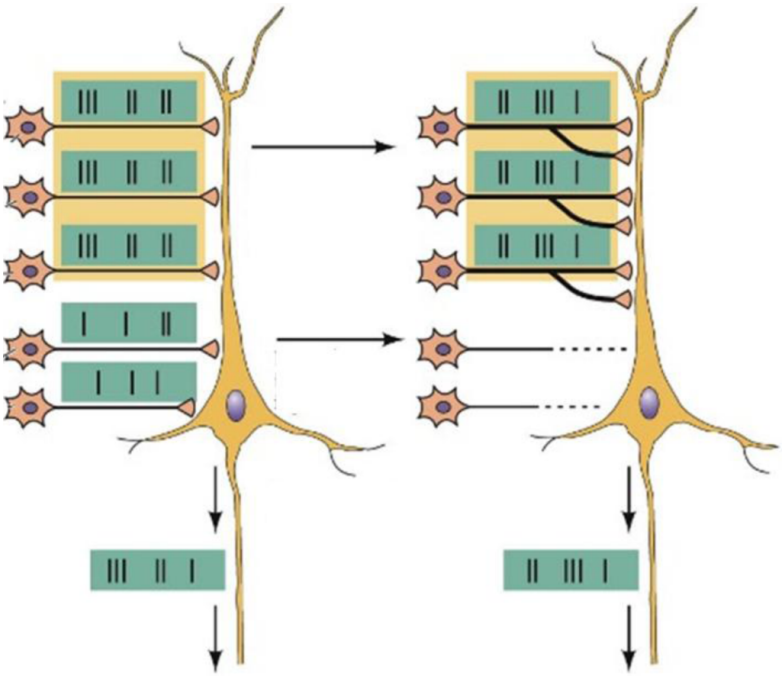


Figure 17: Sélection des synapses selon le concept de compétition de Hebb. Lorsque des neurones pré-synaptiques ont une activité corrélée à celle de leurs partenaires post-synaptiques, leurs connexions sont renforcées (neurones du haut). Les neurones pré-synaptiques coopèrent pour induire une activité corrélée dans le partenaire post-synaptique. Les connexions dont l'activité n'est pas corrélée sont éliminées (neurones du bas) (adapté de Purves *et al*., 2004).

Madison et al., 1991). Cette compétition entre axones dépend de mécanismes de potentialisation à long terme (LTP) et de dépression à long terme (LTD) de la transmission synaptique.

Des axones faisant partie d'une même afférence, qui connectent le même neurone post-synaptique, peuvent induire une LTP si leur activité est corrélée, c'est-à-dire s'ils présentent le même profil temporel d'activité (**Figure 17**). Grâce à la sommation spatiale de leurs potentiels d'action corrélés, ils peuvent induire une décharge électrique par le neurone post-synaptique (Wigström and Gustafsson, 1985). Dans ce contexte, si l'activité d'un neurone n'est pas corrélée à celle des autres, la connexion qu'il établit avec le neurone post-synaptique sera soumise à une LTD, puis (Dudek and Bear, 1992; Stanton and Sejnowski, 1989; Ziburkus et al., 2009).

Le développement des synapses du système visuel dépend également de la plasticité synaptique décrite par Hebb. La plasticité synaptique en fonction du temps d'occurrence des impulsions électriques (spike-timing-dependent plasticity, STDP) permet une modification de l'efficacité des synapses. Lorsqu'une afférence est active quelques instant avant le neurone post-synaptique, leur connexion est potentialisée ; tandis que lorsque le neurone pré-synaptique est actif après sa cible, la connexion est soumise à une LTD (Markram et al., 1997). Chez le xénope, l'activation répétée des CGR 20 ms avant la réponse du neurone tectal potentialise la synapse rétino-tectale (Zhang et al., 1998). Les vagues d'activité rétinienne spontanées, qui synchronisent l'activité de CGR adjacentes mais se propagent de façon asynchrone entre les deux yeux, illustrent parfaitement ce concept de plasticité synaptique de Hebb. Elles sous-tendent directement la sélection des synapses requise pour le raffinement de la connectivité visuelle (Butts et al., 2007). Une équipe a reproduit *in vitro* l'effet des vagues calciques sur l'activité des CGR. Lorsque les CGR sont activées exactement en même temps que les neurones thalamiques, la transmission synaptique est durablement augmentée. Réciproquement, lorsque les activités pré- et post-synaptiques sont décalées de plus de 1 seconde, l'efficacité synaptique est modérément réduite (Butts et al., 2007). Grâce à une co-culture *in vitro* d'un explant de rétine mis face à un CGLd, il a été démontré que les mécanismes de LTP/LTD sont impliqués dans le développement des projections rétiniennes. La stimulation à haute fréquence du tractus optique pendant les deux premières semaines post-natales, avant

l'ouverture des yeux, induit une dépression immédiate et à long-terme. En revanche, entre P16 et P30, lorsque les connexions sont déjà établies mais sont soumises à un raffinement fin, la même stimulation potentialise la synapse (Ziburkus et al., 2009). Ces deux phénomènes de LTD et LTP sont abolis en présence d'antagonistes des canaux calciques de type L ; mais seule la LTP dépend de la signalisation des récepteurs GABA et NMDA. Le rôle des canaux calciques de type L dans la plasticité synaptique est bien établi et a été démontré dans le colliculus supérieur (Lo and Mize, 2000; Mize and Salt, 2004).

3.2. Importance de l'activité corrélée de cellules voisines dans la compétition entre axones

Les données de la littérature laissaient penser jusqu'ici que cette compétition entre axones dépendait principalement de mécanismes de stabilisation synaptique reposant sur les deux partenaires pré- et post-synaptiques. Des résultats récents suggèrent cependant que les axones pourraient coopérer et co-stabiliser leurs connexions avec les cellules adjacentes (Munz et al., 2014; Winnubst et al., 2015). Ainsi, la plupart des modèles de développement des circuits neuronaux, dépendants de l'activité, présument que l'activité corrélée des afférences reçues par le neurone post-synaptique renforce les synapses entre les neurones co-actifs. Le premier modèle suggérant l'importance de l'activité corrélée de cellules voisines est la souris transgénique β2nAChR-KO. Certaines CGR exhibent une activité calcique spontanée résiduelle et ainsi les vagues cholinergiques sont tronquées (Muir-Robinson et al., 2002; Rossi et al., 2001). L'activité des CGR voisines est donc moins corrélée et des défauts sont observés dans la formation des cartes visuelles. Cependant, ce modèle ne permet pas de différencier le rôle intrinsèque de l'activité de celui de la synchronisation de l'activité de cellules voisines. Les souris β2(TG), chez lesquelles l'activité des CGR est présente mais n'est plus corrélée entre cellules voisines, présentent également des défauts de projections (Xu et al., 2011).

Diverses études ont récemment montré l'importance de l'activité synchrone de cellules voisines dans le développement et le maintien des cartes visuelles. La première observation de neurones voisins co-actifs a été effectuée chez le xénope. Suite à la stimulation répétée

synchrone de deux CGR convergeant sur le même neurone post-synaptique, les courants post-synaptiques observés au niveau des deux afférences sont augmentés (Zhang et al., 1998). Par la suite, une technique originale de photo-activation a été utilisée chez le xénope pour contrôler la synchronisation des CGR voisines. La stimulation asynchrone des cellules voisines a été effectuée grâce à l'utilisation de billes mobiles ; tandis que la stimulation synchrone est réalisée à l'aide d'une illumination stroboscopique. La stimulation asynchrone provoque un accroissement de la taille des arborisations ipsi-latérales dans le tectum (équivalent du CS chez le xénope). Par ailleurs, les branches axonales des CGR sont plus dynamiques dans l'exploration de l'environnement lorsque leur décharge n'est pas corrélée à celle des axones voisins (Munz et al., 2014). La co-activation d'un axone avec ses voisins diminue cette activité exploratoire et stabilise les synapses rétino-tectales. Cette stabilisation synaptique est altérée lorsque la transmission synaptique rétino-tectale est inhibée ou suite au blocage des récepteurs synaptiques NMDA (N-methyl-D-aspartate, NMDA-R). Une seconde étude, dans le cortex visuel de la souris, a mis en évidence une règle simple de plasticité synaptique. Grâce à l'imagerie calcique et l'électrophysiologie dans le neurone post-synaptique, les chercheurs ont démontré que les boutons synaptiques qui ne sont pas actifs en même temps que leurs voisins (d'une distance inférieure à 12 µm) sont soumis à une LTD. Réciproquement, l'augmentation locale (< 12 µm) de la synchronisation de l'activité stabilise la transmission synaptique (Winnubst et al., 2015). Ainsi, les synapses co-actives sont regroupées géographiquement lors de la propagation des vagues rétiniennes. Enfin, il a été montré également chez la souris que l'activité à haute fréquence et synchrone entre les cellules voisines est impliquée dans la ségrégation des projections rétino-géniculées (Torborg and Feller, 2004). L'activité corrélée de cellules voisines pourrait donc stabiliser les synapses rétino-thalamiques et rétino-colliculaires.

3.3. Stabilisation synaptique dans les cibles visuelles intermédiaires

A un stade précoce du développement (P7-9), les CGR établissent des contacts sur près de la moitié de la surface des cellules thalamiques ou colliculaires (Guido, 2008). Ces contacts sont nombreux, très étendus et situés sur les somas et les dendrites des neurones. Des enregistrements électrophysiologiques à P7-8 ont montré que la plupart des réponses

synaptiques dans le CGLd étaient des potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) : des dépolarisations membranaires fortes et longues (**Figure 18**). L'activité inhibitrice n'a été détectée dans les neurones post-synaptiques qu'à partir de P14, où, comme à l'âge adulte, les réponses synaptiques dans le CGLd étaient constituées de PPSE suivis de potentiels post-synaptiques inhibiteurs (PPSI, hyperpolarisation membranaire) (Bickford et al., 2010). Les synapses inhibitrices du CGLd sont principalement celles établies par les interneurones, avec des vésicules synaptiques ovales et plates, caractéristiques des synapses GABAergiques inhibitrices (Sherman and Guillery, 2002). La distribution de ces interneurones est relativement homogène dans le CGLd (Hammer et al., 2014) et ils sont en contact avec des branches collatérales des axones rétiniens (Bickford et al., 2010). Il a été récemment montré que l'absence de signaux rétiniens perturbe le développement de ces interneurones, tant dans leur morphologie que dans leur distribution (Charalambakis et al., 2019).

Les synapses excitatrices présentes dans le CGLd sont facilement identifiables, avec de grosses vésicules synaptiques arrondies. Elles sont de deux types : celles dont l'activité dépend des transporteurs au glutamate de type 1, VGLUT1 ; ou de type 2, VGLUT2. Les synapses VGLUT1 sont principalement celles provenant des axones corticaux, colliculaires ou encore d'autres noyaux du système visuel. La transmission rétino-géniculée est modulée par ces afférences non rétiniennes, qui représentent près de 95 % des terminaisons axonales du CGLd (Sherman and Guillery, 2002). Les synapses rétino-thalamiques représentent la grande majorité des synapses dépendantes de VGLUT2 mises en évidence dans le CGLd (Hammer et al., 2014; Land et al., 2004) et leur taille double entre P5 et P14 (Hammer et al., 2014). Les terminaisons rétino-géniculées sont morphologiquement différentes des autres terminaisons glutamatergiques : elles sont exceptionnellement larges, avec de grosses vésicules synaptiques rondes et des mitochondries pâles.

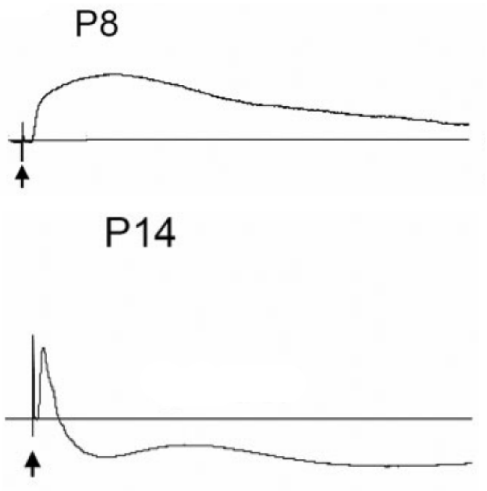


Figure 18: Réponses post-synaptiques dans le CGLd évoquées par la stimulation du nerf optique. Entre P7 et P11, les réponses sont purement excitatrices, comme le montre l'enregistrement de PPSE à P8, avec une dépolarisation membranaire forte et soutenue. L'enregistrement à P14 montre un PPSE suivi d'un PPSI, avec une longue hyperpolarisation membranaire. La flèche représente le début de la stimulation du nerf optique. (Bickford, 2010).

Initialement, comme dans la plupart des synapses immatures du SNC, la transmission synaptique excitatrice glutamatergique est de faible intensité et est effectuée par les récepteurs NMDA. Dans les synapses plus matures, la transmission se fait grâce aux récepteurs AMPA (spécifiquement activés par le amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate, AMPA-R) et l'amplitude de la réponse augmente (Constantine-Paton and Cline, 1998). L'induction d'une LTP à des synapses "silencieuses" provoque une apparition de courants post-synaptiques excitateurs, dépendants de l'expression de AMPA-R (Isaac et al., 1995). Par la suite, de nombreuses études ont permis de clarifier le rôle des récepteurs AMPA dans la stabilisation synaptique (*e.g*. Collingridge et al., 2004). Les AMPA-R sont internalisés lors de l'induction d'une LTD (Lüthi et al., 1999) et ils sont incorporés à la membrane lors d'une LTP (Hayashi et al., 2000), grâce à la présence d'un réservoir de recyclage d'AMPA-R. Par ailleurs, la diffusion latérale des AMPA-R dans la membrane plasmique pourrait être un aspect essentiel de la plasticité synaptique (Borgdorff and Choquet, 2002).

Des enregistrements électrophysiologiques chez des souris β2nAChR-KO ont montré un retard dans l'augmentation du ratio AMPA/NMDA dans le CGLd, témoignant d'un délai dans la maturation synaptique (Shah and Crair, 2008). Le blocage non-spécifique *in vivo* du récepteur NMDA chez le rat ou le hamster induit une augmentation des zones de terminaison des axones rétiniens (Huang and Pallas, 2001; Simon and O'Leary, 1992). Chez le xénope, l'utilisation d'antagonistes des NMDA-R perturbe le développement des projections visuelles (Cline and Constantine-Paton, 1990). En revanche, dans un système *in vitro* de co-culture rétino-colliculaire, le blocage des récepteurs NMDA ou AMPA, ou de la libération synaptique n'entraîne pas de défaut rétinotopique (Nicol et al., 2007).

Des travaux récents ont montré l'importance des vagues rétiniennes spontanées dans la compétition entre axones de la même rétine. Après énucléation monoculaire chez le furet, le blocage de l'activité rétinienne dans l'œil restant perturbe le développement de la carte binoculaire dans le CGLd, tant au niveau de l'expansion des territoires que de leur lamination (Failor et al., 2015). Les chercheurs ont également mis en évidence que la perturbation des vagues rétiniennes affecte la projection contra-latérale avant les axones ipsi-latéraux, suggérant la présence de mécanismes différents dans ces deux populations axonales (Failor et al., 2015). Grâce à un modèle de délétion conditionnelle de VGLUT2, spécifiquement dans

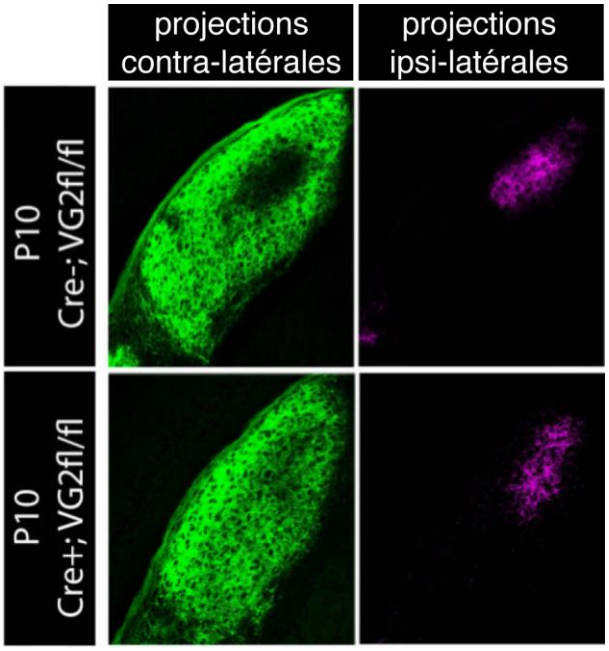


Figure 19: L'altération de la libération synaptique dans les CGR ipsi-latérales perturbe la ségrégation œil-spécifique mais pas la taille du territoire ipsi-latéral. (Koch et al., 2011).

les CGR ipsi-latérales, la libération synaptique a été inhibée dans ces CGR (Koch et al., 2011). Chez ces animaux, des projections contra-latérales sont présentes dans tout le CGLd jusque P28, y compris le territoire ipsi-latéral, dont elles sont normalement exclues (**Figure 19**). La transmission synaptique par les CGR ipsi-latérales serait donc nécessaire pour que celles-ci puissent exclure les axones contra-latéraux de leur territoire. La taille du territoire n'est en revanche pas affectée, suggérant encore une fois l'existence de mécanismes différents contrôlant la taille et la ségrégation des territoires œil-spécifiques.

Le raffinement des projections rétiniennes implique également des signaux rétrogrades, provenants de l'élément post-synaptique et envoyés vers les terminaisons axonales des CGR (e.g. Assali et al., 2014). Les endocannabinoides (CB) sont libérés par le neurone post-synaptique de façon activité-dépendante. Ils se fixent aux récepteurs cannabinoides (CB1R et CB2R) situés sur l'élément pré-synaptique et régulent la dépression à court ou long terme des synapses (Kano et al., 2009; Ohno-Shosaku and Kano, 2014). Cette LTD, qui peut mener à l'élimination de certaines synapses, pourrait ainsi sous-tendre le raffinement des connexions rétiniennes (Lee et al., 2016). Les différents acteurs de la signalisation CB sont exprimés dans le système visuel (Sickle et al., 2005) et leur implication dans le guidage et la ségrégation binoculaire des axones rétiniens a été démontrée dans le CS et le CGLd (Argaw et al., 2011; Duff et al., 2013; Lalonde et al., 2006). Les facteurs neurotrophiques, comme le BDNF (brain-derived neurotrophic factor) et son récepteur TrkB sont également importants pour protéger les CGR et les cellules des cibles intermédiaires (CS et CGLd) contre la mort cellulaire et la rétraction des axones (Caleo et al., 2000; Ma et al., 1998). De façon surprenante, les souris déficientes pour BDNF ou TrkB n'ont aucun défaut de ségrégation dans les cibles du système

visuel (Lyckman et al., 2005; Rodger and Frost, 2009), mais elles ont une projection ipsi-latérale ectopique retrouvée dans le CS caudal (Rodger and Frost, 2009) suggérant encore une fois des mécanismes différents dans les CGR ipsi- et contra-latérales.

Les résultats actuels concernant le rôle de la transmission synaptique dans la formation de la connectivité ne permettent pas de conclure si l'activité est requise uniquement en pré-synaptique ou si la transmission rétine-cibles est requise.

4. Rôle de l'AMP cyclique dans le développement des projections de la rétine

La signalisation AMP cyclique (AMPc) est impliquée dans un grand nombre d'évènements développementaux, tels que la différenciation cellulaire, la mort cellulaire, la réponse immunitaire, la croissance axonale, la réponse à des molécules de guidage, ou encore la modulation des connections synaptiques (Averaimo et al., 2016; Beavo and Brunton, 2002; Corredor et al., 2012; Koh et al., 1995; Nicol et al., 2006; Peace and Shewan, 2011; Ravary et al., 2003; Takanaga et al., 2004). Il est intéressant de comprendre la manière dont les signaux AMPc sont précisément contrôlés pour obtenir une telle spécificité dans la réponse à ces divers signaux. Un des éléments de contrôle de cette signalisation pourrait notamment être la régulation par les enzymes de synthèse de l'AMPc : les adénylate cyclases (AC).

4.1. Les adénylate cyclases

Après la première purification d'adénylate cyclase et son séquençage partiel, en 1989 (Krupinski et al., 1989), les études biochimiques et moléculaires des dernières décennies ont mis en évidence dix isoformes des AC (*e.g.* Nicol and Gaspar, 2014). Neuf d'entre-elles sont transmembranaires (AC1 à 9) et une est sous la forme soluble, l'AC10 ou AC soluble (sAC). Les AC transmembranaires sont composées de deux parties, TM1 et TM2, constituées de 6

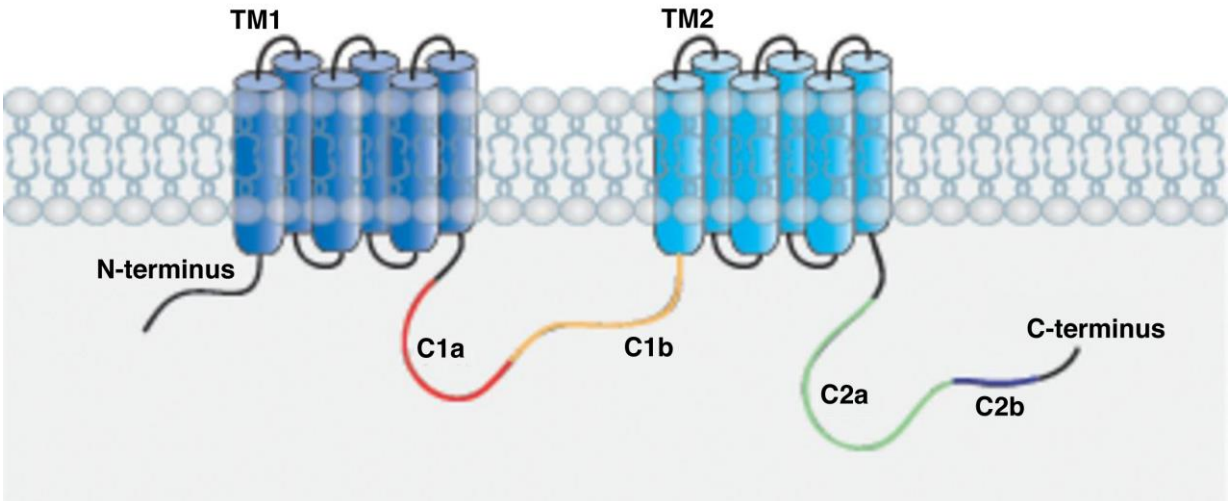


Figure 20: Structure des adénylate cyclases transmembranaires. Les AC sont constituées de deux domaines à 6 segments transmembranaires (TM1 et TM2) et de deux boucles cytoplasmiques (C1 et C2). Les parties C1a et C2a interagissent pour former le site catalytique. La partie régulatrice de liaison au calcium est C1b (adapté de Cooper et al., 2014).

domaines transmembranaires (**Figure 20**). Les boucles extracellulaires du domaine TM2 contiennent des sites de N-glycosylation, qui jouent un rôle dans la régulation de l'activité catalytique des AC (Wu et al., 2001). Les deux parties TM1 et TM2 sont reliées par deux boucles cytoplasmiques, C1 et C2. Les parties C1a et C2a interagissent pour former le site catalytique (Sunahara et al., 1996), qui convertit l'adénosine-triphosphate (ATP) en 3'-5'-adénosine-monophosphate cyclique (AMPc).

4.2. Régulation de la concentration d'AMPc

Expression différentielle des AC dans les tissus

Ces isoformes sont ont des patrons d'expression distincts et qui varient pendant le développement. Ceci permet l'activation de voies de signalisation spécifiques en aval (voir **Annexes - Table 1**). Des observations par hybridation *in situ* ont décrit de manière précise les profils d'expression des AC membranaires dans le SNC (Nicol et al., 2006b; Visel et al., 2006). AC1 est exprimée fortement chez le rongeur pendant la vie embryonnaire et post-natale, dans tout le système nerveux (cortex cérébral, hippocampe, thalamus, rétine, cervelet, moelle épinière, striatum). L'expression d'AC1 décroît à partir de P10 ; à P15, elle est restreinte à

l'hippocampe, au cortex et aux cellules granulaires du cervelet (Nicol et al., 2005). L'expression d'AC8 commence également dès la vie embryonnaire mais elle est en revanche assez faible et beaucoup plus restreinte localement qu'à l'âge adulte (Nicol et al., 2005). AC3 est fortement exprimée pendant la vie embryonnaire et post-natale, mais son expression est restreinte à l'épithélium olfactif et reste constante pendant le développement (Visel et al., 2006). Le profil d'expression de l'AC soluble, en revanche, n'a été que brièvement étudié. Elle est exprimée dans les testicules de souris, dans lesquelles la signalisation AMPc est importante pour la formation des spermatozoïdes (Esposito et al., 2004) ; et dans les neurones du SNC (Corredor et al., 2012; Wu et al., 2006).

Dans le système visuel chez le rongeur, les CGR expriment les AC1, 2, 3, 5, 8, 9 et AC soluble ; les cellules du CGLd expriment les AC1 et 8 ; et les cellules colliculaires les AC1, 2 et 8. Dans les CGR, AC1 et AC5 (et AC9 dans une moindre mesure) sont fortement exprimées de E15 à P10, puis leur expression décroit. Dans le CGLd, l'AC1 est fortement exprimée de E15 à P10 puis diminue à l'âge adulte. Dans le CS, l'AC1 est exprimée également à partir de P10, puis n'est plus détectée à l'âge adulte, tandis que l'expression d'AC2 et 8 augmente à l'âge adulte (Nicol et al., 2006b).

Une cellule donnée peut également exprimer une ou plusieurs isoformes et chacune de ces isoformes possède des propriétés uniques d'activation et d'inhibition (Willoughby and Cooper, 2007).

Régulation des AC par le calcium

Les AC1 et 8 (ainsi que l'AC3 *in vitro*) sont stimulées par le calcium (Ca^{2+}) *via* la calmoduline (CaM) (Fagan et al., 1996). L'affinité de la CaM est plus forte pour AC8 que pour AC1. Lorsque la concentration intracellulaire de Ca^{2+} augmente, celui-ci se fixe à la CaM, provoquant des modifications structurelles de la CaM. Le complexe Ca^{2+}/CaM se lie au domaine de régulation des AC, entraînant leur activation (Gifford et al., 2007). Le domaine de liaison des AC à la CaM se situe sur la partie C1b. L'AC soluble est également stimulée par le Ca^{2+} (Jaiswal and Conti, 2003; Litvin et al., 2003).

Toutes les AC sont inhibées par de fortes concentrations calciques, qui sont généralement toxiques pour les cellules, mais seules AC5 et 6 sont inhibées par des modifications

physiologiques de la concentration de Ca^{2+} (Cooper et al., 1998). L'inhibition des AC par le Ca^{2+} se fait directement, ou par l'intermédiaire d'autres molécules liant le Ca^{2+}. L'AC3 peut être inhibée directement ou *via* la calmoduline kinase II, ou CaMKinaseII (Wayman et al., 1995). L'AC9, elle, est inhibée par le Ca^{2+} *via* la calcineurine, une protéine phosphatase (Antoni et al., 1998). Les AC2, 4 et 7 sont insensibles au Ca^{2+}.

Régulation des AC par les récepteurs couplés aux protéines G

Dans la voie de signalisation par les récepteurs couplés à la protéine G (RCPG), la protéine G assure un lien entre un récepteur de signal et une protéine effectrice responsable de la réponse cellulaire (ici, l'AMPc). L'AC soluble est la seule AC qui n'est pas régulée par les protéines G. Toutes les autres AC sont stimulées par la protéine $G_s\alpha$ (la sous-unité stimulatrice de la protéine Gα) (**Figure 21**). Les AC1, 3, 5, 6, 8 et 9 sont inhibées par $G_i\alpha$ (la sous-unité inhibitrice), mais pas les AC2, 4 et 7. Les récepteurs couplés à $G_i\alpha$ sont d'ailleurs absents des tissus dans lesquels sont exprimées les AC2, 4 et 7. La protéine Gβγ inhibe les AC1 et 8, mais stimule les AC2, 4 et 7. Les AC3, 5, 6 et 9 sont insensibles à Gβγ (Willoughby and Cooper, 2007).

Régulation par les phosphodiestérases

Les phosphodiesterases (PDE) sont les principales enzymes de dégradation des nucléotides cycliques, l'AMPc (et le GMPc) : elles hydrolysent le 3'-5'-AMPc en 5'-AMP (Butcher and Sutherland, 1962) (**Figure 21**). Les PDE sont constituées d'un domaine catalytique et d'une région régulatrice. Il en existe 11 isoformes (PDE1 à 11) et plus de 20 gènes codant pour les PDE ont été identifiés jusqu'ici (Lugnier, 2006). Les PDE peuvent hydrolyser spécifiquement l'AMPc, le GMPc, ou les deux substrats (Thompson and Appleman, 1971). Elles diffèrent également selon leur sensibilité à la CaM (Wells et al., 1975), leur distribution ou encore leur inhibition par différents agents pharmacologiques (Lugnier, 2006). La distribution des PDE dans le cerveau du rat et de la souris a récemment été décrite (Kelly et al., 2014) et une étude a mis en évidence l'expression de PDE4 dans la rétine (Whitaker and Cooper, 2009). Dans les neurones, la PDE4 est impliquée dans la signalisation AMPc, en

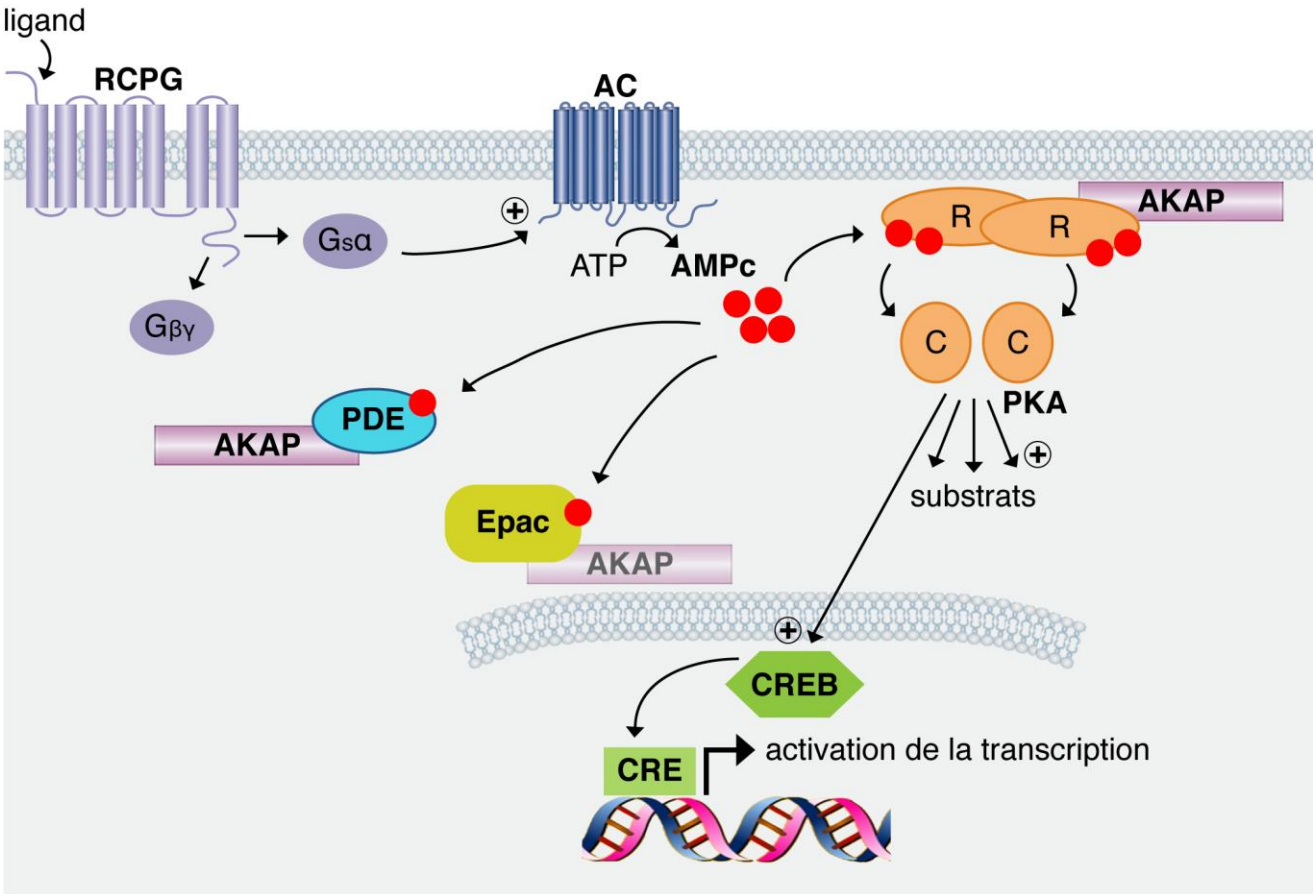


Figure 21: Aperçu de la voie de signalisation AMP cyclique. La stimulation de la protéine $G_s\alpha$ active l'adénylate cyclase (AC) qui catalyse la conversion d'ATP en AMPc. L'AMPc peut ensuite se lier à divers effecteurs. La liaison de l'ATP aux sous-unités régulatrices (R) de la PKA libère les sous-unités catalytiques (C) qui peuvent ainsi phosphoryler de multiples substrats. Les sous-unités R de la PKA sont ancrées à la membrane plasmique par les AKAP. L'AMPc peut aussi se lier à la phosphodiestérase (PDE), également ancré à la membrane (plasmique ou nucléaire) par les AKAP. Les Epac, parfois liées aux AKAP, peuvent être activées par l'AMPc. Enfin, l'AMPc peut induire l'activation de CREB, qui active la transcription de certains gènes.

propageant l'activité de la PKA de la membrane vers le cytoplasme et vers ses effecteurs nucléaires (Vincent et al., 2012).

Régulation par d'autres effecteurs

La protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) est le premier effecteur des signaux AMPc (voir Chapitre 4.3). Les AC5 et 6 sont inhibées par la PKA (au niveau de la boucle C1b), ce qui permet un rétro-contrôle de la signalisation AMPc (Chen et al., 1997; Iwami et al., 1995). La protéine kinase C (PKC) stimule $G_i\alpha$ ainsi que les AC insensibles au Ca^{2+} (AC2, 4 et 7), et inhibe l'AC9 (Willoughby and Cooper, 2007). La phosphorylation d'AC1 par la CamK IV inhibe son activité (Wayman et al., 1996).

Enfin, les signalisations en aval des principaux seconds messagers cellulaires (AMPc, GMPc et Ca^{2+}) sont étroitement liées. L'augmentation des niveaux locaux d'AMPc (ou de GMPc) dans des cultures de neurones de l'hippocampe induit une réduction des niveaux de GMPc (ou d'AMPc respectivement). Cette régulation réciproque des nucléotides cycliques dépend de l'activation des PDE (Shelly et al., 2010).

4.3. Signalisation en aval de l'AMP cyclique

La protéine kinase dépendante de l'AMPc

La PKA est constituée de deux sous-unités catalytiques liées à un dimère de sous-unités régulatrices (Taylor et al., 1990). Chaque sous-unité régulatrice peut lier 2 molécules d'AMPc et la fixation des 4 molécules d'AMPc induit la dissociation de l'enzyme. Les sous-unités catalytiques sont libérées et peuvent ainsi phosphoryler leurs nombreux substrats (**Figure 21**). Lorsque la concentration en AMPc diminue, les parties régulatrice et catalytique de l'enzyme se lient à nouveau (Taskén and Aandahl, 2004). Il existe 4 sous-unités régulatrices (RIα, RIβ ; RIIα, RIIβ) et 4 sous-unités catalytiques (Cα, Cβ, Cβγ et PRKX) différentes identifiées jusqu'ici (Skalhegg and Tasken, 2000), avec des variantes issues d'épissages alternatifs. On distingue deux PKA différentes, I et II, selon leurs sous-unités régulatrices, I ou II (Lee et al., 1983; Scott et al., 1987). Chaque sous-unité régulatrice possède un domaine de dimérisation, une zone d'interaction avec la sous-unité catalytique et deux domaines en tandem de liaison à l'AMPc (Skalhegg & Tasken, 2000). L'expression différentielle des isoformes des sous-unités R et C permet, encore une fois, d'atteindre une spécificité dans la signalisation AMPc (Carnegie and Scott, 2003). La sous-unité RII est par exemple spécifiquement sur-exprimée par rapport à RI dans de cône de croissance des neurones de xénope (Han et al., 2007). Chez la souris, RIα est exprimée dans le cœur et le SNC, tandis que l'expression de RIβ est restreinte au cerveau et à la moelle épinière (Cadd et al., 1990). L'activité de la PKA est également étroitement régulée par les niveaux d'AMPc (Taskén et al., 1991).

Les AKAP

Les AKAP (A-kinase anchoring proteins) sont des protéines d'échauffaudage qui ancrent la PKA sous sa forme inactive à des sites spécifiques de la membrane plasmique (Carnegie and Scott, 2003) (**Figure 21**). Historiquement, la première AKAP caractérisée est la protéine associée aux microtubules du cytosquelette (MAP2) ; mais on connaît désormais plus de 50 isoformes (Wong and Scott, 2004). Les AKAP contiennent un domaine d'interaction avec la sous-unité régulatrice de la PKA, des signaux de localisation spécifiques et sont capables de former des complexes macromoléculaires avec de nombreuses molécules, telles que la PKC (Klauck et al., 1996), les PDE, les Epac, des canaux ioniques ou d'autres protéines d'ancrage. Les AKAP forment des complexes macromoléculaires différents dans divers tissus ou compartiments cellulaires (Wong and Scott, 2004), permettant, encore une fois, une spécificité de la signalisation AMPc.

Les Epac

Les protéines Epac (exchange protein activated by cAMP) sont également directement activées par l'AMPc (de Rooij et al., 1998). Il en existe deux isoformes, Epac1 et 2. Elles peuvent être localisées dans divers compartiments cellulaires et sont différentiellement exprimées dans les tissus. L'expression d'Epac1 est ubiquitaire, tandis que Epac2 est principalement exprimée dans le cerveau et les glandes surrénales (Bos, 2003). La présence d'AMPc augmente la concentration locale d'Epac (Qiao et al., 2002).

Le calcium

La concentration de calcium peut également être régulée par l'AMPc (Averaimo and Nicol, 2014; Pietrobon et al., 2011) puisque ce second messager peut activer certains canaux calciques de la membrane plasmique ou libérer les stocks de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique, grâce aux protéines Epac (Pietrobon et al., 2011). Dans les neurones spinaux de xénope, les oscillations de la concentration en AMPc sont directement corrélées à la fréquence des pics de la concentration calcique (Gorbunova and Spitzer, 2002). Par ailleurs, l'augmentation transitoire de la concentration en AMPc précède et est nécessaire à l'augmentation locale de Ca^{2+} dans le filopode, requise pour la réponse de ces axones à la molécule de guidage nétrine1

(Nicol et al., 2011). Lors de la propagation des vagues spontanées dans la rétine, les oscillations de la concentration calcique induisent une dépolarisation membranaire, qui engendre une augmentation de l'activité de la PKA dans les CGR. Une combinaison d'AC membranaires et soluble et de PDE permet ce couplage des oscillations calciques avec l'activité de la PKA (Dunn et al., 2009).

CREB

La famille de facteurs de transcription CREB (cAMP reponsive element binding protein) comprend une dizaine d'isoformes, qui se lient toutes au promoteur CRE (cAMP responsive element). La séquence de CREB comporte des régions responsables de l'activation de la transcription, des domaines de dimérisation et de liaison à l'ADN, ainsi que des sites de phosphorylation permettant de moduler son activité (Silva et al., 1998). La famille des CREB comporte des activateurs et des répresseurs de la transcription, différentiellement exprimés dans les tissus pendant le développement. Les sous-unités catalytiques de la PKA peuvent être déplacées dans le noyau, phosphoryler CREB et ainsi réguler son activité (Bacskai et al., 1993; Hagiwara et al., 1993). L'augmentation de la concentration calcique ou des niveaux d'AMPc dans des neurones olfactifs de rat induit une augmentation du Ca^{2+} nucléaire, suivie de la phosphorylation de CREB (Pietrobon et al., 2011). Dans le CGLd, l'expression de CREB atteint un niveau maximal juste avant l'ouverture des yeux, et contribue au raffinement des axones rétiniens (Pham et al., 2001).

4.4. Signaux locaux d'AMP cyclique

L'AMPc est un second messager soluble et peut diffuser très largement dans le cytoplasme. La localisation subcellulaire des adénylate cyclases pourrait donc jouer un rôle dans la spécificité spatiale des voies de signalisation activées en réponse à l'AMPc, en restreignant des signaux à des compartiments subcellulaires. Cette compartimentation spatiale des AC permet d'associer les différents acteurs de la signalisation AMPc impliquée dans une fonction donnée, dans un domaine de la membrane.

L'existence de micro-domaines d'AMPc a tout d'abord été révélée dans des cardiomyocytes (Jurevicius and Fischmeister, 1997). Dans ces cellules, les régulateurs et effecteurs de l'AMPc, impliqués dans les fonctions de contraction ou relaxation, ont des localisations subcellulaires *distinctes* (Mika et al., 2012). Par ailleurs, des signaux AMPc restreints ont été observés dans ces cellules (Nikolaev et al., 2010).

Les radeaux lipidiques

Dans les neurones, les différentes AC sont localisées dans différents compartiments : les AC sensibles au Ca^{2+} sont localisées dans des régions de la membrane plasmique appelées radeaux lipidiques, tandis que les AC insensibles au Ca^{2+} sont exclues de ce compartiment membranaire (Willoughby and Cooper, 2007). Les radeaux lipidiques sont des micro-domaines de la membrane plasmique enrichis en lipides spécifiques qui les différencient du reste de la membrane. Ils contiennent ainsi des protéines transmembranaires spécifiques et sont donc considérés comme des plateformes de signalisation. Ils sont également très dynamiques et ils peuvent ainsi renouveler rapidement leurs composants membranaires, comme certains récepteurs (Pike, 2003). Ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions neuronales, comme la polarisation et la formation de l'axone, le développement des épines, la réponse axonale à nétrine ou BDNF *in vitro* ou encore le trafic des récepteurs (Brusés et al., 2001; Guirland et al., 2004; Hering et al., 2003; Hérincs et al., 2005; Ledesma et al., 1998). La présence de micro-domaines d'AMPc dans les radeaux lipidiques a également été démontrée dans les axones rétiniens chez la souris (Averaimo et al., 2016).

Le cône de croissance axonal

Des signaux AMPc distincts ont également été mis en évidence dans différents compartiments du cône de croissance chez le xénope : les filopodes et le centre du cône de croissance. Il a été montré que la localisation spécifique de la PKA de type II, dans les filopodes, est essentielle à la motilité et au guidage du cône de croissance des neurones de xénope (Han et al., 2007). De plus, une AC photo-activable a été adressée à ces deux compartiments. La signalisation AMPc, spécifiquement au niveau des filopodes mais pas du centre du cône de croissance, reproduit l'attraction du cône observée en réponse à la nétrine (Nicol et al., 2011).

Compartiment axonal vs *somatique*

Dans les neurones d'hippocampe et de cortex de souris, il a été démontré que la PKA de type II est présente au niveau des dendrites et exclue des axones et des terminaux pré-synaptiques. Les sous-unités catalytiques de la PKA, activées par l'AMPc, sont déplacées au niveau des épines, ce qui permet de réguler l'activité des synapses (Zhong et al., 2019).

In vitro, la polarisation des neurones de l'hippocampe est favorisée par des signaux AMPc différents dans les compartiments axonal et somatique. L'augmentation de la concentration locale d'AMPc (corrélée à la diminution de la concentration de GMPc) dans des neurites indifférenciées induit la formation d'un axone et empêche la formation de dendrites. *In vivo*, la perturbation des niveaux locaux d'AMPc dans ces neurones affecte leur polarisation (Shelly et al., 2010). Par ailleurs, l'augmentation locale des niveaux d'AMPc dans un neurite induit la diminution des niveaux d'AMPc dans les autres neurites, limitant ainsi la formation de l'axone à un seul neurite (Shelly et al., 2010).

Enfin, il a été montré que l'activité de la PKA est compartimentée dans les neurones olfactifs de drosophile. Suite à l'application d'un activateur de l'AMPc, l'activation de la PKA est différente dans les compartiments somatique, dendritique et axonal des neurones (Gervasi et al., 2010). De façon intéressante, elle est inactive dans le compartiment somatique.

4.5. Rôle de l'AMPc dans le développement des projections rétiniennes

Il est largement établi que l'AMPc joue un rôle essentiel dans le développement des axones rétiniens (*e.g*. Nicol and Gaspar, 2014). L'injection monoculaire d'AMPc induit une expansion du territoire de l'œil injecté dans le CGLd, aux dépens du territoire de l'autre œil, sans affecter la ségrégation de ces territoires (Stellwagen and Shatz, 2002). Dans ce modèle, la propagation des vagues calciques dans la rétine est perturbée. La délétion génétique de l'AC1 empêche la ségrégation des projections des CGR et entraine un chevauchement des territoires œil-spécifiques dans le CGLd et des défauts de rétinotopie (**Figure 22**) (Nicol et al.,

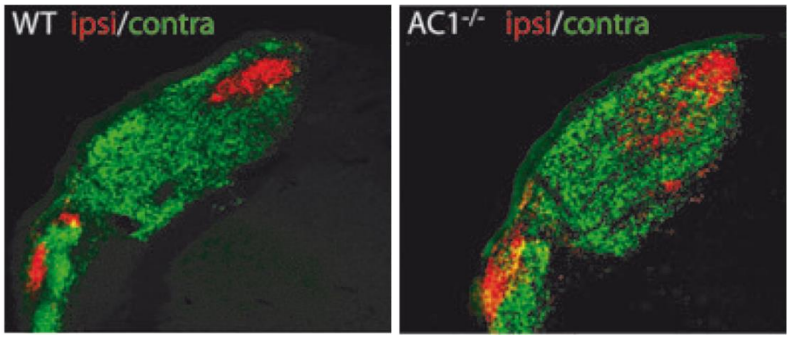


Figure 22: Défauts de ségrégation binoculaire chez les souris déficientes en AC1. Chez la souris contrôle (WT), les projections œil-spécifique forment des territoires bien distincts. Chez la souris AC1$^{-/-}$, les axones contra-latéraux sont retrouvés dans le territoire ipsi-latéral, et réciproquement (Nicol, 2006b).

2006b; Ravary et al., 2003). Dans ce modèle, les vagues calciques ne sont pas altérées. L'AC1 est également requise pour que les axones des CGR puissent répondre aux effets répulsifs des éphrines A *in vitro* : les cônes de croissance d'axones déficients en AC1 collapsent mais sont incapables de se rétracter en réponse aux éphrines A (Nicol et al., 2006a). Chez les souris déficientes pour AC1, des projections ipsi-latérales ectopiques sont retrouvées dans tout le CS, y compris dans la partie caudale (Plas et al., 2004; Ravary et al., 2003). La délétion d'AC1, spécifiquement dans la rétine, a montré que cette enzyme était requise en pré-synaptique pour l'élaboration d'une zone de terminaison dense et focale ainsi que pour l'élimination de collatérales ectopiques des axones rétiniens (Dhande et al., 2012). Dans le CGLd, l'AMPc contribue également au raffinement des axones rétiniens *via* l'activation de CREB (Pham et al., 2001). Enfin, l'AC soluble est exprimée par les CGR et son activation favorise leur survie et la croissance des axones rétiniens (Corredor et al., 2012).

Un bloqueur génétiquement encodé de la signalisation AMPc "cAMP-Sponge" a été décrit récemment (Lefkimmiatis et al., 2009). L'utilisation de cAMP-Sponge, spécifiquement exprimé dans les radeaux lipidiques, entraine des défauts de rétraction des axones en réponse à l'éphrine A5 (Averaimo et al., 2016). De plus, *in vivo* le raffinement des projections des CGR exprimant cAMP-Sponge est perturbé (Averaimo et al., 2016).

5. Autres mécanismes

5.1. Rôle de la mort cellulaire dans le développement des projections visuelles

Pendant le développement des projections rétiniennes, les CGR subissent un phénomène de mort cellulaire développementale non négligeable. Chez la souris, diverses méthodes ont été employées pour étudier la mort des CGR. En soustrayant le nombre de CGR observées à P0 et à P30, il a été montré qu'environ la moitié des CGR meurent durant les deux premières semaines post-natales (Farah and Easter, 2005). Il a été montré par la suite que cette disparition s'effectue entre P0 et P7 (Voyatzis et al., 2012). La quantification du nombre de profils pycnotiques des noyaux de CGR, caractéristique de mort cellulaire, a montré un maximum entre P2 et P4 (Young, 1984). Enfin, la méthode de TUNEL, permet de marquer les cellules en train de mourir. Cette méthode a montré, à P2, une nette augmentation du nombre de CGR entrant dans un processus de mort cellulaire (Farah and Easter, 2005).

Le blocage de l'activité dans la rétine de rats induit une diminution du nombre de CGR éliminées pendant le développement (Fawcett et al., 1984). Grâce à des injections focales de traceur rétrograde, il a été montré qu'à P0, quelques cellules projettent vers des localisations erronées dans le CS. A P12, la plupart de ces cellules a disparu, démontrant l'importance de la mort cellulaire pour l'élimination des CGR dont les projections sont mal positionnées (O'Leary et al., 1986). Cependant, le blocage de la mort cellulaire ne semble pas empêcher les cellules survivantes contra-latérales de se rétracter dans le CS en réponse aux molécules de guidage (O'Leary et al., 1986). Par ailleurs, la surexpression de Bcl2, protéine anti-apoptotique, permet de bloquer l'apoptose. Ce modèle ne reproduit pas les défauts de cartes visuelles suggérant ainsi que l'absence de mort cellulaire n'empêche pas le raffinement de la connectivité visuelle (Yakura et al., 2002). Enfin, l'activation de l'AC soluble, suivie de l'augmentation des niveaux d'AMPc, augmente significativement la survie des CGR (Corredor et al., 2012). Le rôle de la mort cellulaire développementale des CGR dans l'élaboration des cartes visuelles et l'organisation des projections rétiniennes n'a donc pas encore été complètement élucidé.

5.2. Rôle de la sérotonine dans le développement des projections visuelles

La transmission sérotoninergique est impliquée dans le raffinement de la connectivité rétinienne, dépendant de l'activité. Le rôle de la sérotonine (5-HT) a d'abord été mis en évidence chez le hamster. L'augmentation des niveaux de 5-HT dans le cerveau perturbe les projections rétino-tectales (Rhoades et al., 1993). La monoamine oxydase A (MAOA) permet la dégradation de la sérotonine. La mise en évidence d'un modèle de souris déficientes pour la MAOA (MAOA-KO) a permis de mieux comprendre le rôle de 5-HT pendant le développement. Les souris MAOA-KO présentent une augmentation des niveaux de 5-HT dans le cerveau durant les deux premières semaines post-natales (Cases et al., 1995). Dans ce modèle, 5-HT s'accumule dans une sous-population de CGR et leur axone (Upton et al., 1999) et le développement des projections binoculaires est perturbé. Les projections ipsi-latérales sont diffuses dans le CS et n'ont plus cette distribution en patchs caractéristiques dans le SO (Upton et al., 1999). Dans le thalamus, le territoire recouvert par les projections ipsi-latérales est plus étendu et les projections contra-latérales recouvrent toute la surface du CGLd. Ces défauts sont visibles dès P8 dans le CGLd (Upton et al., 1999).

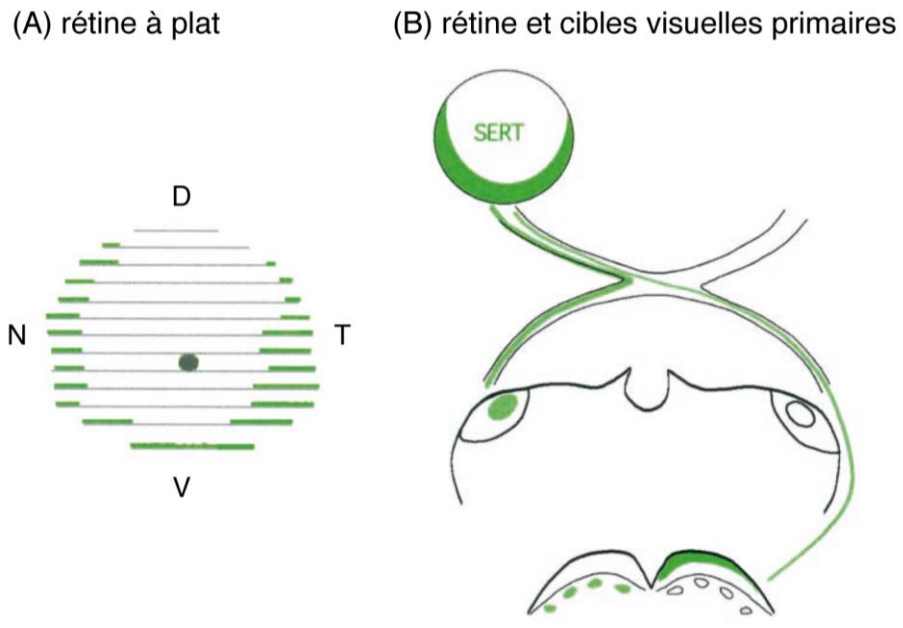


Figure 23: Représentation schématique de l'expression de SERT dans la rétine et les cibles visuelles primaires. (A) La reconstruction de rétine à partir de coupes montre que l'expression de SERT (en vert) est restreinte à un croissant préiphérique de la rétine, excluant la partie dorsale. **(B)** SERT est exprimée dans le territoire correspondant aux fibres ipsi-latérales dans le CGLd. Dans le CS, SERT est présente dans les régions ipsilatérales du SO et du SGS ; mais également dans la partie supérieure du SGS, innervée par les axones contra-latéraux (Upton et al., 1999).

Le transporteur de la sérotonine (SERT), qui permet la capture de la 5-HT extracellulaire vers l'intérieur de la cellule, est exprimé par les CGR à partir de E15. L'expression de SERT est restreinte à la périphérie de la rétine, excluant la région dorsale

(**Figure 24**), et semble diminuer à partir de P6. Le récepteur à la sérotonine (5-HT1b) est exprimé uniformément par les CGR à partir de E15 et son expression persiste à l'âge adulte (Upton et al., 1999). La délétion génétique de MAOA/5-HT1b, de MAOA/SERT/5-HT1b ou de SERT/5-HT1b permet de retrouver une organisation des projections dans le CGLd comparable aux animaux contrôles (Salichon et al., 2001; Upton et al., 2002). Cela suggère un rôle essentiel de 5-HT1b et de SERT dans la signalisation sérotoninergique impliquée ici. En revanche, la délétion génétique de SERT seule ne permet pas de rétablir l'organisation de la carte binoculaire (Salichon et al., 2001; Upton et al., 2002). En l'absence de SERT, la ségrégation des axones rétiniens est perturbée dans le CGLd et le CS. Les altérations diffèrent dans les deux structures : dans le CGLd, au contraire du CS, la taille du territoire ipsi-latéral n'est pas affectée (Upton et al., 2002). SERT est d'ailleurs exprimée différemment dans le thalamus et le SC : son expression est restreinte aux CGR ipsi-latérales dans le CGLd, mais certaines CGR contra-latérales expriment SERT dans le CS (**Figure 23**) (Upton et al., 1999).

Il a été montré que la stimulation pré-synaptique de 5-HT1b dans les terminaux des CGR inhibe la transmission glutamatergique (Mooney et al., 1994). L'activation excessive de cette voie de signalisation pourrait donc affecter les procédés développementaux dépendants de l'activité, comme le développement des projections rétiniennes. Par ailleurs, la diminution des niveaux de 5-HT par des agents pharmacologiques induit également une projection ipsi-latérale exubérante dans le CS (Upton et al., 2002). Ainsi, aussi bien l'excès que le manque de sérotonine affecte le développement des projections binoculaires.

5.3. Rôle de la microglie dans le développement des projections visuelles

Les cellules microgliales, décrites initialement par Del Rio-Hortega (1932) dérivent de macrophages du sac vitellin (Ginhoux et al., 2010). Les microglies peuvent présenter une morphologie ramifiée, ou amiboïde (*e.g*. Squarzoni et al., 2015). Les ramifications microgliales sondent continuellement le parenchyme et établissent des contacts transitoires avec les terminaux synaptiques, les épines dendritiques, les cellules gliales et les vaisseaux sanguins voisins (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005; Paolicelli and Gross, 2011; Schafer et al., 2012). L'extension et la rétraction de ces ramifications dépendent de l'activité des neurones

(Nimmerjahn et al., 2005). Il a été récemment montré que la microglie englobe activement les terminaux pré- et post-synaptiques dans l'hippocampe (Paolicelli et al., 2011). L'utilisation de souris déficientes pour le récepteur à la fractalkine (Cx3cr1), exprimé exclusivement par la microglie (Jung et al., 2000), a montré que le nombre de cellules microgliales est réduit dans le cerveau (Paolicelli and Gross, 2011). Chez ces animaux, le raffinement des synapses est retardé dans l'hippocampe. Ce retard se traduit par des épines dendritiques exubérantes, moins de courants post-synaptiques excitateurs spontanés et une augmentation de la LTD (Paolicelli and Gross, 2011).

La microglie a été décrite dans la rétine — dans et autour du tractus optique — et dans le CGLd (Lee et al., 2019; Schafer et al., 2012; Tremblay et al., 2010). Ces cellules jouent un rôle essentiel dans la formation de la connectivité rétino-thalamique et leur densité augmente dans le CGLd entre P4 et P30 (Kolodziejczak et al., 2015). La technique de microscopie électronique a permis de décrire de façon extrêmement précise la localisation de la microglie dans le CGLd (Tremblay et al., 2010). La vaste majorité des ramifications microgliales est en contact direct avec les éléments synaptiques, y compris la fente synaptique (Tremblay et al., 2010). Comme il a été montré dans l'hippocampe, la microglie englobe activement les terminaux pré-synaptiques dans le CGLd, principalement durant la période de raffinement dans le CGLd (Schafer et al., 2012). Cet englobement dépend de l'activité neuronale et de l'expression de Cx3cr1 et concerne aussi bien les axones ipsi- que contra-latéraux (Schafer et al., 2012). Chez les souris déficientes pour Cx3cr1, la ségrégation binoculaire est affectée et le territoire ipsi-latéral est plus grand que chez les animaux contrôles (Schafer et al., 2012). Les interactions entre la microglie et les synapses rétino-thalamiques sont perturbées suite à la privation visuelle (Tremblay et al., 2010). Cela suggère que la microglie joue un rôle dans la plasticité synaptique en réponse à un stimulus visuel.

Enfin, les axones rétiniens sérotoninergiques sont en contact étroit avec les cellules microgliales dans le CGLd, qui expriment le récepteur à la sérotonine 5-HT2b (Kolodziejczak et al., 2015). Chez les souris déficientes pour 5-HT2b, le territoire ipsi-latéral est diffus et semble subdivisé en plusieurs amas dans le CGLd (Kolodziejczak et al., 2015). Ainsi, la sérotonine pourrait interagir avec les cellules microgliales, participant au développement de la connectivité visuelle.

L'organisation des projections rétiniennes dans le cerveau a donc été décrite en détail. Les cartes visuelles formées par les CGR se développent progressivement grâce à des mécanismes compétitifs, dépendants notamment de l'activité des neurones et de la signalisation AMPc. Il a été montré que ces mécanismes compétitifs dépendaient de l'activité relative entre les deux yeux (inter-œil). Le rôle de l'activité relative des cellules adjacentes (intra-œil) n'a en revanche pas été étudié jusqu'ici compte-tenu du défi technique que posent ces investigations. Des données récentes montrent que des synapses voisines dont l'activité est corrélée co-stabilisent leurs connexions dans le système visuel. Puisque les CGR sont organisées topographiquement dans les cibles du système visuel, ces résultats suggèrent que des CGR adjacentes, dont l'activité est corrélée par la propagation des vagues calciques, pourraient co-stabiliser leurs connexions.

Cette thèse de doctorat s'intéresse tout particulièrement à l'étude des mécanismes compétitifs et coopératifs impliqués dans le développement des cartes visuelles. Le développement d'un outil moléculaire générant une mosaïque de deux populations de cellules a permis l'examen de ces interactions entre CGR dans un organisme intact.

Les résultats décrits dans ce travail démontrent que des mécanismes coopératifs participent au raffinement des connexions des CGR adjacentes entre P3 et P15. Cette coopération lors de la stabilisation des arborisations axonales dépend de la signalisation AMPc au sein des CGR. Elle n'influence en revanche ni le guidage des axones, ni la mort cellulaire, ni les vagues d'activité spontanée rétiniennes ; suggérant une localisation de ces mécanismes au niveau des cibles visuelles plutôt que de la rétine. De plus, des résultats préliminaires suggèrent que des changements de morphologie des synapses pourraient être impliqués. Ces données dans l'ensemble supposent l'existence de signaux locaux d'AMPc, comme il a déjà été envisagé dans la littérature, dans le compartiment somatique ou axonal des CGR. J'ai développé des outils moléculaires qui permettraient la perturbation de la signalisation AMPc spécifiquement au niveau de l'un ou l'autre de ces deux compartiments.

Ces travaux révèlent également que l'activité électrique intrinsèque des CGR est essentielle pour leur développement et leur maintien au sein de leurs cibles, dès que leurs axones atteignent le thalamus. L'activité pourrait avoir une seconde composante, coopérative,

puisque les CGR dont l'activité est toujours corrélée à celle des autres cellules ne sont pas perturbées dans leur développement.

Dans l'ensemble, ce travail de thèse démontre l'existence de mécanismes de co-stabilisation de connexions de neurones adjacents, qui coopèrent pendant la compétition entre axones. Ces données permettront de mieux comprendre les procédés qui sous-tendent les mécanismes compétitifs pendant le développement de la connectivité neuronale.

MATERIEL & METHODES

Le matériel et les méthodes utilisés dans la Partie 1 sont décrits dans l'article correspondant aux résultats de cette partie.

Les méthodes d'électrophysiologie ont été également été décrites dans cet article et les données ont été obtenues par Martijn Sierksma.

Animaux

Les souris Ptf1Cre ; Tau-GFP ont été données par Kim N.B. Charvet, Institut de la Vision. La génération et le génotypage des souris ont été effectués comme indiqué dans la bibliographie (Kawaguchi et al., 2002; Renier et al., 2010).

Plasmides

Les constructions ADN ont été clonées avec l'aide de Sandrine Couvet et Fiona Roche.

Les constructions ADN codant pour LOKI (ControlZaic-SYP-Tomato) et THOR (SpongeZaic-SYP-Tomato) ont été clonées dans des plasmides sous le contrôle du promoteur pCAG. Pour le clonage de THOR, la séquence de la synaptophysine-tdTomato (SYP, AddGene #34881) a été fusionnée au variant mTurquoise2 par une séquence 2A (Louail et al., en préparation). Cette construction a ensuite été insérée dans le plasmide SpongeZaic (Louail et al., en préparation) grâce aux enzymes de restriction AflII et NotI. La construction ADN codant pour LOKI a été obtenue suivant la même stratégie, mais a été insérée dans le plasmide ControlZaic (Louail et al., en préparation) grâce aux enzymes de restriction AflII et NotI.

La construction ADN KirZaic a été clonée dans un plasmide sous le contrôle du promoteur pCAG. La séquence de Kir2.1 (*KCNJ2*, donnée par Michael Demarque) a été fusionnée à l'YFP par une séquence 2A, puis insérée dans le plasmide SpongeZaic par les enzymes de restriction AgeI et NheI.

Le motif NLG1 a été synthétisé puis inséré en C-terminal de la séquence de cAMP-sponge-Kras (Averaimo et al., 2016) grâce aux enzymes de restriction AflII et SphI. Le motif Kv2.1 a été synthétisé puis inséré en C-terminal de la séquence de cAMP-sponge-Kras grâce aux enzymes de restriction AflII et MluI. Le motif cAPP a été synthétisé puis inséré en C-terminal de la séquence de cAMP-sponge-Kras grâce aux enzymes de restriction AflII et SphI. Le motif SYP (AddGene, #34881) a été inséré en N-terminal de la séquence de Lyn-cAMP-sponge grâce aux enzymes de restriction AflII et SphI.

Culture et transfection de neurones d'hippocampe

Les cultures de neurones d'hippocampe ont été réalisées comme décrit précédemment (Leterrier et al., 2006). Les neurones d'hippocampe d'embryons de souris c57bl6/Rj ont été disséqués à E15. Après un traitement avec de la trypsine, la dissociation a été effectuée avec une pipette. Les cellules ont été déposées sur des lamelles de verre de 10 mm recouvertes de poly-L-lysine, à une densité d'environ 500 cellules·mm^{-2}. Le milieu utilisé pour déposer les cellules est du Neurobasal (ThermoFisher) supplémenté avec 2% de B27 (ThermoFisher) et contenant de la Glutamine (0,5 mM) et de la pénicilline G (10 U·mL^{-1})/streptomycine (10 U·mL^{-1}), conditionné sur une couche de cellules gliales confluentes.
Les neurones ont été transfectés après 3 jours in vitro (DIV), grâce à la Lipofectamine 2000 (ThermoFisher), suivant les instructions du fabricant.

Immunohistochimie de cultures de neurones hippocampaux

Après 15 DIV, les neurones transfectés ont été fixés avec du PFA dilué à 4% dans du tampon phosphate, puis perméabilisés et bloqués dans 1% de Triton et 3% de PSA dilués dans du PBS 1x. Les neurones ont été ensuite incubés avec les anticorps suivant : anti-Tau (Merck, #577801), suivi d'un anticorps couplé à AlexaFluor-647 (Jackson, #711-605-150) et anti-HA (Cell Signaling, #37245), suivi d'un anticorps couplé à AlexaFluor-594 (Invitrogen, #A21207).
La méthode d'immunohistochimie sur rétines entières a été décrite précédemment (Louail, en prep). Les rétines ont été incubées avec un anticorps anti-HA (Cell Signaling, #37245), suivi d'un anticorps couplé à AlexaFluor-594 (Invitrogen, #A21207).

Immunohistochimie

Les rétines entières des animaux ont été perméabilisées pendant une nuit dans du PBS gélatine-sucrose, puis incubées avec un anticorps suivants :
- anti-GFP (Invitrogen, #A11122), puis un anticorps secondaire couplé à AlexaFluor-488 (Jackson, #711-545-152).
- anti-HA (Cell Signaling, #37245), suivi d'un anticorps secondaire couplé à AlexaFluor-594 (Invitrogen, #A21207).

Les coupes de cerveau des animaux électroporés avec LOKI et THOR ont été perméabilisées, entières, pendant une nuit dans du PBS gélatine-sucrose, puis incubés avec un anticorps anti-VGLUT2

(Synaptic Systems, #135403), puis un anticorps secondaire couplé à AlexaFluor-647 (Jackson, #711-605-152).

Plasmides électroporés

Les plasmides suivants ont été utilisés pendant l'électroporation *in utero* :

	ADN	Concentration (µg/µL)
Partie 1.3	LOKI	2
	pSncg-Cre	0,05
	THOR	2
	pSncg-Cre	0,05
Partie 2	KirZaic	2
	pSncg-Cre	0,05
Partie 3	cAMP-sponge-NLG	2
	cAMP-sponge-Kv2.1	2
	cAMP-sponge-cAPP	2

Imagerie

Les images de rétines ont été obtenues grâce à un microscope à épifluorescence droit (Leica DM6000B ; objectif 2,5X), ou à un microscope confocal inversé (Olympus FV1000 ; objectif 10X, N.A. 0,4 ; objectif 20X, N.A. 0,85 ; objectif 60X, N.A. 1,35).

Les images de transfection de neurones d'hippocampe ont été obtenues grâce à un microscope à épifluorescence droit (Leica DM6000B ; objectif 20X), ou à un microscope confocal inversé (Olympus FV1000 ; objectif 40X, N.A. 1,3).

Analyse des synapses

Les images de CGLd ont été obtenues grâce à un microscope confocal inversé (Olympus FV1000 ; objectif 100X, N.A. 1,4). Les images ont été segmentées en utilisant la méthode décrite précédemment (Louail et al., en préparation) ; puis l'analyse de la surface, de la forme (i.e. circularité) et du nombre de synapses a été effectuée en utilisant la fonction *Analyze Particles* de Fiji.

RESULTATS

PARTIE 1 : Le rôle de l'AMP cyclique dans les interactions entre les CGR

1. La coopération entre les cellules ganglionnaires de la rétine participe au raffinement des axones rétiniens

Pendant le développement, les axones des CGR des deux yeux envahissent initialement des régions qui se superposent dans le CGLd avant de se ségréger en deux territoires distincts. Le raffinement de cette carte binoculaire requiert des mécanismes compétitifs dépendants de l'activité des neurones. Ces procédés reposent sur la propagation de vagues d'activité calcique dans la rétine en développement, qui corrèlent l'activité électrique de CGR adjacentes. La signalisation AMPc joue un rôle dans la régulation des vagues calciques et est également impliquée dans le développement de la carte binoculaire, même en l'absence d'altération de ces vagues.

Cette compétition entre neurone est habituellement considérée comme impliquant uniquement les partenaires pré- et post-synaptiques. Cependant, des études récentes suggèrent que des neurones co-actifs pourraient co-stabiliser leurs connexions. Ainsi, les épines co-actives d'un même neurone post-synaptique sont stabilisées alors que les épines asynchrones sont déprimées. Puisque l'activité électrique de CGR adjacentes est corrélée, elles pourraient co-stabiliser leurs connexions dans le CGLd. Bien que des interactions entre divers éléments pré-synaptiques voisins aient été envisagées, la complexité des méthodes expérimentales nécessaires pour tester cette hypothèse n'a jusqu'ici pas permis de les évaluer dans un organisme intact.

Nous apportons ici la preuve que les axones de CGR adjacentes co-stabilisent leurs branches dans le CGLd. Nous avons développé un outil moléculaire innovant, générant une mosaïque de deux populations de cellules, dont une dans laquelle la signalisation AMPc est perturbée. Nous démontrons que les interactions entre CGR, dépendantes de la signalisation AMPc dans ces cellules, participent à la stabilisation de leurs arborisations axonales dans le CGLd. Ces interactions n'influent ni sur le guidage des axones, ni sur la mort cellulaire, ni sur

la propagation des vagues d'activité calcique dans la rétine. Dans d'autres systèmes neuronaux, l'AMPc influence la potentialisation ou la dépression synaptique. Ces observations et nos résultats suggèrent dans l'ensemble, que des interactions entre les axones rétiniens pourraient résulter de mécanismes impliqués dans le développement des synapses.

La connectivité de nombreux systèmes neuronaux est initialement exubérante avant d'être raffinée grâce à des mécanismes compétitifs dépendants de l'activité des neurones. La coopération entre axones rétiniens que nous avons mis en évidence ici pourrait ainsi être impliquée dans le développement de la connectivité d'autres systèmes, en dehors du système visuel.

cAMP-dependent co-stabilization of axonal arbors from adjacent developing neurons

Alice Louail[1,*,†], Martijn C. Sierksma[1,*], Antoine Chaffiol[1], Ahlem Assali[2,3], Sandrine Couvet[1], Melissa Nedjam[1], Fiona Roche[1], Yvrick Zagar[1], Jens Duebel[1], Xavier Nicol[1,†]

[1] *Sorbonne Université, Inserm, CNRS, Institut de la Vision, 17 rue Moreau, F-75012 Paris, France*

[2] *Sorbonne Université, Inserm, UMR_S 1270, Institut du Fer à Moulin, Paris F-75005, France*

[3] *Present address: Department of Neuroscience, Medical University of South Carolina, 173 Ashley Avenue, Charleston, SC 29425, USA*

[*] *These authors contributed equally to this work*

[†] *Correspondence to A.L. (alice.louail@inserm.fr) or X.N. (xavier.nicol@inserm.fr)*

Number of words in the abstract: 115

Number of words in the main text: 2388

Number of figures: 4

Number of supplementary figures: 7

Number of supplementary tables: 2

Number of supplementary videos: 3

Key words: competition, cooperation, retina, pruning, retinal ganglion cells, spontaneous activity

Short title: Axon pruning mediated by cAMP in nearby axons

ABSTRACT

The connectivity of many neuronal networks is exuberant early during development, before axonal arbors are refined by activity-dependent competitive mechanisms. Competition is generally considered to entail synapse destabilization and pruning mechanisms resulting from asynchronous activity between pre- and post-synaptic partners. In addition, theoretical predictions include non-competitive interactions between co-active neighboring axons to co-stabilize their connections. The demonstration of such interactions in a physiological context has been limited by the complexity of the experimental paradigms needed. Here we provide direct evidence that axonal arbors from neighboring retinal ganglion cells in the retina co-stabilize their branches. This co-stabilization influences axon pruning in the thalamus *via* a cAMP-dependent mechanism that does not affect spontaneous activity in the retina.

ONE SENTENCE SUMMARY

Neighboring retinal ganglion cells co-stabilize axonal arbors via RGC-specific cAMP signaling.

MAIN TEXT

Competitive mechanisms involving synapse stabilization and pruning underlie the development of neuronal connectivity in the nervous system. Co-active spines of a post-synaptic neuron are stabilized whereas spines with asynchronous activity are depressed (*1*, *2*). Since spontaneous activity of nearby developing neurons is synchronized in many regions of the brain, their co-activity is thought to stabilize their synaptic contacts and to oppose competitive mechanisms. This hypothesis has shaped the current model of neuronal circuit development. However, whether axons of co-active neurons influence each other during the refinement of their terminal arbor in physiological conditions lacks experimental confirmation. We provide here direct evidence that retinal ganglion cells (RGCs) from the same eye influence each other during the stabilization of their axonal branches *via* a cAMP-dependent mechanism that does not involve changes in the spontaneous activity of the developing retina.

Retinofugal projections are an exemplary model to investigate competitive mechanisms shaping neuronal connectivity. In mammals, axonal arbors of developing RGCs from both eyes first invade overlapping areas in the dorso-lateral geniculate nucleus (dLGN) before segregating in distinct territories (*3*–*6*). The refinement of

binocular maps requires competitive mechanisms relying on spontaneous waves of calcium elevation and electrical activity that propagate across the developing retina (*7*, *8*). Forcing the synchronization of electrical activity in both retinas reduces the pruning of RGC axons, supporting the hypothesis of competition between asynchronous neurons and/or stabilizing interactions between co-active neurons (*9*, *10*). The correlation of activity between neighboring RGCs has also been included as a critical component of retinal map development in computational simulations (*11*, *12*). This suggests that interactions between axons from adjacent RGCs in the retina contribute to the regulation of axon pruning.

The frequency of retinal waves is controlled by cAMP signaling and shapes binocular maps (*7*, *13*). However, the impact of this second messenger is not restricted to the regulation of retinal waves since knocking-out adenylyl cyclase 1 (AC1), a cAMP synthesizing enzyme, prevents the segregation of ipsilateral and contralateral territories (*14*, *15*) without altering spontaneous activity in the retina (*16*, *17*). The role of a cAMP pathway that does not impact the generation of retinal waves has not been elucidated.

A molecular approach termed Zaic (short for mosaic) was designed to determine the impact of altering cAMP signaling in a sparse population of RGCs on axonal development of their neighbors with intact cAMP signaling. Zaic enables the generation and tracing of two mutually exclusive but intermingled populations of cells. cAMP signaling is altered in one of these cellular populations (**Fig. 1A and Fig S1**) using Lyn-cAMP Sponge, a genetically-encoded cAMP scavenger restricted to lipid rafts that buffers cAMP in cell lines and RGCs (*18*, *19*). The strategy relies on a DNA construct that contains the CFP sequence (ending with a Stop codon) flanked by two LoxP sites, and followed by Lyn-cAMP Sponge fused to YFP by a self-cleaving 2A motif (SpongeZaic, **Fig. S1A**). Co-electroporating SpongeZaic with a low concentration of DNA encoding the Cre recombinase leads to two cellular populations expressing either CFP, with unaffected cAMP signals ($cAMP^{intact}$), or YFP together with Lyn-cAMP Sponge ($cAMP^{reduced}$) (**Fig. S1B**). A similar construct lacking Lyn-cAMP Sponge (ControlZaic) serves as a control. The Zaic strategy was first tested *in vitro*, in HEK293 cells and retinal explants from E14.5 mouse embryos. Lyn-cAMP Sponge expression was detected in Cre and SpongeZaic co-expressing cells, in contrast to cells lacking Cre expression, demonstrating that Cre recombinase is required to drive Lyn-cAMP Sponge expression (**Fig. S1, B to F**). The Zaic:Cre DNA ratio was optimized *in vitro* using retinal explants before proceeding further *in vivo* using 2 $\mu g \cdot \mu L^{-1}$ of the Zaic plasmids and 0.1 $\mu g \cdot \mu L^{-1}$ of Cre (**Fig. S1, C to F**).

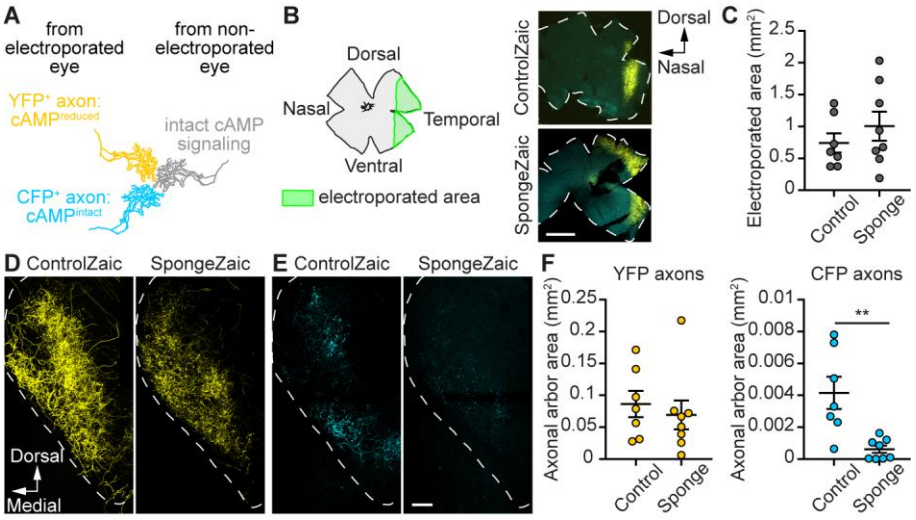


Fig. 1: cAMP-dependent interactions between neighboring RGCs during axon refinement. (A) The Zaic strategy leads to a mix of YFP-expressing neurons with reduced cAMP signaling ($cAMP^{reduced}$) and CFP-positive neuron with intact signaling ($cAMP^{intact}$) in the retina. This enables the tracing of RGC axons in the dLGN where they are intermingled with unlabeled axons from the same and the opposite eye. **(B)** *In utero* electroporation of the ventro-temporal retina was used to implement the Zaic strategy. Drawing shows the orientation of an isolated retina with the desired electroporation area indicated in green (left). Dashed lines delineate the contour of the retina (right). **(C)** The electroporated area in the retina is similar in ControlZaic and SpongeZaic conditions. **(D)** YFP- and **(E)** CFP-expressing axonal arbors in the contralateral dLGN of either ControlZaic or SpongeZaic electroporated P15 animals. Dashed lines delineate the ventro-medial contour of the dLGN. **(F)** The extent of the $cAMP^{intact}$ axonal arbors (CFP-positive) is diminished in SpongeZaic-electroporated animals. Scale bars, (**B)** 1 mm, **(D, E)** 50 µm. **(C, F)** Data are mean ± s.e.m. Values for individual animals are shown. ** $P < 0.01$; Mann-Whitney. Exact *P* values and number of replicates in Table S1.

We predicted that the need for interactions between neighboring RGCs would be strongest when they are in competition with axons from the other eye. To investigate the impact of cAMP manipulation in a few RGCs on the axonal arbor of their neighbors, SpongeZaic was electroporated *in utero* in the ventro-temporal embryonic retina (**Fig. 1, B and C**). In this area of the retina, RGCs projecting to the contralateral dLGN target regions close to the territory of the opposite eye. Electroporated axons were traced from the retina and the chiasm to the dLGN. The area covered by CFP- and by YFP-positive projections in the dLGN was analyzed at P15 after the refinement of axonal arbors (**Fig. 1, D to F**) using a user-independent machine learning-based segmentation method (**Fig. S2**).

In the contralateral dLGN, both CFP- and YFP-positive axons formed a dense termination zone in ControlZaic animals (**Fig. 1, D and E)**. The area covered by cAMP^{intact} axons was reduced in SpongeZaic animals (**Fig. 1, E and F**). This reduction does not reflect variations in the size of the electroporation in the retina (**Fig. 1, B and C**). The area covered by cAMP^{reduced} axons might also be reduced, although the variability of the dataset does not enable definitive conclusions (**Fig. 1, D and F)**. The results demonstrate that reducing cAMP signaling in a restricted number of retinal neurons (cAMP^{reduced}) affects the development of neighboring RGCs in which cAMP signals were not manipulated (cAMP^{intact}).

To investigate whether altering cAMP signaling in a few retinal neurons impacts the projections from the non-electroporated retina, the Zaic strategy was combined with tracing the complete projections of each eye using fluorescent cholera toxins. The area covered by the ipsilateral projections of the non-electroporated eye was enlarged in Lyn-cAMP Sponge-expressing animals **(Fig. S3)**, demonstrating that altering cAMP signaling in sparse neurons of one retina is sufficient to influence binocular competition.

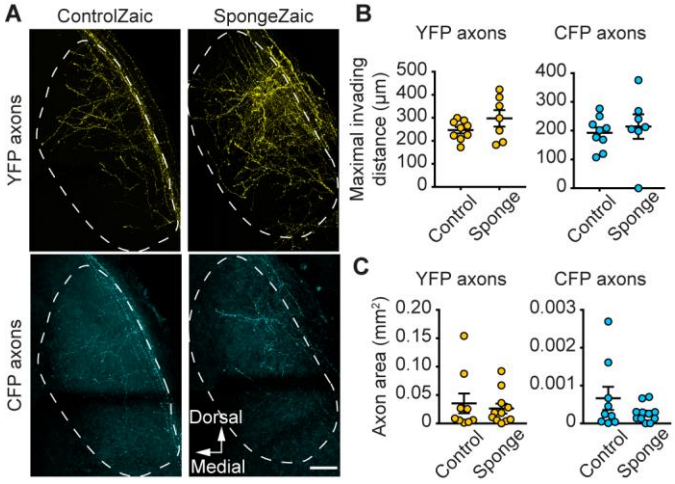


Fig. 2: cAMP signaling reduction in a few RGCs does not prevent retinal axons from reaching the dLGN. (A) cAMP^{intact} and cAMP^{reduced} retinal axons are found at P3 in the dLGN of SpongeZaic-electroporated animals with the same extent as the CFP- and YFP-expressing axons respectively after ControlZaic electroporation. Dashed lines delineate the contour of the dLGN. **(B)** The longest five axons have a similar length in the dLGN, regardless of their expression of Lyn-cAMP Sponge. **(C)** The area covered by axons is similar in SpongeZaic and ControlZaic animals, indicating that early development of retinal axons including pathfinding to their targets is not affected. Scale bar, 50 µm. Data are mean ± s.e.m. Values for individual animals are shown. Exact *P* values and number of replicates in Table S1.

The reduction in the size of cAMP^{intact} terminal arbors in SpongeZaic-electroporated animals might reflect abnormalities in early development of retinal projections (*e.g.* axon pathfinding) or later excessive pruning of retinal axons. To identify the affected developmental stage, E14.5 embryos were electroporated using the Zaic strategy and pups were harvested at P3, after retinal axons have reached the dLGN, but before eye-specific map refinement (*5*, *20*). SpongeZaic-electroporated axons invaded the dLGN to the same extent as their controls at P3 (**Fig. 2**), excluding a role of errors in axon pathfinding. The reduction of cAMP^{intact} arbors therefore arises during the pruning of RGC axons.

cAMP signaling in amacrine cells is essential for the modulation of patterned spontaneous activity in the retina and for the refinement of retinal projections (*21*). Since AC1 is not expressed in amacrine cells (*15*), the failure of binocular maps to refine in AC1-KO mice (*22*, *23*) must involve cAMP signaling in RGCs. To determine

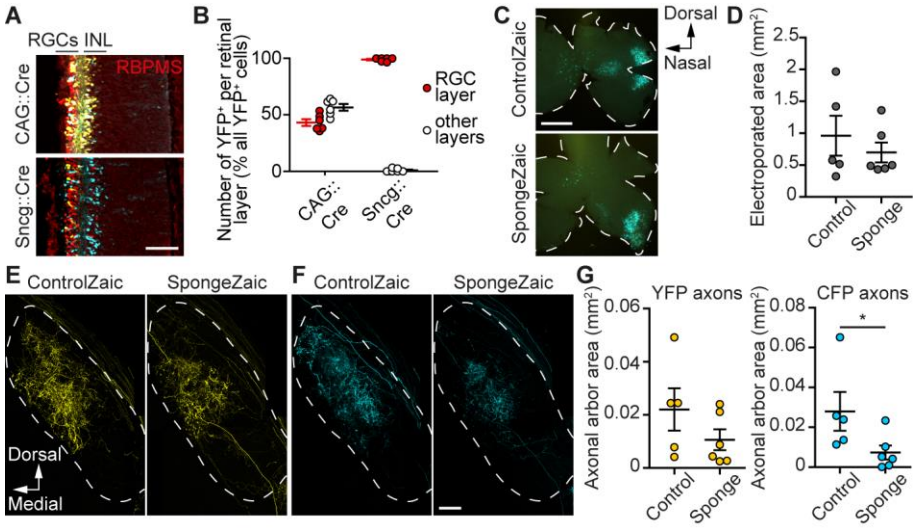


Fig. 3: Interactions between retinal axons rely on RGC-specific cAMP signaling. (A) Driving expression of the Cre recombinase by the RGC-specific Sncg promoter rather than the non-specific CAG promoter leads to the restriction of Lyn-cAMP Sponge and YFP to the RGC layer, labeled using a RBPMS antibody (red) at P3. **(B)** When Sncg::Cre is used, YFP-positive cells are found almost exclusively in the RGC layer but not in the inner nuclear layer (INL). **(C,D)** The area and location of the electroporation zone is similar in SpongeZaic- and ControlZaic-electroporated retinas (using Sncg::Cre). **(E-G)** Reducing cAMP signaling in a sparse population of RGCs leads to a reduction in the area covered by cAMP^{intact} axons (CFP-positive) in the dLGN at P15. Scale bars, **(A,E,F)** 50 µm, **(C)** 1 mm. Data are mean ± s.e.m. **(D,G)** Values for individual animals are shown. * $P < 0.05$; Mann-Whitney. Exact *P* values and number of replicates in Table S1.

the identity of the retinal cells requiring cAMP signaling for the stabilization of cAMP^{intact} axon branches, the non-specific CAG promoter used to drive Cre expression was replaced by the RGC-specific γ-synuclein (Sncg) promoter (*24*), preventing alteration of cAMP signaling in amacrine cells. The control of Cre expression by the Sncg promoter led to the restriction of YFP expression to the RGC layer, and to cells immunostained by the RGC marker RNA-binding protein with multiple splicing (RBPMS) (**Fig. 3, A and B**). The area covered by cAMP^{intact} axons in the dLGN was reduced at P15 compared to the ControlZaic-electroporated animals (**Fig. 3, C to G**). Like in CAG::Cre-electroporated mice, the area covered by cAMP^{reduced} axons might be diminished although the variability of the dataset does not enable definitive conclusions for this cellular population (**Fig. 3, E and G**). Overall, selectively reducing cAMP signaling in RGCs reproduces the phenotype observed when Lyn-cAMP Sponge is expressed throughout the retinal layers, demonstrating that the stabilization of retinal axon branches requires cAMP signaling in neighboring RGCs.

Spontaneous waves of electrical activity in the developing retina are modulated by cAMP signaling (*25*) and loss or desynchronization of activity leads to increased axon pruning (*7*, *20*). To evaluate whether sparse expression of Lyn-cAMP Sponge reduces the activity of cAMP^{intact} RGCs, calcium waves were monitored in P7-8 retinas (**Fig. 4, A to E, Fig. S4 and Movies S1 to S3**). Either the CAG or Sncg promoter was used to drive Lyn-cAMP Sponge expression. The frequency of retinal waves was not affected when Lyn-cAMP Sponge was expressed throughout the retinal layers and slightly diminished by RGC-specific expression of Lyn-cAMP Sponge (**Fig. 4D**). The cells in SpongeZaic retinas were more likely to be active during a calcium wave, regardless of their expression of Lyn-cAMP Sponge (**Fig. 4, C and E, Fig. S4 and Movies S1 to S3**). This increased participation did not cause an increase in the burst frequency (**Fig. 4F**), nor did it lead to a higher firing frequency or a higher number of action potentials within a burst for both cAMP^{reduced} and cAMP^{intact} neurons compared to their respective controls at P7-8 or P10-11 (**Fig. S5**). The reduction in the area of cAMP^{intact} arbors is therefore unlikely to be the consequence of changed electrical activity at the level of the retina.

Programmed cell death is another cellular process involved in the refinement of visual axons (*26*, *27*) and the lack of soluble adenylyl cyclase reduces RGC survival (*28*). To assess the role of developmental cell death in the interaction between RGCs, TUNEL staining was performed in Zaic-electroporated retinas at P3, the peak of developmental cell death (*29*). The proportion of TUNEL-positive cells among cAMP^{reduced} and cAMP^{intact} RGCs

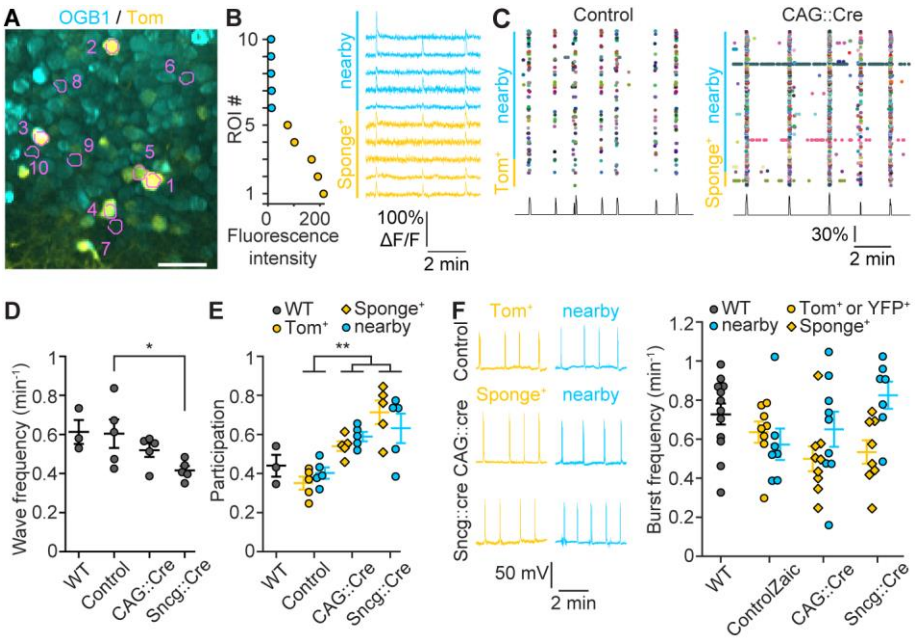


Fig. 4: Spontaneous activity of RGCs from SpongeZaic-electroporated retinas. (A) E14.5 retinas were electroporated *in utero* to express Lyn-cAMP sponge together with tdTomato (pseudo-color: yellow) to reduce spectral overlap of the fluorescent protein with the calcium indicator OGB1 (pseudo-color: cyan). Magenta contours delineate a subset of the ROIs used for quantifications. **(B)** tdTomato intensity, reflecting the expression of Lyn-cAMP Sponge expression (left), and OGB1 responses over time (right) of the ROIs shown in **(A)**. Lyn-cAMP Sponge expression does not prevent RGCs from participating in calcium waves. **(C)** Activity of 300 ROIs (raster plot, top) and participation in retinal waves (bottom). **(D)** The frequency of retinal waves is reduced when Lyn-cAMP Sponge expression is driven by Sncg::Cre but not CAG::Cre. **(E)** The participation rate of both $cAMP^{intact}$ and $cAMP^{reduced}$ neurons is increased. **(F)** Whole-cell recordings of retinal ganglion cells. Burst frequency of $cAMP^{intact}$ retinal cells in retinas expressing Lyn-cAMP Sponge was not reduced compared to controls (right). Control recordings are from retinas expressing either tdTomato or ControlZaic. In CAG::Cre and Sncg::Cre conditions, recordings were pooled from retinas expressing SpongeZaic and from retinas expressing the plasmid used for calcium imaging. Scale bar, 25 µm. Data are mean ± s.e.m. Values for individual retinas **(D, E)** or cells **(F)** are shown. * $P < 0.05$; post-hoc t-test. ** $P < 0.01$, Mixed-effects ANOVA. Exact *P* values and number of replicates in Table S1.

---

of SpongeZaic electroporated retinas did not differ from ControlZaic animals (**Fig. S6**), indicating that Lyn-cAMP Sponge expression does not impact cell death. Thus its influence on axonal arbors is independent of developmental cell death.

Overall, we demonstrated that interactions between neighboring RGCs influence the stabilization of their axonal branches during the pruning of their terminal arbor. This process occurs through a cAMP-dependent mechanism that is independent of effects on axon pathfinding, generation of spontaneous activity, or developmental cell death. The interactions between RGCs, direct or indirect via a postsynaptic neuron or glial cells, are either cooperative or competitive in nature (*30*). Altering cAMP signaling can preclude the genesis or the detection of a signal enabling the communication between neighboring RGCs. This yields four possibilities, each with specific experimental outcomes (**Fig. S7**). *(i)* If cAMP signaling is required for the emission of a co-stabilizing signal, one would expect a reduction of the $cAMP^{intact}$ arbors **(Fig. S7**), as observed in our experiments. *(ii)* In contrast, if cAMP is required for emission of a competitive signal, $cAMP^{intact}$ arbors are expected to expand. If cAMP is required to detect a *(iii)* co-stabilizing or *(iv)* competitive signal at $cAMP^{reduced}$ axons, one would anticipate the termination of $cAMP^{reduced}$ axons to be changed without affecting $cAMP^{intact}$ arbors. **(Fig. S7)**. None of these last possibilities is reflected in our results. We thus favor the explanation that cAMP signaling is required for the generation of a signal emitted by RGC axons that stabilizes the branches of their neighboring neurons in the retina.

In other systems, cAMP is involved in several processes of synaptic potentiation or depression and synapse maturation (*31*–*33*). Together with the observation that Hebbian mechanisms contribute to shaping the terminal arbor of RGCs (*10*), this suggests that interactions between retinal axons might rely on synaptic release, a mechanism required for the development of binocular maps (*34*, *35*). Since axon pruning coincides with waves of electrical activity and the expression of AC1 in many sensory systems during development (*36*–*38*), we anticipate that the cAMP-dependent interactions between presynaptic neurons is key for the development of connectivity throughout the nervous system.

REFERENCES AND NOTES

1. J. Winnubst, J. E. Cheyne, D. Niculescu, C. Lohmann, *Neuron*. **87**, 399–410 (2015).

2. S. El-Boustani *et al.*, *Science*. **360**, 1349–1354 (2018).

3. D. C. Linden, R. W. Guillery, J. Cucchiaro, *J. Comp. Neurol.* **203**, 189–211 (1981).

4. C. J. Shatz, *J. Neurosci.* **3**, 482–499 (1983).

5. P. Godement, J. Salaün, M. Imbert, *J. Comp. Neurol.* **230**, 552–575 (1984).

6. L. Jaubert-Miazza *et al.*, *Vis. Neurosci.* **22**, 661–676 (2005).

7. D. Stellwagen, C. J. Shatz, *Neuron*. **33**, 357–367 (2002).

8. L. Galli, L. Maffei, *Science*. **242**, 90–91 (1988).

9. J. Zhang, J. B. Ackman, H.-P. Xu, M. C. Crair, *Nat. Neurosci.* **15**, 298–307 (2012).

10. M. Munz *et al.*, *Science*. **344**, 904–909 (2014).

11. K. B. Godfrey, S. J. Eglen, N. V. Swindale, *PLoS Comput. Biol.* **5**, e1000600 (2009).

12. K. B. Godfrey, N. V. Swindale, *PLoS ONE*. **9**, e104670 (2014).

13. A. A. Penn, P. A. Riquelme, M. B. Feller, C. J. Shatz, *Science*. **279**, 2108–2112 (1998).

14. A. Ravary *et al.*, *J. Neurosci.* **23**, 2228–2238 (2003).

15. X. Nicol *et al.*, *Eur. J. Neurosci.* **24**, 3401–3414 (2006).

16. T. A. Dunn, D. R. Storm, M. B. Feller, *PLoS ONE*. **4**, e7877 (2009).

17. O. S. Dhande *et al.*, *J. Comp. Neurol.* **520**, 1562–1583 (2012).

18. K. Lefkimmiatis, M. P. Moyer, S. Curci, A. M. Hofer, *PLoS ONE*. **4**, e7649 (2009).

19. S. Averaimo *et al.*, *Nat Commun*. **7**, 12896 (2016).

20. A. D. Huberman, M. B. Feller, B. Chapman, *Annu. Rev. Neurosci.* **31**, 479–509 (2008).

21. Y.-T. Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **116**, 3262–3267 (2019).

22. X. Nicol, A. Muzerelle, J. P. Rio, C. Métin, P. Gaspar, *J. Neurosci.* **26**, 862–872 (2006).

23. X. Nicol *et al.*, *Nat. Neurosci.* **10**, 340–347 (2007).

24. A. Chaffiol *et al.*, *Mol. Ther.* **25**, 2546–2560 (2017).

25. D. Stellwagen, C. J. Shatz, M. B. Feller, *Neuron*. **24**, 673–685 (1999).

26. J. W. Fawcett, D. D. O'Leary, W. M. Cowan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 5589–5593 (1984).

27. D. D. O'Leary, J. W. Fawcett, W. M. Cowan, *J. Neurosci.* **6**, 3692–3705 (1986).

28. R. G. Corredor *et al.*, *J. Neurosci.* **32**, 7734–7744 (2012).

29. R. W. Young, *J. Comp. Neurol.* **229**, 362–373 (1984).

30. D. A. Arroyo, M. B. Feller, *Front Neural Circuits*. **10**, 54 (2016).

31. T. Iwasato *et al.*, *J. Neurosci.* **28**, 5931–5943 (2008).

32. H.-C. Lu *et al.*, *Nat. Neurosci.* **6**, 939–947 (2003).

33. H. Yasuda, A. L. Barth, D. Stellwagen, R. C. Malenka, *Nat. Neurosci.* **6**, 15–16 (2003).

34. S. M. Koch *et al.*, *Neuron*. **71**, 235–242 (2011).

35. A. Assali *et al.*, *Scientific Reports*. **7**, 3236 (2017).

36. X. Nicol, A. Muzerelle, I. Bachy, A. Ravary, P. Gaspar, *J. Comp. Neurol.* **486**, 281–294 (2005).

37. N. Yamamoto, G. López- Bendito, *Eur. J. Neurosci.* **35**, 1595–1604 (2012).

38. X. Nicol, P. Gaspar, *Eur. J. Neurosci.* **39**, 1742–51 (2014).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Jean Livet for helping in designing the Zaic strategy, to Nicholas Spitzer and Patricia Gaspar for helpful comments and proofreading the manuscript, to members of our labs and of J. Livet lab for thoughtful discussions, to Corentin Joffrois and Serge Picaud for access to a patch-clamp electrophysiology setup, and to the members of the animal and imaging facilities of Institut de la Vision.

FUNDING

This work was supported by grants from ANR (ANR-15-CE16-0007-01), UNADEV (17UU1166-00) and Sorbonne Université (FCS-SU IDEX SUPER SU-15-R-PERSU-17) to X.N. This work was performed in the framework of the LABEX LIFESENSES (ANR-10-LABX-65) and IHU FOReSIGHT (ANR-18-IAHU-0001) supported by French state funds managed by the Agence Nationale de la

Recherche within the Investissements d'Avenir program. A.L. was supported by a fellowship from the ED3C doctoral program (Sorbonne Université).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AL, MCS and XN designed the experiments. AL, SC, FR and YZ performed molecular biology experiments. AL performed axon morphology experiments and analysis. AA contributed to axon morphology experiments. FR performed *ex vivo* experiments and analysis. MCS performed experiments and analysis for electrophysiology recordings. MCS and AC performed and analyzed 2-photon calcium imaging. AL and MN performed cell death experiments and analysis. AL wrote the initial draft. AL, MCS and XN prepared the manuscript.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

DATA AND MATERIAL AVAILABILITY

All data needed to evaluate the conclusions in the paper are available in the manuscript or the supplementary materials.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Materials and Methods

Figs S1 to S7

Tables S1 and S2

Supplementary References

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Material & Methods

Animals

Timed-pregnant Swiss and C57BL/6NRj mice were purchased from Janvier Labs. All animal procedures were performed in accordance with institutional guidelines and approved by local ethics committees (C2EA-05: Comité d'éthique en expérimentation animale Charles Darwin). Animals were housed under 12h light / 12h dark cycle. Embryos from dated matings (developmental stage stated in each section describing individual experiments) and were sexed at the end of the experiments. The female to male ratio was close to 1.

Plasmids

All constructs used, except Sncg::Cre, were subcloned into a pCAG variant backbone and the Lyn-cAMP Sponge was previously described (*1*). The ControlZaic plasmid was obtained using a CFP variant mTurquoise2 flanked by two LoxP sites and followed by YFP. The SpongeZaic plasmid was obtained using a CFP variant mTurquoise2 flanked by two LoxP sites, attached to a Lyn-cAMP Sponge sequence fused to a YFP sequence by a self-cleaving 2A sequence (GGA-AGC-GGA-GCT-ACT-AAC-TTC-AGC-CTG-CTG-AAG-CAG-GCT-GGA-GAC-GTG-GAG-GAG-AAC-CCT-GGA-CCT). The SpongeZaic sequence was synthesized by Genscript and subloned into the pCAG vector. Lox-STOP-Lox Lyn-cAMP Sponge-2A-tdTomato was obtained by replacing the Turquoise2 sequence by its reverse complement and YFP by tdTomato. Further excision of the Lyn-cAMP Sponge sequence led to Lox-STOP-Lox-tdTomato. The CAG::Cre was a kind gift from Jean Livet. The Sncg promoter was provided by Deniz Dalkara (*2*). To obtain the Sncg::Cre, the CAG promoter was replaced by the Sncg promoter followed by a multiple cloning site. Subsequently, the Cre sequence was inserted into the multiple cloning site.

Western-Blot analysis

HEK293T cells were transfected with various expression vectors using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's protocol (ThermoFisher). After 48h, total cellular proteins were extracted in lysis buffer (10 mM HEPES pH 7, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.5% NP-40) supplemented with protease inhibitor cocktail and phosphatase inhibitor cocktail 1 and 3 (Sigma-Aldrich). For immunoblotting, samples were separated on 4-15% Mini-Protean TGX Tris-Glycine-buffer SDS-PAGE and transferred onto 0.2 µm Trans-Blot Turbo nitrocellulose membranes (both Biorad). Membranes were blocked for 1h at room temperature (RT) in 1X TBS (10 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl,) supplemented with 5% (w/v) dried skim milk powder. Primary antibody incubation was carried out overnight at 4°C, with rabbit anti-PKA1β antibody (SC-907; Santa Cruz). A goat anti-rabbit HRP coupled secondary antibody was used for detection (Jackson ImmunoResearch, Wesrt Grove, PA). In between and after antibody incubations, membranes were extensively washed in TBS-T (TBS containing 2.5% Tween-20). Western blots were visualized using the enhanced chemiluminescence method (ECL prime Western Blotting detection reagent, Amersham).

HEK293 cell transfection

HEK293T cells were kept at 37°C, 5% CO_2 incubator. Lipocomplexes were formed using Lipofectamine 2000 in accordance with the manufacturer's instructions (ThermoFisher). The following plasmids were used for transfection: ControlZaic 100 ng; pCAG-Cre 0 ng, 1 ng, 10 ng, 100 ng. Lipofectamine 2000 transfection reagent diluted in serum-free Opti-MEM media (ThermoFisher) was left at RT for 5 minutes, then added to the plasmids diluted in Opti-MEM at a lipid:DNA ratio of 2:1, mixed by gentle pipetting, and incubated at RT for 20 min. After forming the lipocomplexes, they were delivered to the media above the cells to deliver 0.15 $\mu g \cdot cm^{-2}$ of DNA. The complexes remained in contact with the cells overnight. The cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) 15

minutes at RT. The cells were finally washed in PBS and mounted in Mowiol (Sigma). Images were acquired under a 40x objective using an epifluorescence microscope (Leica DMI6000B).

***Ex vivo* retinal electroporation**

E14.5 embryos were isolated and kept in cold PBS. Embryos were decapitated and DNA was injected subretinally using an elongated borosilicate glass capillary (Harvard Apparatus). The following plasmids were used: ControlZaic 2 $\mu g \cdot \mu L^{-1}$; pCAG-Cre 0 $\mu g \cdot \mu L^{-1}$, 0.1 $\mu g \cdot \mu L^{-1}$, 0.5 $\mu g \cdot \mu L^{-1}$, 2 $\mu g \cdot \mu L^{-1}$. The success of DNA injection was assessed using 0.05% fast green supplemented to the DNA solution. The paddles of the electrodes (CUY650P5, Sonidel) were placed at the bottom and at the top of the head respectively. Two poring pulses (square wave, 175V, 5ms duration, with 50ms interval) followed by four transfer pulses (40 V, 50 ms and 950 ms interpulse) were applied. The protocol was repeated with inverted polarities. After electroporation, the retinas were isolated and kept 24 hours in culture medium (DMEM-F12 supplemented with 1mM glutamine (Sigma Aldrich), 1% penicillin/streptomicin (Sigma Aldrich), 0.01% BSA (Sigma Aldrich), 0.07% glucose), in a humidified incubator at 37°C and 5% CO_2. Retinas were dissected, fixed in 4% PFA for 15 minutes and mounted in Mowiol. Images were acquired under a 40X objective using a confocal microscope (Olympus FV1000).

***In utero* retinal electroporation**

Timed-pregnant mice (Janvier Labs) were delivered to the animal facility a week prior to the surgery in order to allow a minimum of 5 days adaptation. *In utero* electroporation (*IU*E) has been performed as previously described (*3*). In brief, C57BL/6NRj pregnant mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of a Xylazine/Ketamine mix (10 $mg \cdot kg^{-1}$ and 100 $mg \cdot kg^{-1}$, respectively) and a subcutaneous injection of buprenorphine (0.0125 $mg \cdot kg^{-1}$) was made pre-surgery for analgesia. Midline laparotomy was performed, exposing uterine horns and allowing visualization of embryos. Left eye of E14.5 embryos was injected using an elongated glass capillary (Harvard apparatus) with different plasmid solutions. The success of DNA injection was assessed using 0.07% fast green supplemented to the DNA solution. The eye was then electroporated with 5 pulses of 45 V during 50 ms every 950 ms (Nepagene electroporator). In order to electroporate the ventro-temporal end of the retina, the negative electrode (CUY650P2, Sonidel) was positioned on the ventro-temporal part of the injected eye and the positive electrode on the opposite side of the head. To target the central part of the retina, the positive electrode (CUY650P5, Sonidel) was placed on the side of the injected eye. Following surgery, the incision site was sutured (4-0, Ethicon), and mice were allowed to give birth. To increase the survival of the electroporated pups, a Swiss adopting mouse was housed together with the mouse that underwent surgery. The Swiss mouse, mated a day earlier than the C57BL/6NRj mice, gave birth one day earlier. At P0, only 2 Swiss pups were left in the cage so that the electroporated pups were adopted by the Swiss mouse.

Morphological analysis

P3 or P15 mice were deeply anesthetized with a mix of Xylazine/Ketamine (20 $mg \cdot kg^{-1}$ and 200 $mg \cdot kg^{-1}$, respectively), perfused transcardially with 4% PFA in 0.12 M phosphate buffer (PB). Retinas, optic chiasms and brains were dissected out and postfixed in 4% PFA. Retinas (oriented with an incision on the ventral part) and chiasms were mounted in Mowiol. Brains were cryoprotected with 30% sucrose in PB during 2 days and sectioned at 80 µm thickness on a freezing microtome (Thermoscientific HM450). Brains sections were mounted in Mowiol. To validate the area of electroporation, retinas were imaged under a 2.5X objective using an epifluorescence microscope (Leica DMI6000B). In order to quantify the number of electroporated axons, optic chiasms were imaged under using a confocal microscope (Olympus FV1000; 20X objective, N.A. 0.85). Electroporated brain sections were imaged under a confocal microscope (Olympus FV1000; 40X objective, N.A. 1.3).

Plasmids electroporated.

The plasmids used are summarized in Table S2.

Axon area analysis

Axon density analysis was performed on 40x confocal images from all the coronal sections containing the dLGN contralateral to the electroporated eye. Z-stack images of axons were segmented using a machine-learning based plugin of Fiji: **Trainable Weka Segmentation** plugin (*4*). Briefly the algorithm was manually trained for several rounds with a set of images using the default settings of the Weka plugin. The robustness of the training was confirmed on a different set of images. Once stabilized, the segmentation process was applied to all quantified images. After segmentation, axons expressing both YFP and CFP were excluded from the CFP segmented image, in order to obtain a 'CFPOnly' stack of images **(Fig. S2)**. A region of interest (ROI) was manually drawn around the patch of axons, and the area covered by axons inside this ROI was measured on the maximal projection of the segmented stacks of YFP and 'CFPOnly' axons. Axon area was summed on all the coronal slices of the dLGN.

Anterograde tracing

In utero electroporated pups were anesthetized at P13 with an intraperitoneal injection of a Xylazine/Ketamine mix (10 $mg \cdot kg^{-1}$ and 100 $mg \cdot kg^{-1}$, respectively), and oxybuprocaine (4 $mg \cdot mL^{-1}$) was used for local analgesia. They were injected with a Nanofil syringe intravitreally with 2 µL of cholera toxin subunit β (ThermoFisher) conjugated to AlexaFluor-647 (left eye) or 594 (right eye) diluted in 1% DMSO. P15 mice were perfused transcardially with 4% PFA in 0.12M phosphate buffer (PB). Brain sections were imaged under a confocal microscope (Olympus FV1000; 10x objective, N.A. 0.4).

Analysis of the distribution of ipsilateral and contralateral fibers in the dLGN

Quantifications were performed on 10X confocal images from the 3 consecutive coronal sections containing the greatest extent of the ipsilateral territory. Using ImageJ software, the boundary of the dLGN was outlined, excluding the intrageniculate leaflet, the vLGN and the optic tract. The proportion of ipsilateral projections within the dLGN was measured as a ratio of ipsilateral pixels to the total number of pixels in the dLGN. The area of ipsilateral projections was summed over the 3 largest consecutive coronal sections of the dLGN.

Analysis of maximal invading distance

The maximal distance to which axons invade the dLGN of P3 electroporated mice was measured on 40X confocal images. Axon length was measured on the five longest axons on three consecutive coronal sections containing the greatest quantity of retinal axons.

Retina slicing and immunostaining

Electroporated eyes of P3 mice were dissected out, immersed overnight in 4% PFA in PB, then cryoprotected in gelatin-sucrose. Eyes were frozen at -40°C in propanol, then sectioned at 20 µm using a cryostat (Leica CM3050S). Slices were permeabilized and blocked with PBS gelatin-sucrose (PBSGT), then incubated with antibodies against RBPMS (RNA-binding protein with multiple splicing, Phosphosolutions, lot #NB317a) followed by a secondary antibody coupled to AlexaFluor-647 (Jackson, lot #129486).

Two-photon calcium imaging

For the calcium imaging experiment the central retina was targeted during *in utero* electroporation. Mice were taken at P7-8. The pup was rapidly decapitated, the left eye removed and placed in Ringer's medium containing (in mM): 119 NaCl, 2.5 KCl, 1.0 KH_2PO_4, 11 glucose, 26.2 $NaHCO_3$, 2 $CaCl_2$ and 1 $MgCl_2$ (290-295 mOsm), bubbled with carbogen (95% O_2/5% CO_2). The retina was carefully dissected and fixed on filter paper (N8895, Sigma-Aldrich) with the retinal ganglion layer upwards. The chamber containing the retina was placed in custom-made two-photon setup where it was perfused continuously with Ringer's solution. Widefield fluorescence was

observed to select a suitable area with a high number of fluorescent RGCs. This area was loaded for 1h at RT with Oregon Green BAPTA-1-AM (OGB1, 1 mM, O6807, ThermoFisher) following the multi-cell bolus loading technique (*5*). Calcium waves were imaged at 32-34°C. A pulsed femtosecond laser (InSight DeepSee; Newport Corporation) was set to 920 nm for OGB1 and to 1050 nm for tdTomato. Imaging was performed with a 25x objective (XLPLN25xWMP/NA1.05, Olympus) and captured by a PMT (Hamamatsu, DP-Type Socket assembly, C12597-01). To suppress tdTomato fluorescence during calcium imaging we used a Chroma filter (ET535/50) placed before the PMT. The field of view was 0.5x0.5 or 0.25x0.25 mm with a lateral resolution of 0.75 or 1 pixel/µm. Acquisition rates ranged from 0.9 Hz to 3.6 Hz. Multiple 15-30 minutes movies were captured. After each movie the retina was allowed to recover for 30 minutes.

Calcium imaging analysis

The OGB fluorescence movie $Y_{i,j,t}$ and a tdTomato fluorescence image were imported into Matlab R2016a (MathWorks). The tdTomato image was visually aligned to Y (rigid transformation).

Defining ROIs

Centers of ROIs were defined by the user by viewing the overlay of the tdTomato image and the standard deviation time projection of $Y_{i,j,t}$. Pixels within 4 µm from the center were included in the initial ROI unless these pixels were already assigned to another ROI. In a few cases when variations in OGB signals were not sufficient to define the center of the cell, ROIs were defined based on the tdTomato image. A threshold value was defined by the median + 0.2*(maximum - median) of the tdTomato image after a 2D Gaussian smoothing kernel (SD = 5 µm). Any pixels above this threshold connected to the defined center would be part of the initial ROI.

Subsequently, the spatial and temporal components were initialized following the Greedy Initialization as described by Pnevmatikakis *et al*. (*6*). In brief, $Y_{i,j,t}$ was Gaussian-blurred (2D, SD = 2 µm), subtracted by a pixel-based median, and averaged over the ROI pixels to obtain the initial temporal component. This was followed by the fine-tuning step of Greedy Initialization to adjust the spatial and temporal components of the ROI. Pixels were excluded when their spatial component value was below 0.7*median intensity of all spatial component values. Finally, spatial and temporal components of the ROIs were updated following Pnevmatikakis *et al*. (*6*). Any ROI < 12.5 μm^2 or <16 pixels was excluded.

ROIs were classified as either tdTomato positive or negative as follows. Mean intensity of tdTomato fluorescence was calculated for each ROI. Based on the average intensity and the SD of ROIs below the 80^{th} percentile an intensity threshold was calculated as mean intensity + 6*SD. ROIs with at least 70% of its pixels and an average tdTomato intensity above this threshold were identified as tdTomato-positive ROIs.

Activity of the ROIs

By multiplying the spatial and temporal component of a ROI we obtained its background-subtracted fluorescence trace. From this trace we calculated ΔF/F by $(Y_t - Y_{median})/ Y_{median}$, and ΔF/F was detrended by subtracting a 3 minutes moving median. At first, we defined the 'active' timepoints when ΔF/F > 0.2. However, this causes ROIs with low median intensities to cross the threshold very often. To avoid this, we made the threshold dependent on the $Y_{i,j,t}$ of the ROI. The 3 minutes moving median of $Y_{ROI,t}$ ($Ymed_{ROI,t}$) was calculated. The activity threshold was calculated as max(0.2, 0.4 – $Ymed_{ROI,t}$ /1250) and ROIs were considered active when both ΔF/F > the activity threshold and $Ymed_{ROI,t}$ > 20. ROIs that had an active period >30s were excluded from the analysis.

Defining waves

Waves were detected when >5% of the ROIs that are active in the movie were active simultaneously. The start and end of a wave was defined as the time point that 4% threshold was reached before and after crossing the 5% threshold. To define the wave area, a convex hull was drawn for every time point around active ROIs within the wave with a centroid-centroid distance <50 µm. The final wave area was the total area covered by the individual hulls. To calculate the participation, the number of active ROIs within the wave area was divided by the total number of ROIs with at least 1 pixel in the wave area.

Whole-cell electrophysiology

The retina was isolated as described for the two-photon calcium imaging experiments and left to recover for at least 1h. Widefield RGC fluorescence was checked using a Leica EL6000, Leica filter cubes L5 for GFP, N3 for tdTomato, and Chroma EYFP filter cube (49003), and a Hamamatsu ORCA-ER camera. An area with a high number of fluorescent RGCs was selected. Thick-walled borosilicate pipettes (OD/ID of 1.5/0.87 mm; 30-0060, Harvard Apparatus) were pulled on a P-1000 Flaming/Brown puller (Sutter Instruments). Pipettes were filled with intracellular solution containing (in mM): 128 K-gluconate, 10 HEPES, 16 KCl, 1 EGTA, 2 Mg-ATP, 0.5 Na_2-GTP, pH 7.25 with KOH (275 mOsm). In some recordings 10-20 µM Alexa Fluor 488 or 594 hydrazide (A10436, A10438, ThermoFisher) was added to the pipette solution to validate the recorded cells. Reported potentials were corrected for a liquid junction potential of -11 mV. A pipette with tip resistance of 4-6 MΩ was gently pushed through the inner limiting membrane with the pipette solution pressurized to keep the tip clean. Fluorescent cells and surrounding, non-fluorescent cells in the retinal ganglion layer were targeted. Whole-cell recordings were made with a Multiclamp 700B amplifier (Axon Instruments), filtered at 10 kHz and digitized at 25 kHz using a DigiData 1440A (Axon Instruments) and Clampex 10.7 running on Windows 10. High-resistance patch seals (>1 GΩ) were obtained before breaking into the cell. Recordings with a series resistance above 50 MΩ were discarded. The resting membrane potential of the cell was recorded in the first minute after breaking in. Cells with a membrane potential >-45 mV were discarded. Passive cell properties were recorded by stepping from -70 to -80 mV in voltage-clamp mode. In current-clamp mode series resistance (10-50 MΩ) and pipette capacitance (6.2-7.1 pF) were fully compensated. RGC responses to square current injections were recorded. The amplitude of first current injection was adjusted to hyperpolarize the cell to -100 mV. Steps of current were then injected until reaching the AP threshold. Cells that did not fire APs were discarded. Lastly, 15-30 minutes of spontaneous activity were recorded. During the recording, fluorescence was checked to categorize the cell as positive or negative for fluorescence of YFP or tdTomato, depending on the plasmid construct that was electroporated.

Recordings were imported into Matlab R2016a. Action potentials (APs) were detected in the 15-30 minutes recordings by threshold crossing at -25 mV. Bursts were defined as >2 AP within 0.5 s. Cells with less than four bursts were discarded.

TUNEL staining and analysis

P3 wild-type or electroporated retinas were dissected out and postfixed 1h with 4% PFA in PB. Developmental cell death was assessed on whole retinas using TUNEL staining, in accordance with the manufacturer's instructions (ThermoFisher). Slices were mounted in Mowiol then imaged using a confocal microscope (Olympus FV1000; 40X objective, N.A. 1.3) and the number of TUNEL-positive cells was manually counted.

Statistics

No data were excluded from the analysis, except where indicated otherwise (see whole cell electrophysiology). No sample size calculation was performed. Non-parametric (Mann-Whitney and Kruskal-Wallis) tests were calculated using GraphPad Prism (GraphPad software Inc.). Analyses of variance were done with R (v3.5.2). Linear mixed-effects regression was done to account for the nested structure of ROI's participation in retinas by

using the R package *lme4*. Post-hoc contrasts were corrected following Bonferroni and are indicated as *P'*. Table S1 summarizes the *P* values and number of replicates for all the data.

Supplementary figures

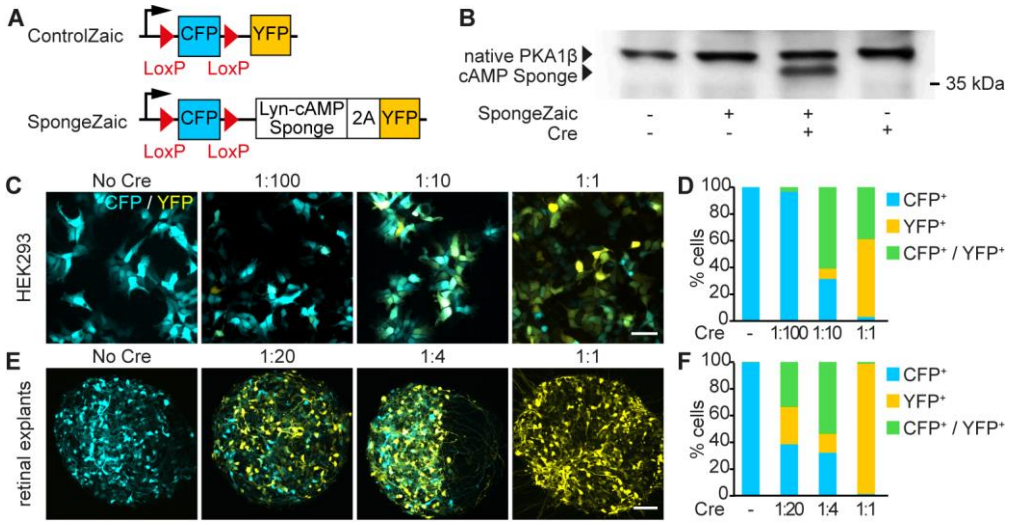


Figure S1: Validation of the Zaic strategy. (A) ControlZaic is a CFP sequence flanked with LoxP sites, linked to a YFP sequence. In SpongeZaic, Lyn-cAMP Sponge is fused to YFP by a 2A sequence. **(B)** Upon Cre recombination, CFP is excised and YFP (and Lyn-cAMP Sponge in the case of SpongeZaic) is expressed. Lyn-cAMP Sponge is detected using a PKA1β antibody. The endogenous PKA1β is detected as a heavier band than Lyn-cAMP Sponge. **(C, D)** HEK293 transfections with increasing levels of Cre exhibit an increasing number of YFP-positive cells and a reduction of CFP-expressing cells. . **(E, F)** *Ex vivo* retinal electroporations with increasing levels of Cre exhibit an increasing number of YFP-expressing cells. 2 $\mu g \cdot \mu L^{-1}$ of ControlZaic and 0.1 $\mu g \cdot \mu L^{-1}$ of Cre led to a mosaic of the CFP- and YFP-positive populations, and created the lowest amount of cells expressing together CFP and YFP. This ratio was chosen to proceed further *in vivo*. Scale bars, 50 µm. Number of replicates in Table S1.

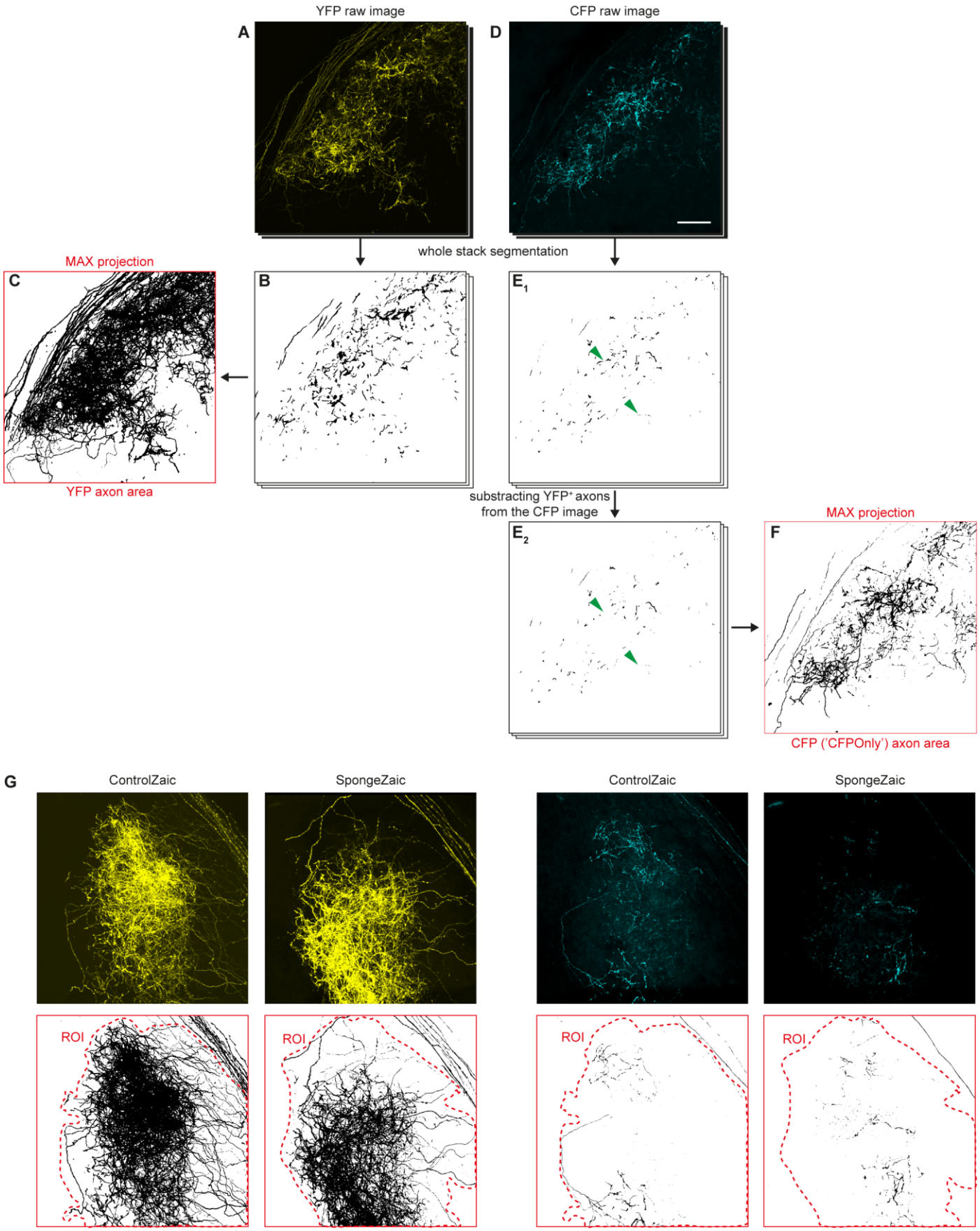


Figure S2: Axon area quantification method. (A) Confocal images of the YFP-expressing axons in

the dLGN are **(B)** segmented using Weka trainable segmentation, a machine learning-based plugin of Fiji and **(C)** maximal projection is computed. **(D)** Confocal images of CFP-positive axons are **(E_1)** segmented using Weka trainable segmentation. **(E_2)** The YFP segmented stack of images is substracted from the CFP segmented stack to generate a stack of images of the CFP axons that do not express YFP. **(F)** Maximal projection of the segmented 'CFPOnly' axons is computed. Measurements of the area covered by YFP or CFP axons are performed on the images surrounded in red: maximal projections of segmented YFP images **(C)** and 'CFPOnly' axons **(F)**. **(G)** Example images of measured segmented stacks for YFP and CFP-positive axons. Dashed red lines correspond to the ROI used to measure the area covered by axonal arbors while excluding the optic tract. Scale bar: 50 µm.

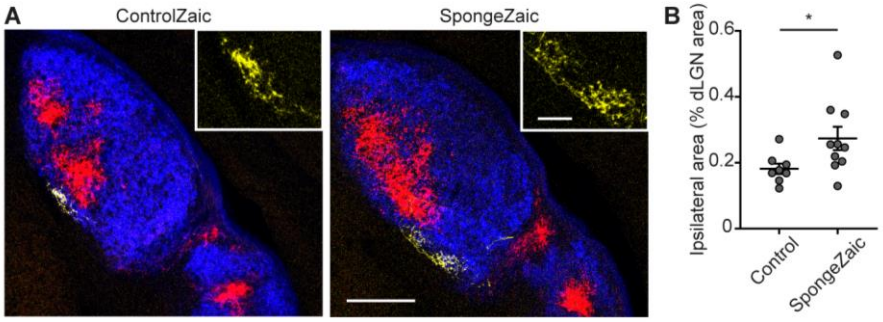


Figure S3: Altering cAMP signaling in sparse RGCs affects the overall development of binocular maps. (A, B) In the dLGN contralateral to the electroporated eye, the ipsilateral territory (red, from the non-electroporated retina) is enlarged in Lyn-cAMP Sponge-expressing P15 animals. The electroporated YFP-positive axons (inset) are found in the contralateral territory. Scale bar, **(A)** 200µm, (inset) 50µm. **(B)** Data are mean ± s.e.m. Values for individual animals are shown. * $P < 0.05$; Mann-Whitney. Exact *P* values and number of replicates in Table S1.

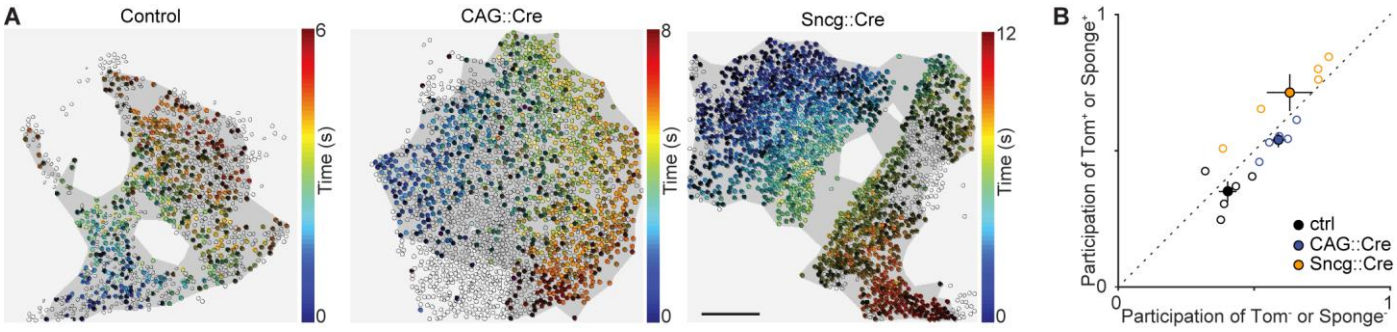


Figure S4: RGCs from Zaic-electroporated retinas are more often active during a calcium wave. **(A)** Example of spontaneous calcium waves from a control retina (left), from a retina expressing lox-STOP-lox Lyn-cAMP Sponge-2A-tdTom together with the CAG::Cre plasmid (middle), and from a retina expressing lox-STOP-lox Lyn-cAMP Sponge-2A-tdTom together with the Sncg::Cre plasmid (right). The field of view is shown for each retina with the time points of activity of ROIs coded in color. The darker grey area shows the area covered by this wave. Open contours indicate ROIs that were not active in this wave. Due to the curvature in the retina some parts of the RGC layer are out of focus. **(B)** Participation of ROIs with expression of tdTomato alone (control) or together with Lyn-cAMP Sponge versus participation from the nearby cells without expression of tdTomato and Lyn-cAMP Sponge. Open circle represents an individual retina, closed circle represents the average and the s.e.m. are also shown. Dotted line indicates y=x. The raw data are the same as in Fig. 4E. Scale bar 100 µm. Number of replicates in Table S1.

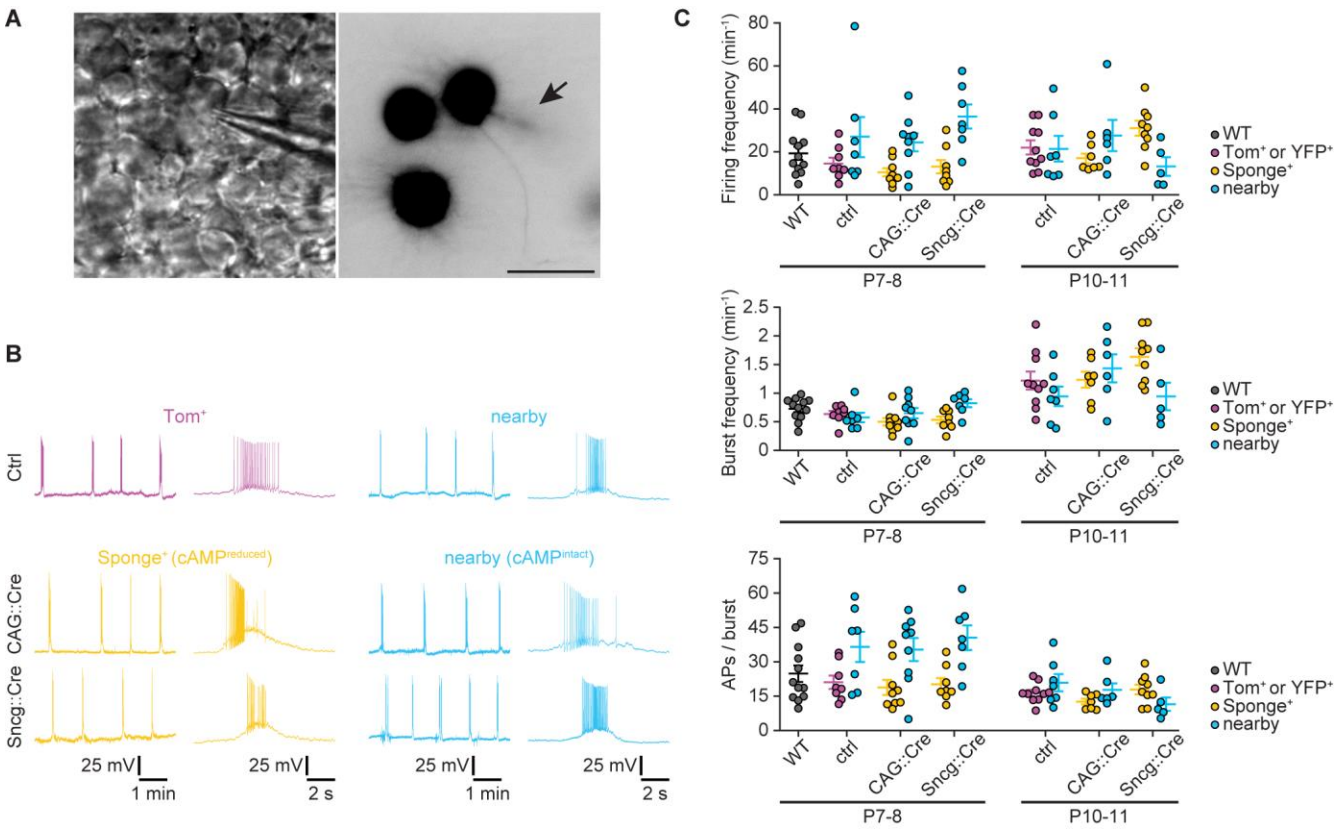


Figure S5: Bursting activity of retinal cells is not affected by Lyn-cAMP Sponge (A) Whole-cell recordings were made from retinal cells with a fluorescent protein and nearby cells. Infrared image with the patch electrode on a tdTomato-positive cell (left). tdTomato fluorescence-image corresponding to the infrared image (right). Notice that tdTomato is diffusing into the patch pipette, indicating a successful recording (arrow). **(B)** Examples of current-clamp recordings. **(C)** Scatter plots for burst frequency, average firing frequency, and number of APs per burst for P7-8 and P10-11. Each marker corresponds to a cell, averages are shown with s.e.m. Scale bar, 25 µm. Exact *P* values and number of replicates are provided in Table S1.

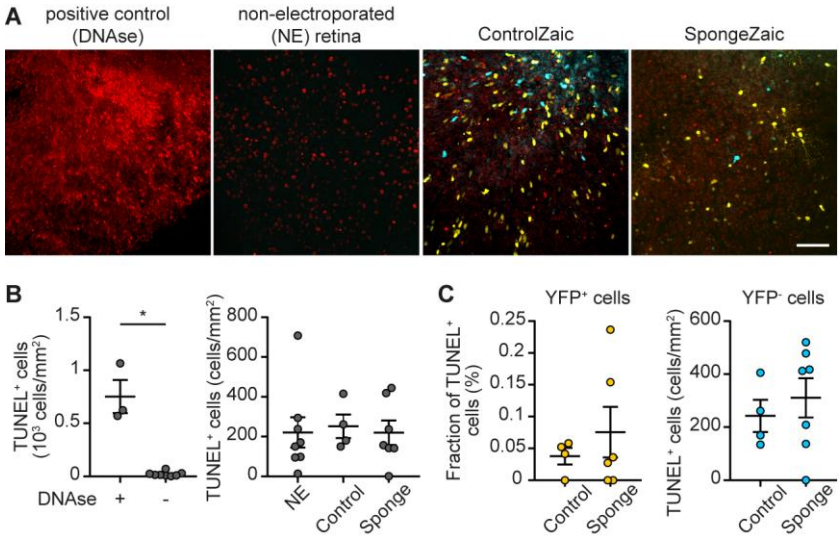


Figure S6: Developmental cell death is not altered in Zaic-electroporated retina. Retinal cells undergoing cell death were TUNEL stained in whole mount P3 retinas., **(A, B)** Treatment of non-electroporated retina with DNAse as a positive control leads to a high density of TUNEL-positive cells, in contrast to retina from either non-electroporated animals, ControlZaic or SpongeZaic-electroporated pups. Lyn-cAMP Sponge expression does not impact the overall number of TUNEL-positive cells. **(A, C)** Neither the proportion of TUNEL-labeled cells among YFP-positive neurons, nor the number of YFP-negative neurons undergoing cell death was affected by Lyn-cAMP Sponge expression. Scale bar, 50 µm. * $P < 0.05$; Mann-Whitney. Exact *P* values and number of replicates are provided in Table S1.

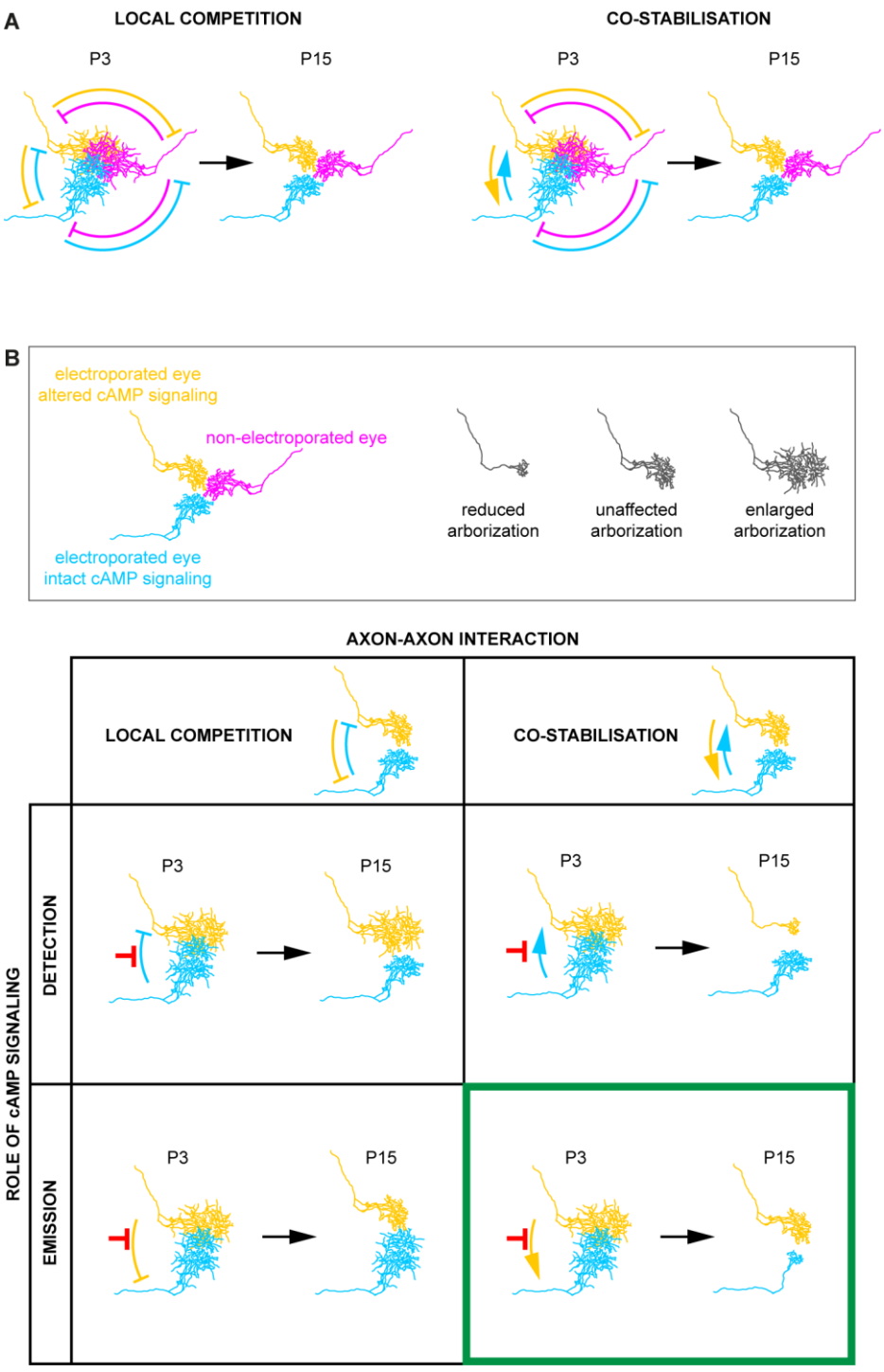


Figure S7: Model of interaction between axons from the same eye. (A) Axons coming from each eye compete with each other in the dLGN during the pruning of exuberant branches between P3 and P15. Interactions between axons can be of competitive or cooperative nature (left vs right), and **(B)** cAMP can be required for emitting or detecting the signal required for the interactions. Predictions drawn in the hypothesis of the requirement of cAMP for the modulation (emission or detection) of a competitive signal (**B**, top- and bottom-left hypotheses), or for the detection of a stabilizing signal (**B**, top right hypothesis),

do not reproduce the phenotype observed in SpongeZaic-electroporated animals. In contrast, if cAMP is involved in emitting a stabilizing signal, cAMP buffering in the yellow axons would lead to a reduction of the neighboring cyan axons with intact cAMP signaling. The reduced area is likely invaded, at least partially, by the projection from the other eye (not shown). This model matches our observations (green box).

Table S1: Statistics and number of replicates

Figure panel	**Number of replicates**	**P values**
Fig. 1C	ControlZaic, n = 7 animals from 3 litters; SpongeZaic, n = 8 animals from 4 litters.	Mann-Whitney *P* = 0.37, U = 20
Fig. 1F	ControlZaic, n = 7 animals from 3 litters; SpongeZaic, n = 8 animals from 4 litters.	YFP axons, Mann-Whitney *P* = 0.37, U = 20 CFP axons, Mann-Whitney *P* = 0.0037, U = 4
Fig. 2B	ControlZaic, n = 9 animals from 4 litters; SpongeZaic, n = 7 animals from 4 litters.	YFP axons, Mann-Whitney *P* = 0.351, U = 22 CFP axons, Mann-Whitney *P* = 0.47, U = 24
Fig. 2C	ControlZaic, n = 9 animals from 4 litters; SpongeZaic, n = 11 animals from 6 litters.	YFP axons, Mann-Whitney *P* = 0.824, U = 46 CFP axons, Mann-Whitney *P* = 0.603, U = 42
Fig. 3B	CAG::Cre, n = 4 animals from 1 litter; Sncg::Cre, n = 3 animals from 2 litters.	
Fig. 3D	ControlZaic, n = 5 animals from 2 litters; SpongeZaic, n = 6 animals from 2 litters.	Mann-Whitney *P* = 0.429, U = 10
Fig. 3G	ControlZaic, n = 5 animals from 2 litters; SpongeZaic, n = 6 animals from 2 litters.	YFP axons, Mann-Whitney *P* = 0.178, U = 7 CFP axons, Mann-Whitney *P* = 0.0173, U = 2

Fig. 4D	WT: n = 3 Ctrl: n = 5 CAG::Cre: n = 5 Sncg::Cre: n = 5 (n retinas from n animals from n litters)	ANOVA: $F_{3, 14} = 3.2$, $P = 0.06$ Post-hoc contrast: Control vs CAG::Cre, -0.08 ± 0.07 min^{-1}, $t = -1.2$, $P > 0.1$; Control vs Sncg::Cre, -0.19 ± 0.07 min^{-1}, $t = -2.7$, $P' = 0.03$
Fig. 4E	WT: n = 3 Control: n = 5 CAG::Cre: n = 5 Sncg::Cre: n = 5 (n retinas from n animals from n litters)	Linear mixed-effects regression: $\chi_6 = 32$, $P = 2 \cdot 10^{-5}$ Effect of genotype: $F_{3,11} = 8.8$, $P' = 0.009$ Effect of 'nearby': $F_{1,11} = 0.15$, $P > 0.1$ Interaction effect: $F_{2,11} = 8.3$, $P' = 0.01$ Post-hoc contrast: Control Tom^+ vs CAG::Cre $Sponge^+$, 0.19 ± 0.06, $t_4 = 3.0$, $P' = 0.08$; Control Tom^+ vs Sncg::Cre $Sponge^+$, 0.36 ± 0.06, $t_4 = 5.7$, $P' = 0.01$; CAG::Cre nearby vs Control nearby, -0.002 ± 0.04, $t_4 = 0.1$, $P = 0.8$; Sncg::Cre nearby vs Control nearby, -0.13 ± 0.04, $t_4 = 3.6$, $P = 0.05$

Fig. 4F	WT, 12 cells, 8 animals, 6 litters; ControlZaic, 8 cells, 4 animals, 4 litters; ControlZaic nearby, 7 cells, 6 animals, 3 litters; CAG::Cre, 9 cells, 7 animals, 5 litters; CAG::Cre nearby, 9 cells, 7 animals, 4 litters; Sncg::Cre, 8 cells, 6 animals, 4 litters; Sncg::Cre nearby, 7 cells, 4 animals, 4 litters.	Burst frequency ANOVA: $F_{6,53} = 2.6$, $P = 0.03$ Post-hoc contrast: Ctrl Tom$^+$ or YFP$^+$ vs CAG::Cre Sponge$^+$, -0.1 ± 0.1 min^{-1}, t = 1.4, $P >$ 0.1; Ctrl Tom$^+$ or YFP$^+$ vs Sncg::Cre Sponge$^+$, -0.1 ± 0.1 min^{-1}, t = 1.0, $P >$ 0.1; Ctrl nearby vs CAG::Cre nearby, 0.2 ± 0.1 min^{-1}, t = 1.5, $P > 0.1$; Ctrl nearby vs Sncg::Cre nearby, 0.4 ± 0.1 min^{-1}, t = 2.3, $P' = 0.08$
Fig. S1B	3 independent experiments.	N/A
Fig. S1D	6 coverslips from 3 independent experiments.	N/A
Fig. S1F	No Cre, Cre 1:20, Cre 1:4, 6 coverslips from 3 independent experiments; Cre 1:1, 4 coverslips from 1 experiment.	N/A
Fig. S3B	Control, n = 8 animals from 4 litters; Lyn-cAMP Sponge, n = 10 animals from 4 litters.	Whole dLGN, Mann-Whitney $P = 0.0434$, U = 17 3 sections with largest ipsi, Mann-Whitney $P = 0.0343$, U = 16
Fig. S4	As in Fig. 4E	N/A

Fig. S5	In addition to the data points summarized for Fig. 4F: Ctrl, 10 cells, 7 animals, 7 litters Ctrl nearby,: 7 cells, 4 animals, 4 litters CAG::cre: 6 cells, 3 animals, 3 litters CAG::cre nearby, 6 cells, 5 animals, 4 litters Sncg::cre, 9 cells, 5 animals, 3 litters Sncg::Cre nearby, 5 cells, 4 animals, 3 litters	Firing frequency: ANOVA P7-8: $F_{6,53} = 3.9$, $P = 0.003$ Post-hoc contrast: Ctrl Tom$^+$ or YFP$^+$ vs CAG::Cre Sponge$^+$, -4 ± 6 min^{-1}, t = 0.7, $P > 0.1$; Ctrl Tom$^+$ or YFP$^+$ vs Sncg::Cre Sponge$^+$, -1 ± 6 min^{-1}, t = 0.2, $P > 0.1$; Ctrl nearby vs CAG::Cre nearby, 2 ± 9 min^{-1}, t = 0.2, $P > 0.1$; Ctrl nearby vs Sncg::Cre nearby, 11 ± 9 min^{-1}, t = 1.2, $P > 0.1$; ANOVA P10-11, $F_{5, 38} = 2.0$, $P > 0.1$ Burst frequency: ANOVA P7-8: see Figure 3F ANOVA P10-11: $F_{5,38} = 2.3$, $P = 0.06$ Post-hoc contrast: Ctrl Tom$^+$ or YFP$^+$ vs CAG::Cre Sponge$^+$, !0.0 ± 0.2 min^{-1}, t = 0.1, $P > 0.1$; Ctrl Tom$^+$ or YFP$^+$ vs Sncg::Cre Sponge$^+$, 0.4 ± 0.2 min^{-1}, t = 1.9, $P' = 0.27$; Ctrl nearby vs CAG::Cre nearby, 0.5 ± 0.4 min^{-1}, t = 1.3, $P > 0.1$; Ctrl nearby vs Sncg::Cre nearby, -0.4 ± 0.4 min^{-1}, t = 1.2, $P > 0.1$ APs per burst ANOVA P7-8 : $F_{6,53} = 4.1$, $P = 0.002$ Post-hoc contrast:

		Ctrl Tom$^+$ or YFP$^+$ vs CAG::Cre Sponge$^+$, -2 ± 6 APs, t = 0.4, P > 0.1; Ctrl Tom$^+$ or YFP$^+$ vs Sncg::Cre Sponge$^+$, -1 ± 6 APs, t = 0.1, P > 0.1; Ctrl nearby vs CAG::Cre nearby, 1 ± 9 APs, t = 0.1, P > 0.1; Ctrl nearby vs Sncg::Cre nearby, 5 ± 9 APs, t = 0.5, P > 0.1 ANOVA P10-11 : $F_{5,38}$ = 1.9, P = 0.12 Mean and SD are given.
Fig. S6B left	Positive control, n = 3 from 3 animals; non-electroporated retina, n = 8 from 6 litters	Mann-Whitney P = 0.0121, U = 0
Fig. S6B, right	non-electroporated retina, n = 8 from 6 litters; ControlZaic, n = 4 from 3 litters; SpongeZaic, n = 6 from 3 litters.	Kruskal-Wallis P = 0.6720, Kruskal-Wallis statistics 0.851
Fig. S6C, left	ControlZaic, n = 4 from 3 litters; SpongeZaic, n = 6 from 3 litters.	Mann-Whitney P = 0.924, U = 11
Fig. S6C, right	ControlZaic, n=4 from 3 litters; SpongeZaic, n=6 from 3 litters.	Mann-Whitney P = 0.412; U = 9

Table S2: Plasmid used

	Experimental group	Plasmid	($\mu g \cdot \mu L^{-1}$)	Cre-plasmid	($\mu g \cdot \mu L^{-1}$)
Fig 1	control	lox-CFP-lox-YFP (ControlZaic)	2	CAG::Cre	0.1
	cAMP Sponge	lox-CFP-lox-Lyn cAMP Sponge-2A-YFP (SpongeZaic)	2	CAG::Cre	0.1
Fig. 2	control	lox-CFP-lox-YFP (ControlZaic)	2	CAG::Cre	0.1
	cAMP Sponge	lox-CFP-lox-Lyn cAMP Sponge-2A-YFP (SpongeZaic)	2	CAG::Cre	0.1
Fig. 3	control	lox-CFP-lox-YFP (ControlZaic)	2	Sncg::Cre	0.05
	cAMP Sponge	lox-CFP-lox-Lyn cAMP Sponge-2A-YFP (SpongeZaic)	2	Sncg::Cre	0.05
Fig 4 A to E	control	tdTom	2	-	
		lox-STOP-lox- tdTom	2	CAG::Cre	0.1
		lox-STOP-lox- tdTom	2	Sncg::Cre	0.05
	cAMP Sponge	lox-STOP-lox-Lyn cAMP Sponge-2A-tdTom	2	CAG::Cre	0.1
		lox-STOP-lox-Lyn cAMP Sponge-2A-tdTom	2	Sncg::Cre	0.05
Fig 4F	control	tdTom	2	-	
		tdTom	2	Sncg::Cre	0.05
		lox-STOP-lox- tdTom	2	CAG::Cre	0.1
		lox-STOP-lox- tdTom	2	Sncg::Cre	0.05
		Sncg::tdTom	3	Sncg::Cre	0.05
		lox-CFP-lox-YFP (ControlZaic)	2	CAG::Cre	0.1
	cAMP sponge	lox-STOP-lox-Lyn cAMP Sponge-2A-tdTom	2	CAG::Cre	0.1
		lox-CFP-lox-Lyn cAMP Sponge-2A-YFP (SpongeZaic)	2	CAG::Cre	0.1
		lox-STOP-lox-Lyn cAMP Sponge-2A-tdTom	2	Sncg::Cre	0.05
		lox-CFP-lox-Lyn cAMP Sponge-2A-YFP (SpongeZaic)	2	Sncg::Cre	0.05
Fig S3	control	GFP	2		
		lox-CFP-lox-YFP (ControlZaic)	2	CAG::Cre	0.1
	cAMP sponge	Lyn-cAMP-Sponge-GFP	2		
		lox-CFP-lox-Lyn cAMP Sponge-2A-YFP (SpongeZaic)	2	CAG::Cre	0.1
Fig S4	As Fig 4A to E				
Fig S5	As Fig 4F				

Supplemental video captions

Movie S1. Calcium waves of a retina expressing lox-STOP-lox-tdTom and CAG::Cre. (Left) Moving mean (over 4s) of OGB fluorescence. (Right) OGB fluorescence after subtraction of moving median (over 3 minutes).

Movie S2. Calcium waves of a retina expressing lox-STOP-lox Lyn-cAMP Sponge-2A-tdTom and CAG::Cre. (Left) Moving mean (over 4s) of OGB fluorescence. (Right) OGB fluorescence after subtraction of moving median (over 3 minutes).

Movie S3. Calcium waves of a retina expressing lox-STOP-lox lyn-cAMP Sponge-2A-tdTom and Sncg-Cre. (Left) Moving mean (over 4s) of OGB fluorescence. (Right) OGB fluorescence after subtraction of moving median (over 3 minutes).

Supplementary bibliography

1. S. Averaimo *et al.*, *Nat Commun*. **7**, 12896 (2016).

2. A. Chaffiol *et al.*, *Mol. Ther.* **25**, 2546–2560 (2017).

3. C. Garcia-Frigola, M. I. Carreres, C. Vegar, E. Herrera, *BMC Dev. Biol.* **7**, 103 (2007).

4. I. Arganda-Carreras *et al.*, *Bioinformatics*. **33**, 2424–2426 (2017).

5. C. Stosiek, O. Garaschuk, K. Holthoff, A. Konnerth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 7319–7324 (2003).

6. E. A. Pnevmatikakis *et al.*, *Neuron*. **89**, 285–299 (2016).

2. La Cre recombinase est spécifiquement exprimée par les CGR ventro-temporales chez les souris *Ptf1aCre ; Tau-GFP*

Différents types de cellules cohabitent dans la rétine, et notamment des cellules amacrines, qui sont connectées aux CGR, dont elles modulent l'activité. Un certain type de cellules amacrines, les cellules amacrines étoilées, sont directement à l'origine de la libération d'acétylcholine qui provoque les oscillations calciques dans les CGR (Feller et al., 1996). Ces cellules amacrines sont nécessaires à la corrélation des activités électriques des CGR voisines, et ainsi à la propagation des vagues calciques (Huberman et al., 2003; Xu et al., 2016). Dans la première partie de notre étude démontrant une co-stabilisation des axones des CGR adjacentes (Louail et al., en préparation), l'électroporation *in utero* induit l'expression du bloqueur de l'AMPc, Lyn-cAMP-Sponge, (sous le contrôle de la Cre recombinase) dans tous les types de prégéniteurs de la rétine, qui continuent à suive un cycle de division cellulaire. L'ADN électroporé est ainsi exprimé par les nombreux types cellulaires qu'ils génèrent : les CGR mais également les cellules horizontales ou amacrines, qui sont générées en même temps durant le développement (Cepko et al., 1996; Garcia-Frigola et al., 2007; Livesey and Cepko, 2001).

L'expression de Lyn-cAMP-Sponge dans les cellules amacrines pourrait jouer un rôle crucial dans le phénotype observé et devait donc être restreinte aux CGR. Au début de l'étude, le promoteur spécifique des CGR (Chaffiol et al., 2017) n'avait pas été décrit et l'utilisation d'une lignée de souris exprimant la Cre spécifiquement dans les CGR nous aurait permis de restreindre notre outil à ces cellules.

Chez les animaux *Ptf1aCre*, l'expression de la Cre est sous le contrôle de l'expression de *Ptf1a* et a été observée dans le nerf optique (Yamada et al., 2007). Les souris *Ptf1aCre* ont été croisées avec des souris *Tau-Lox-STOP-Lox-mGFP-IRES-nls-LacZ* (ou *Tau-GFP*), pour obtenir la lignée *Ptf1aCre ; Tau-GFP.* Suite à la recombinaison par la Cre dans ces souris, la GFP est exprimée dans les axones et permet d'identifier les neurones dans lesquels la Cre est exprimée (Renier et al., 2010). Il a été démontré précédemment que Ptf1a est exprimé dans les précurseurs de la rétine en développement ; suite à l'inactivation de Ptf1a, ces précurseurs deviennent des CGR (Fujitani et al., 2006). Dans le travail suivant, l'expression de la Cre recombinase a été caractérisée dans le système visuel des souris *Ptf1aCre ; Tau-GFP*. La Cre

est exprimée par les cellules ganglionnaires et restreinte aux CGR conta-latérales du croissant ventro-temporal.

Résultats

1. La Cre est exprimée spécifiquement dans les CGR chez les souris Ptf1aCre ; Tau-GFP

L'analyse de sections de rétine de souris *Ptf1aCre ; Tau-GFP* à P11 révèle l'expression de la Cre à l'aide du rapporteur fluorescent GFP (n=4). La GFP est exprimée dans la rétine, mais pas dans sa partie périphérique (**Figure 1 ; A**). Les cellules exprimant la GFP se trouvent toutes localisées dans la couche des cellules ganglionnaires, dans la partie la plus superficielle de la rétine (**Figure 1 ; B**). Leur morphologie est semblable à celle des CGR : un soma plutôt large et un arbre dendritique localisé vers l'intérieur de la rétine, la couche plexiforme interne présumée. De plus, leurs axones sont visibles à la superficie de la rétine (**Figure 1 ; C**). L'expression de la GFP est détectée à partir de P7 dans ces CGR (n=2). Dans la lignée de souris *Ptf1aCre ; Tau-GFP*, la Cre est donc exprimée dans la rétine, spécifiquement par les CGR.

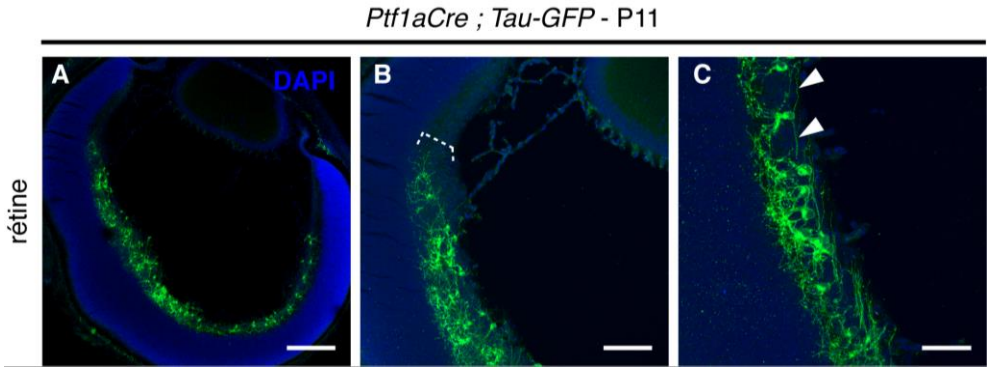


Figure 1 : La Cre est exprimée dans les CGR des souris *Ptf1aCre ; Tau-GFP*. Sections de rétine de souris Ptf1aCre ; Tau-GFP à P11. Les noyaux cellulaires ont été marqués avec du DAPI. **(A)** La zone d'expression de Cre (en vert) exclue la partie périphérie de la rétine. La ligne pointillée désigne la couche des cellules ganglionnaires. **(B, C)** Cre est exprimée dans des cellules localisées à la superficie de la rétine, qui projettent des axones en surface (indiqués par les flèches). Barres d'échelle : A, 200 µm ; B, 100 µm, C, 50 µm. n=4.

2. L'expression de la Cre est restreinte aux CGR contra-latérales du croissant ventro-temporal

Les CGR qui sont directement en compétition avec les projections de l'œil contra-latéral lors du raffinement de la carte binoculaire sont localisées dans la partie ventro-temporale de la rétine. Afin de déterminer si la Cre est exprimée dans cette partie de la rétine chez les souris *Ptf1aCre ; Tau-GFP*, celles-ci ont été analysées entières, à plat. L'expression de la Cre est à nouveau révélée par l'expression de la GFP. Sur des rétines entières, les CGR exprimant la GFP sont restreintes au croissant ventro-temporal de la rétine. Comme il a été décrit sur les sections de rétine, aucune CGR exprimant la GFP n'est présente dans la zone la plus périphérique de la rétine (**Figure 2 ; A**). Les axones des CGR sont visualisables, projetant vers la sortie de la rétine pour former le nerf optique (**Figure 2 ; B-C)**, confirmant l'expression dans les CGR. La Cre est donc exprimée dans les CGR ventro-temporales chez les souris *Ptf1aCre ; Tau-GFP*.

L'organisation des axones des CGR dans les cibles visuelles primaires a été analysée sur des coupes coronales de cerveau à P21, une fois que les territoires œil-spécifiques sont établis. Les projections de chaque œil sont marquées à l'aide de la sous-unité β de la toxine cholérique (CtB). Dans le CGLd comme dans le CS, les CGR exprimant la GFP arborisent dans le territoire des axones contra-latéraux (**Figure 2 ; D-H**). Sur toutes les sections coronales du CGLd, les axones exprimant la GFP sont localisés à proximité directe du territoire ipsi-latéral (**Figure 2 ; D-F)**. Leur localisation diffère en revanche en fonction du niveau rostro-caudal dans le thalamus. Caudalement, les axones exprimant la GFP sont situés dans la partie ventrale du thalamus (**Figure 2 ; D**) ; puis on les retrouve dans la partie dorsale (**Figure 2 ; E**). Enfin, dans la partie la plus rostrale du thalamus, les axones GFP^+ arborisent tout autour du territoire ipsi-latéral (**Figure 2 ; F**).

Dans le CS caudal, les CGR exprimant la GFP arborisent préférentiellement dans la partie médiane du SC (**Figure 2 ; G**). En revanche, elles sont plutôt observées latéralement dans le CS rostral (**Figure 2 ; H**).

Chez les souris *Ptf1aCre ; Tau-GFP*, la Cre est donc spécifiquement exprimée dans des CGR qui arborisent à proximité directe du territoire des CGR de l'autre œil.

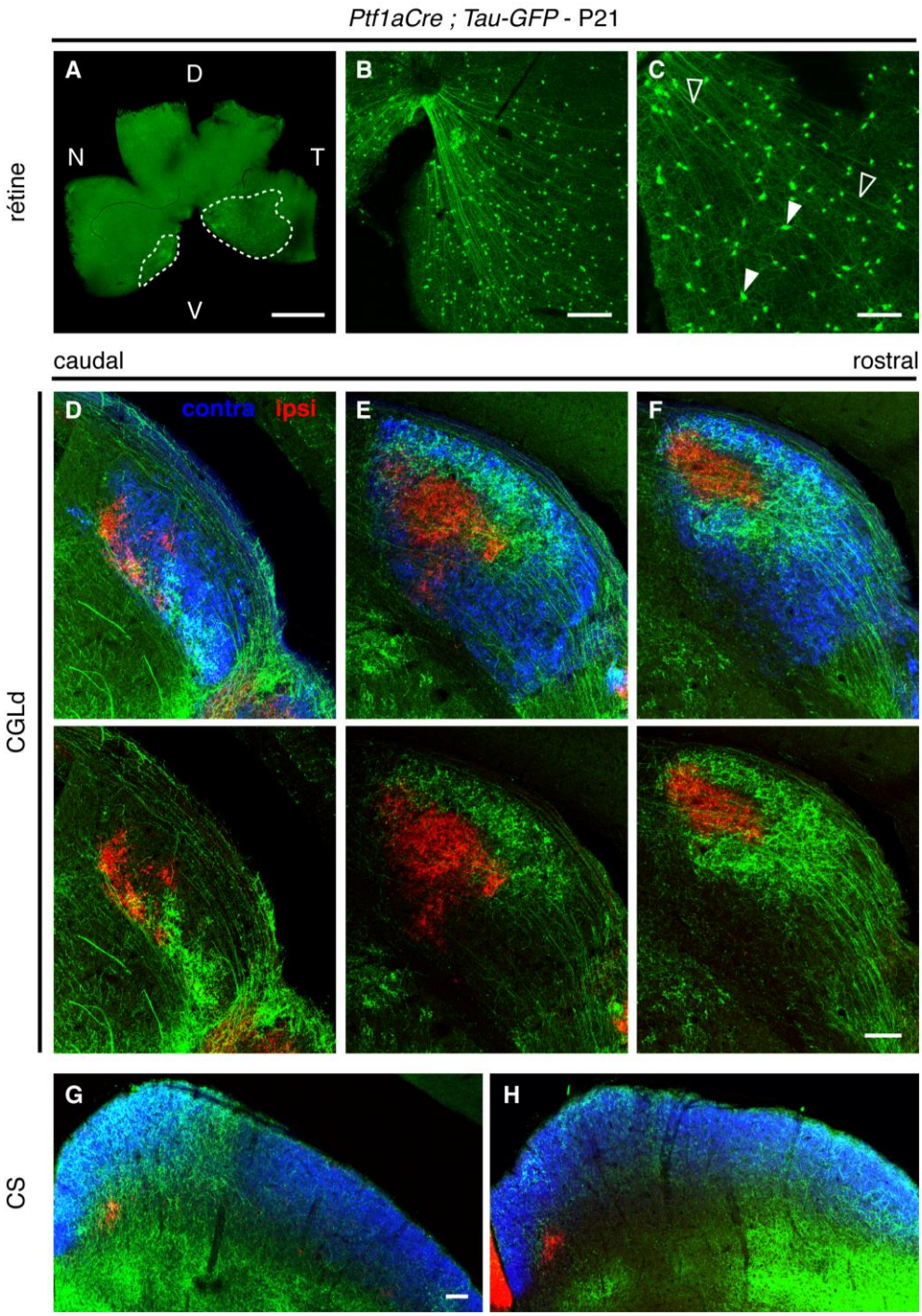


Figure 2 : Expression de la Cre dans les CGR contra-latérales du croissant VT des souris *Ptf1aCre ; Tau-GFP*. (A) L'expression de la GFP est détectée dans la partie VT sur des rétines entières à P11. La ligne pointillée désigne la partie contenant les CGR exprimant la GFP. **(B-C)** La GFP est exprimée dans des CGR, dont les axones projettent vers le disque optique. Les flèches pleines indiquent des somas des CGR, les flèches creuses désignent leurs axones. Coupes coronales de CGLd **(D-F)** ou de CS **(G-H)** à P21, de caudale (gauche) à rostrale (droite). Les territoires ipsi-latéral (rouge) et contra-latéral (bleu) sont observables grâce à la CtB. Dans le CGLd, les axones des CGR exprimant la GFP sont localisés à proximité directe du territoire ipsi-latéral sur toutes les sections du thalamus. Barres d'échelle : A, 1 mm ; B, 100 µm ; C, 50 µm, D1-H, 100 µm. n=4.

Conclusion

Les résultats décrits ici caractérisent l'expression de la Cre chez les souris *Ptf1aCre ; Tau-GFP*. La Cre est exprimée par des CGR de la partie ventro-temporale de la

rétine, qui arborisent dans le territoire contra-latéral, à proximité directe du territoire de l'autre œil. Cette lignée de souris pourrait donc être particulièrement utile pour de futures études nécessitant une recombinaison homologue spécifiquement dans les CGR. Un promoteur spécifique des CGR a été décrit récemment (Chaffiol et al., 2017) et nous a permis de restreindre l'expression de l'ADN électroporé à ces cellules, écartant la nécessité d'utiliser une lignée de souris. Les résultats décrits ici décrivent une lignée de souris dans laquelle la Cre est exprimée dans des CGR en compétition directe avec des CGR provenant de l'œil opposé. Cette lignée de souris pourrait dont être utilisée pour étudier plus en détail les mécanismes de coopération décrits précédemment (Louail et al., en préparation).

3. Le développement de la connectivité dans les mécanismes coopératifs dépendants de l'AMPc

Le développement de la connectivité du système visuel suit un principe récurrent dans le développement du système nerveux : la compétition entre axones. Les neurones dont l'activité électrique est synchrone avec celle leur partenaire post-synaptique renforcent ce contact synaptique. En revanches, les synapses dont les activités pré- et post-synaptiques ne sont pas corrélées sont affaiblies (Hebb, 1949). De plus, lorsque des axones qui connectent le même neurone ont des activités corrélées, leurs synapses sont renforcées collectivement (Wigström and Gustafsson, 1985). Les vagues spontanées rétiniennes synchronisent la décharge de CGR adjacentes (Feller et al., 1996; Huberman et al., 2003) et pourraient donc impliquer des mécanismes coopératifs de stabilisation synaptique. Il a été montré que la co-activation d'un axone de CGR avec ses voisins stabilise ainsi les synapses rétino-tectales chez le xénope (Munz et al., 2014). Les mécanismes coopératifs entre CGR, dépendants de l'AMPc, participent au raffinement des connexions rétino-thalamiques. Ainsi, le blocage de la signalisation AMPc dans certaines CGR induit une diminution des arborisations axonales de

leurs voisines à P15. Des phénomènes de stabilisation synaptique pourraient jouer un rôle essentiel dans cette coopération entre axones.

Afin de déterminer si la connectivité des CGR est altérée lorsque la signalisation AMPc est perturbée dans certaines de leurs voisines, le développement des synapses rétino-thalamiques a été étudié, grâce à la stratégie Zaic décrite précédemment (Louail et al., en préparation). Les synapses des CGR ont été marquées grâce à une protéine fluorescente, et leur morphologie a été décrite à P15.

Résultats

Dans les plasmides ControlZaic et SpongeZaic précédemment décrits, la séquence de la synaptophysine (SYP) a été fusionnée à la protéine fluorescente tdTomato, et liée à la CFP par une séquence 2A (**Figure 1 ; A**). Les plasmides obtenus ont été baptisés respectivement LOKI (ControlZaic-SYP-Tomato) et THOR (SpongeZaic-SYP-Tomato). La synaptophysine est une glyco-protéine des vésicules pré-synaptiques. Elle est donc présente de façon ubiquitaire à la synapse, et peut ainsi servir de marqueur pour leur quantification (Calhoun et al., 1996). Ainsi, les cellules exprimant la CFP dans tout le cytoplasme exprimeront également tdTomato au niveau de leurs synapses. Les synapses rétino-thalamiques représentent la vaste majorité des synapses glutamatergiques dépendantes du récepteur au glutamate de type 2 (VGLUT2) observées dans le CGLd (Hammer et al., 2014; Land et al., 2004). A P15, les connexions entre CGR et cellules thalamiques sont établies (Jaubert-Miazza et al., 2005). Sur des coupes coronales de CGLd à P15, de souris électroporées *in utero* avec LOKI ou THOR, l'expression de SYP-tdTomato co-localise avec le marquage de VGLUT2 (**Figure 1 ; B**). La SYP-tdTomato est donc exprimée dans les synapses des CGR exprimant la CFP dans la stratégie Zaic. Ces outils moléculaires permettent donc l'étude des synapses des CGR voisines de celles dont la signalisation AMPc est perturbée.

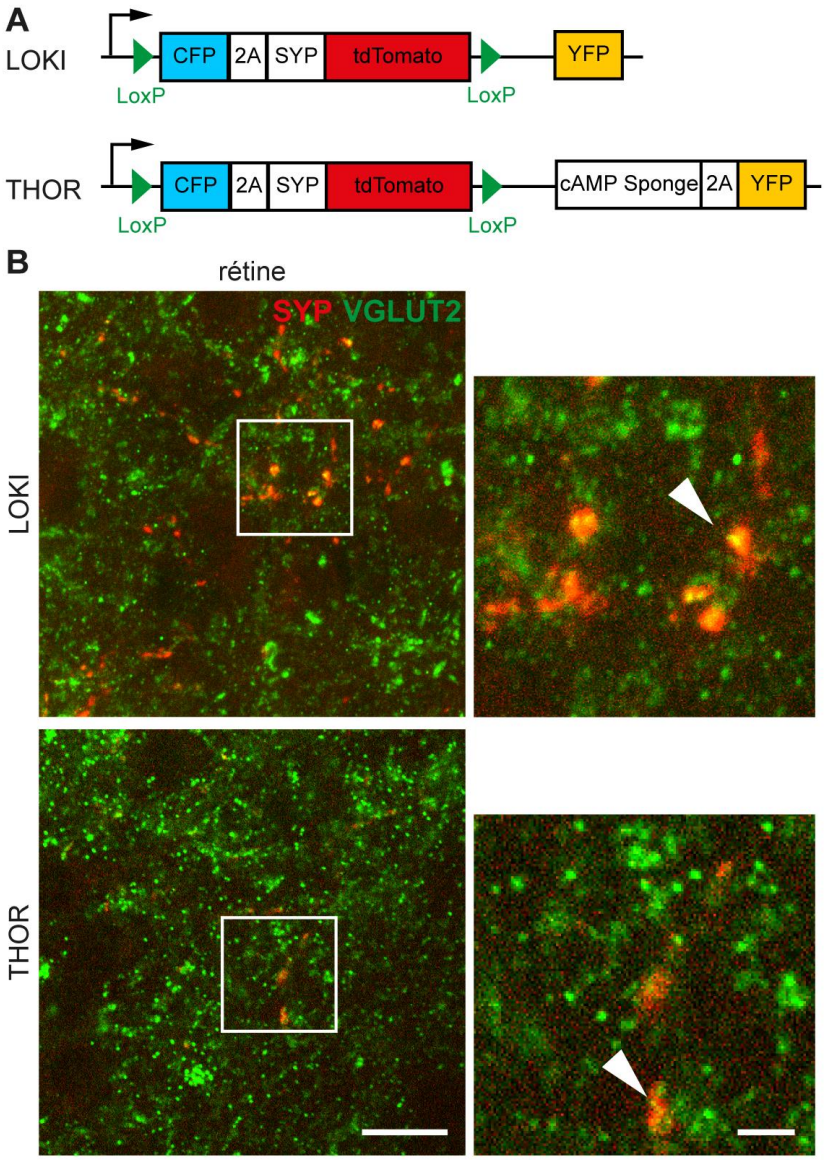


Figure 1 : Optimisation de la stratégie Zaic : expression de SYP-tdTomato au niveau synaptique (A) Les plasmides LOKI (haut) et THOR (bas) sont des adaptations de ControlZaic et de SpongeZaic, respectivement. Dans ces constructions ADN, SYP-tdTomato est fusionnée à la CFP par une séquence 2A. **(B)** Coupes coronales de CGLd de souris électroporées *in utero* avec LOKI (haut) ou THOR (bas). La co-localisation de SYP-tdTomato (rouge) avec le marquage VGLUT2 (vert) est indiquée par les flèches. Barres d'échelle : B, 10 µm ; encadré, 20 µm.

Les plasmides LOKI et THOR ont été électroporés *in utero*, avec la Cre recombinase, selon la methode décrite précédemment (Louail et al., en préparation). Dans le CGLd à P15, les synapses des CGR ont donc pu être observées grâce au marquage de la SYP-tdTomato (**Figure 2 ; A**). La segmentation des images suivant la méthode décrite précédemment (Louail et al., en préparation) permet l'analyse des synapses de façon reproductible, rapide et indépendante de l'expérimentateur (**Figure 2, B-C**). La surface moyenne des synapses rétino-thalamiques à P15 est d'environ 1,20 µm^2 ± 0,04 µm^2 (**Figure 2 ; D**). La surface des synapses des CGR exprimant la CFP pourrait être réduite suite à l'expression de THOR dans les CGR (SpongeZaic-SYP-Tomato, n=1) (**Figure 2 ; A-D**). Le blocage de l'AMPc dans les CGR pourrait ainsi affecter le développement des synapses de leurs voisines. Lorsque les CGR sont électroporées avec THOR, et donc certaines d'entre-elles expriment cAMP-sponge, le nombre de synapses pourrait être réduit (**Figure 2**). Cette diminution de la quantité de synapses pourrait être corrélée à la diminution des arborisations axonales des CGR exprimant la CFP observée avec le plasmide SpongeZaic, dont THOR est un variant.

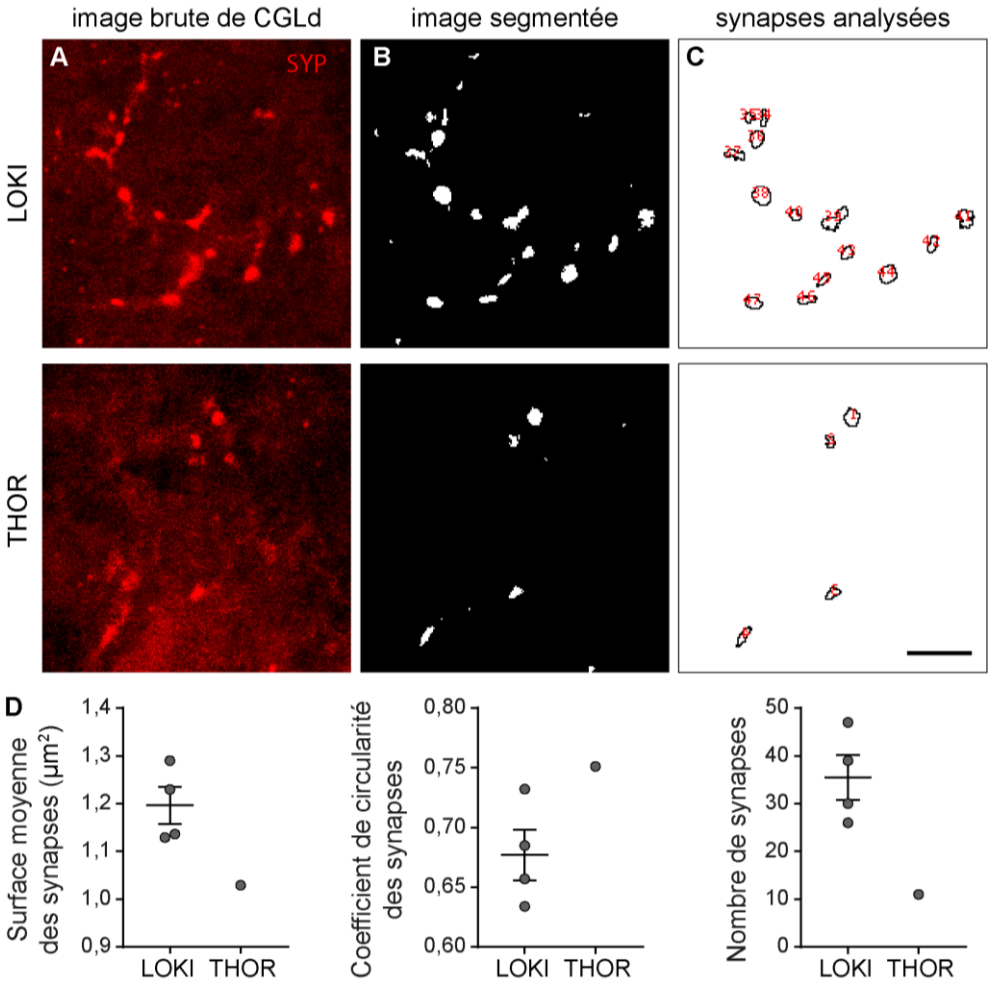


Figure 2 : Analyse des synapses du CGLd dans la statégie Zaic. (A) Coupes coronales de CGLd de souris électroporées *in utero* avec LOKI (haut) ou THOR (bas). Les synapses sont visualisables grâce à SYP-tdTomato. Les images ont été segmentées **(B)** puis analysées grâce à la fonction *Analyze particles* de Fiji **(C)**. **(D)** Quantification de la surface moyenne, du coefficient de circularité, et du nombre de synapses chez les souris électroporées *in utero* avec LOKI ou THOR. Barre d'échelle : 5 µm.

Conclusion

Les données présentées ici décrivent deux variants des plasmides de la stratégie Zaic, décrite précédemment (Louail et al., en préparation), permettant la visualisation des synapses des CGR. Dans ces outils, la fusion de SYP à tdTomato induit le marquage des synapses en rouge, dans les cellules voisines de celles dont la signalisation AMPc est perturbée.

L'électroporation *in utero* de ces outils moléculaires permet d'observer la morphologie des synapses du CGLd à P15. La surface moyenne des synapses rétino-thalamiques à P15 a été évaluée à 1,20 µm^2 ± 0,04 µm^2 (**Figure 2**). Il a précédemment été démontré que la surface des synapses rétino-thalamiques chez des souris adultes est d'environ 2,43 µm^2 ± 0,38 µm^2 (Hammer et al., 2014). Les auteurs ont également décrit que la taille des synapses augmentait entre P5 et P14, les résultats présentés ici suggèrent que la surface de ces synapses pourrait

également doubler entre P15 et l'âge adulte. Les résultats préliminaires concernant l'électroporation *in utero* de THOR (n=1) ne permettent malheureusement pas de conclure pour le moment si le blocage de l'AMPc dans certaines CGR perturbe le développement des synapses de leurs voisines.

PARTIE 2 : Le rôle de l'activité électrique dans le développement et les interactions des CGR

Des vagues d'activité calcique se propagent spontanément dans les rétines pendant les deux premières semaines post-natales. Elles sont impliquées dans le développement des projections rétiniennes (Burbridge et al., 2014; Penn et al., 1998). Ces vagues se propagent de cellule en cellule, et synchronisent la décharge électrique des CGR voisines (Feller et al., 1996; Huberman et al., 2003). Des travaux récents ont révélé l'importance de l'activité rétinienne dans la compétition entre axones de la même rétine (Failor et al., 2015). D'autres observations suggèrent que l'activité corrélée des afférences reçues par le neurone post-synaptique pourrait co-stabiliser leurs connexions. Chez le xénope, la stimulation synchrone de deux CGR convergeant sur le même neurone cible, accroît l'amplitude des courants post-synaptiques (Zhang et al., 1998). Réciproquement, la stimulation asynchrone de CGR voisines augmente la dynamique exploratoire de leurs branches axonales et augmente la taille de leurs arborisations dans le tectum (Munz et al., 2014). Enfin, dans le cortex visuel de souris, la stimulation synchrone de CGR voisines (<12 µm) stabilise leur transmission synaptique (Winnubst et al., 2015). Enfin, il a été montré que des synapses voisines (<10 µm) co-actives dans le cortex visuel de furet partagent des caractéristiques fonctionnelles communes (Scholl et al., 2017).

L'activité électrique corrélée des CGR adjacentes pourrait donc jouer un rôle essentiel dans des phénomènes coopératifs pendant le développement de la connectivité rétinienne. Ainsi, l'effet du blocage de l'activité électrique de certaines CGR sur les arborisations axonales de ces cellules et de leurs voisines a été évalué dans le CGLd.

Résultats

La stratégie Zaic (Louail et al., en préparation) a été adaptée pour induire l'expression de Kir2.1 dans une sous-population de CGR. La sur-expression du canal potassique Kir2.1

hyperpolarise les neurones, empêchant la genèse des potentiels d'action (Burrone et al., 2002). La séquence codant pour Kir2.1 a ainsi été insérée, en remplacement de la séquence codant pour Lyn-cAMP-Sponge, dans la stratégie Zaic. L'ADN correspondant, KirZaic, induit l'expression de Kir2.1 et YFP lorsque la Cre est exprimée (**Figure 1 ; A-B**).

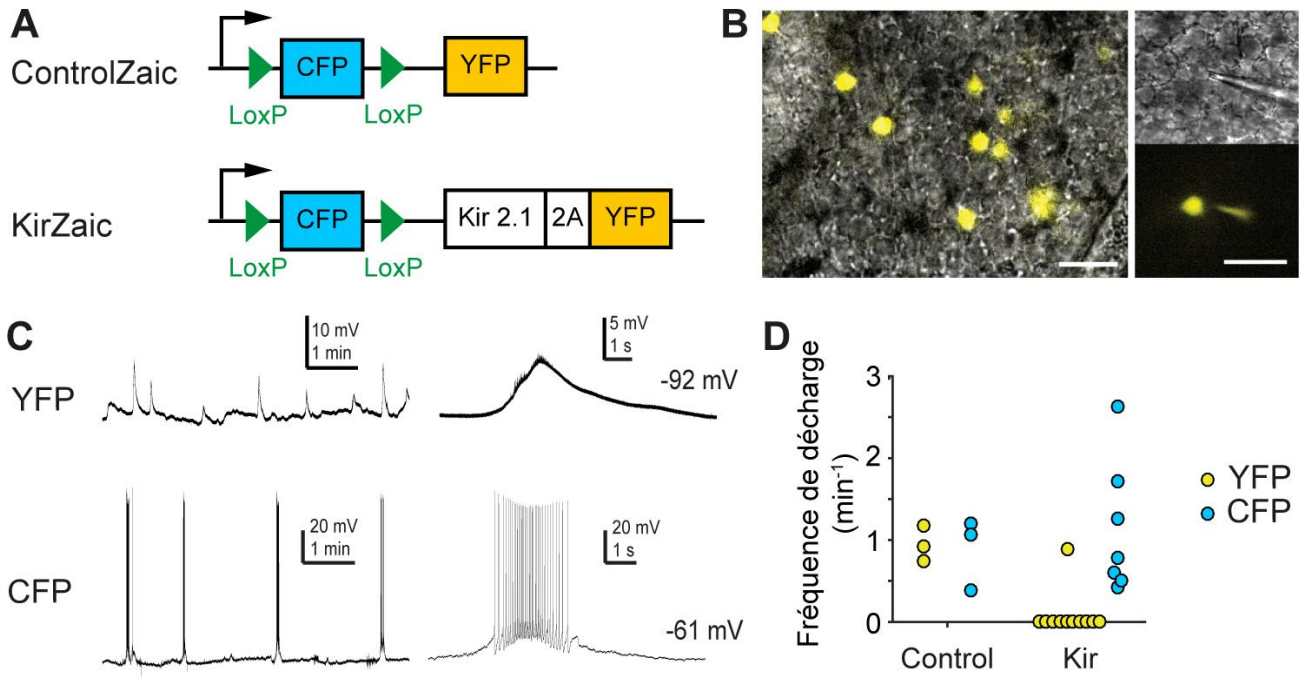


Figure 1 : L'expression de KirZaic par les CGR perturbe leur activité électrique. (A) La stratégie Zaic et la séquence de ControlZaic ont été décrites précédemment. Dans le plasmide KirZaic, la séquence codant pour Kir2.1 est fusionnée à la YFP grâce à une séquence 2A. Suite à la recombinaison par la Cre, la séquence de CFP est excisée, et YFP (ainsi que Kir2.1 dans le cas de KirZaic) est exprimée. **(B)** Rétine P9 électroporée *in utero* avec KirZaic. Les enregistrements en cellule entière ont été effectués sur des CGR exprimant la YFP et des cellules voisines. Image infra-rouge montrant l'électrode (haut) permettant d'enregistrer l'activité électrique de la cellule YFP^+ (bas) **(C)** Exemples d'enregistrements en cellule entière de CGR YFP^+ (haut) ou de leurs voisines (CFP^+, bas), montrant leur activité électrique spontanée. **(D)** Fréquence de décharge des CGR électroporées avec ControlZaic ou KirZaic. Barres d'échelle : A, 50 µm.

L'activité électrique des CGR a d'abord été évaluée chez des souris électroporées *in utero* avec KirZaic (**Figure 1 ; B**). Le potentiel de membrane au repos des CGR exprimant la YFP (et donc Kir2.1) est mesuré aux alentours de -92 mV, tandis que celui des CGR voisines est proche de -61 mV (**Figure 1 ; C**). La membrane plasmique des CGR exprimant la YFP est donc bien hyperpolarisée suite à l'expression de Kir2.1 dans ces cellules. Le potentiel membranaire de repos des cellules adjacentes est proche de celui observé dans les conditions physiologiques (Cho et al., 2011). L'activité électrique spontanée des CGR exprimant la YFP et Kir2.1 est abolie dans les rétines à P9 (**Figure 1 ; C-D**). Les CGR exprimant la CFP, elles, présentent une activité spontanée comparable à celle observée dans des conditions physiologiques (Louail et al., en préparation) (**Figure 1 ; C-D**). Ces résultats démontrent que l'expression de

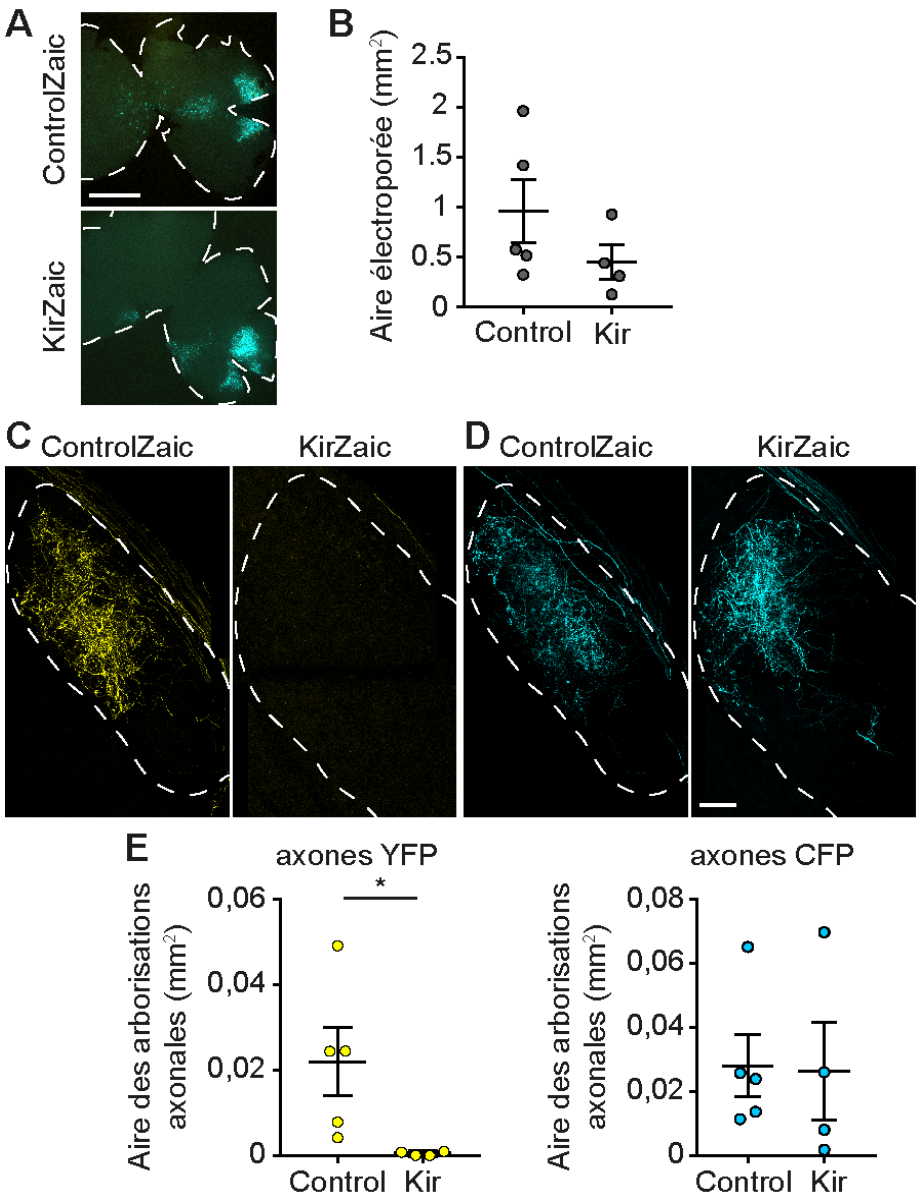


Figure 2 : Les CGR sans activité électrique sont absentes du CGLd à P15. **(A)** Rétines électroporées *in utero* avec ControlZaic ou KirZaic dans la partie ventro-temporale. **(B)** La taille de la région électroporée est similaire chez les souris électroporées avec ControlZaic ou KirZaic. **(C)** Projections rétiniennes exprimant YFP ou **(D)** CFP dans le CGLd contra-latéral à P15, chez des souris ControlZaic ou KirZaic. **(E)** Les arborisations axonales exprimant la YFP (gauche) sont absentes chez les souris électroporées avec KirZaic. L'aire occupée par les axones exprimant la CFP n'est pas modifiée. La ligne pointillée délimite le contour **(A)** de la rétine ou **(C,D)** du CGLd. Barres d'échelle : A, 1 mm ; C,D, 50 µm. n=4. Les données représentent la moyenne ± sem. * *P*<0,0162.

Kir2.1 par les CGR abolit leur activité spontanée dans les rétines en développement, en perturbant leurs propriétés intrinsèques ; sans affecter l'activité électrique des cellules voisines.

L'électroporation de KirZaic permet donc l'obtention d'une mosaïque de cellules : une sous-population, exprimant la CFP, dont l'activité électrique n'est pas modifiée et une sous-population exprimant la YFP et Kir2.1, dans laquelle l'activité électrique est perturbée.

Dans le but d'évaluer l'impact du blocage de cette activité électrique dans quelques CGR sur le développement des arborisations axonales de leurs voisines, KirZaic a été électroporé *in utero* dans la partie ventro-temporale de la rétine (**Figure 2 ; A**). Les axones des CGR exprimant la YFP ou la CFP ont été tracés depuis la rétine jusqu'au thalamus. L'aire recouverte par les projections exprimant la YFP ou la CFP a été analysée après le raffinement

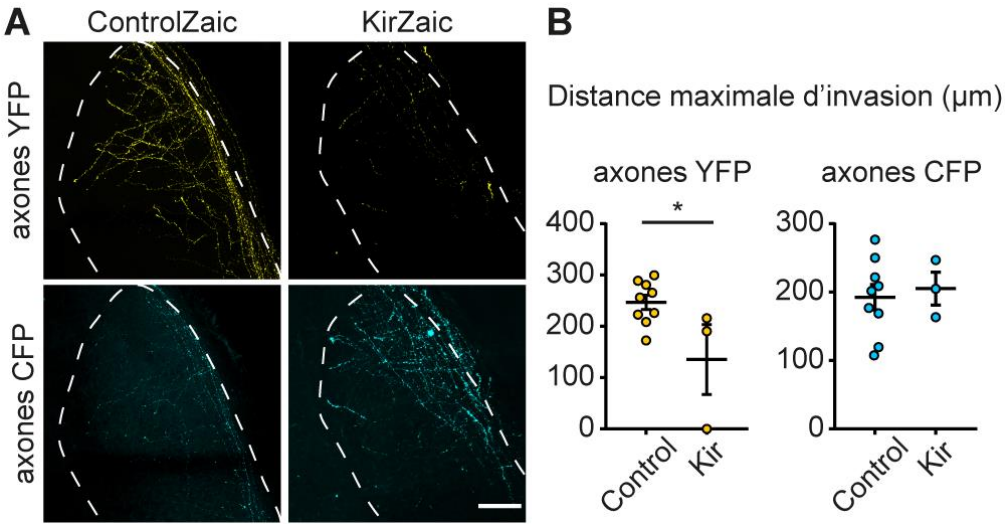


Figure 3: Le blocage de l'activité électrique des CGR les empêche d'envahir le CGLd. (A) Sections coronales de CGLd à P3. Les axones YFP⁺ et CFP⁺ sont présents dans le CGLd des animaux électroporés avec ControlZaic ou KirZaic. La ligne pointillée représente le contour du CGLd. **(B)** Longueur des cinq plus long axones de chaque animal dans le CGLd. Les axones YFP⁺ des animaux KirZaic n'envahissent pas le CGLd aussi loin que chez les contrôles. Barres d'échelle : 50 µm. n=3. Les données représentent la moyenne ± sem. ** *P*<0,02.

des connexions, à P15 (**Figure 2 ; C-D)**. La segmentation des images suivant la méthode décrite précédemment (Louail et al., en préparation) permet l'analyse des axones de façon reproductible, rapide et indépendante de l'expérimentateur. Les arborisations axonales exprimant la YFP sont absentes du CGLd à P15 chez les animaux électroporés avec KirZaic (**Figure 2 ; D-E**). En revanche, l'aire recouverte par les axones exprimant la CFP n'est pas affectée (**Figure 2 ; D-E**), ce qui démontre que le blocage de l'activité électrique dans les CGR voisines ne perturbe pas leur développement. Cette diminution des arborisations axonales de reflète pas de différence dans la taille de l'électroporation puisqu'elle est comparable chez les animaux ControlZaic et KirZaic (**Figure 2 ; A-B**). Ces résultats démontrent que le blocage de l'activité électrique des CGR perturbe directement le développement de leurs arborisations axonales dans le CGLd, sans affecter la connectivité de leurs voisines.

Afin de mieux comprendre à quel moment les projections des CGR sont affectées par le blocage de leur activité électrique, le développement précoce des axones rétiniens a été évalué à P3 (**Figure 3 ; A**). Les axones ont alors déjà atteint le CGLd, mais le raffinement de leurs connexions commence à peine (Godement et al., 1984; Huberman et al., 2008). Les axones P3 exprimant YFP n'envahissent pas le CGLd aussi loin que leurs contrôles (**Figure 3 ; B)**. Les axones exprimant la CFP ne sont pas affectés par le blocage de l'activité électrique dans leurs voisins. Ces résultats démontrent que les axones dont l'activité électrique est abolie sont présents dans le CGLd à P3, bien qu'ils soient absents à P15.

Conclusion

Dans l'ensemble, ces résultats démontrent que le blocage de l'activité électrique des CGR perturbe le développement de leur connectivité. Les CGR sans activité électrique sont affectées assez tôt dans leur développement : dès l'invasion du CGLd. Elles sont pratiquement absentes du CGLd à P15. Ce blocage de l'activité dans certaines CGR ne perturbe pas le développement de la connectivité de leurs voisines.

La réduction du nombre d'axones exprimant la YFP chez les animaux électroporés avec KirZaic à P3 pourrait être due à une différence expérimentale (**Figure 3**). ControlZaic a été électroporé avec une Cre exprimée dans tous les types cellulaires de la rétine, tandis que KirZaic a été électroporé avec une Cre spécifique des CGR (pSncg-Cre). Comme il a été observé précédemment, les ratios de cellules YFP et CFP sont différents. Cette différence dans la quantité d'axones YFP ne peut en revanche pas expliquer la différence observée concernant leur invasion du CGLd à P3. En revanche, elle rend impossible la comparaison du nombre d'axones chez ces animaux.

PARTIE 3 : Le soma et l'axone, deux compartiments de signalisation AMP cyclique distincts

La signalisation AMP cyclique est omniprésente dans les évènements biologiques (*e.g*. Beavo and Brunton, 2002). Les données de la littérature montrent que la compartimentation subcellulaire des signaux AMPc joue un rôle essentiel dans la spécificité des voies de signalisation activées. La spécificité subcellulaire des signaux AMPc a tout d'abord été décrite dans des régions spécifiques de la membrane plasmique, les radeaux lipidiques. Les adénylate cyclases (AC) régulées par le calcium y sont localisées (Willoughby and Cooper, 2007) et des signaux AMPc distincts ont été identifiés dans et en dehors des radeaux lipidiques (Averaimo et al., 2016). Des signaux AMPc différents ont également été mis en évidence dans les divers compartiments du cône de croissance axonal chez le xénope (Nicol et al., 2007). Enfin, l'existence d'une compartimentation somato-dendritique ou axonale des signaux AMPc a récemment été montrée. La protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) de type II est localisée préférentiellement dans les dendrites et est exclue des terminaux synaptiques des neurones hippocampaux (Zhong et al., 2019). Elle est également spécifiquement exprimée dans les filopodes des cônes de croissance (Han et al., 2007). De plus, la polarisation de ces neurones dépend de la concentration subcellulaire d'AMPc. Le niveau élevé d'AMPc dans un seul neurite permet la formation de l'axone et non d'une dendrite (Shelly et al., 2010).

L'augmentation des niveaux d'AMPc dans l'œil, là où sont localisés les somas des CGR, perturbe la propagation des vagues spontanées dans la rétine en développement, mais n'affecte pas la ségrégation des projections œil-spécifiques (Stellwagen and Shatz, 2002). En revanche, chez les animaux déficients pour l'AC1, les vagues spontanées rétiniennes sont toujours présentes, mais la ségrégation binoculaire est perturbée (Ravary et al., 2003). La conservation des vagues spontanées chez ces animaux pourrait suggérer que la signalisation AMPc n'est pas affectée dans les somas des CGR au sein de la rétine. Des signaux AMPc, activant des voies de signalisation distinctes dans le compartiment somato-dendritique ou axonal des CGR, pourraient expliquer ces résultats. Des séquences ADN ciblant préférentiellement les compartiments somato-dendritique ou axonal, grâce à des injections virales, ont été décrites précédemment (Padmanabhan et al., 2013; Wu et al., 2013). La

perturbation de la signalisation AMPc, spécifiquement dans l'un ou l'autre de ces deux compartiments, permettrait de caractériser davantage les signaux nécessaires aux mécanismes de coopération entre CGR.

Résultats

1. Stratégies de ciblage du compartiment somato-dendritique

Il a récemment été montré, grâce à l'utilisation de vecteurs viraux, que certaines séquences d'ADN permettaient de cibler leur expression au compartiment somato-dendritique dans des CGR *in vivo* (Wu et al., 2013). Dans cette étude, les motifs ADN ont été insérés en 3' de la protéine fluorescente GFP, et leur expression a été observée dans le compartiment somato-dendritique et axonal. Deux séquences ont été identifiées comme permettant de restreindre l'expression de la GFP au compartiment somatique : le

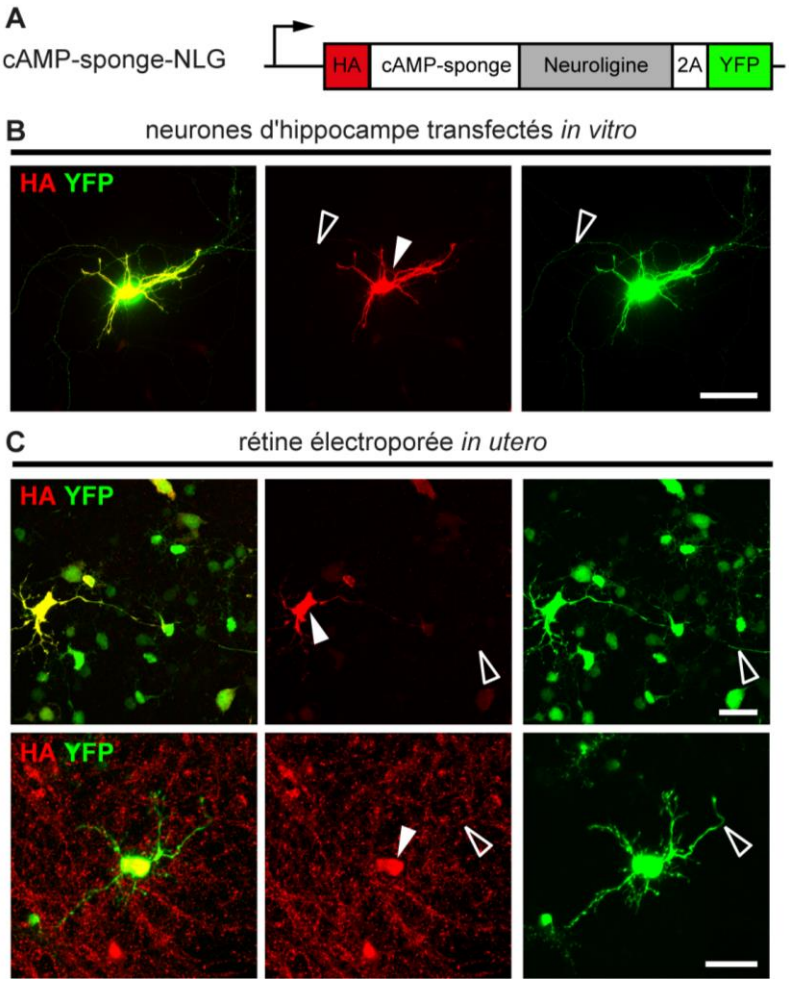


Figure 1 : Le motif NLG permet de cibler le compartiment somato-dendritique. (A) Dans le plasmide cAMP-sponge-NLG, la séquence de cAMP-sponge est fusionnée à une séquence HA et à la neuroligine. Cette éponge ciblée est fusionnée à la YFP par une séquence 2A. **(B)** Les neurones d'hippocampe transfectés *in vitro* avec cette construction expriment HA, donc cAMP-sponge, dans le compartiment somato-dendritique (flèche pleine), mais pas dans le compartiment axonal (flèche vide). **(C)** Rétine électroporée *in utero* avec cAMP-sponge-NLG. HA est présent dans le compartiment somato-dendritique (flèche pleine) des CGR, et absent du compartiment axonal (flèche vide).

Barres d'échelle : B, 100 µm ; C, 20 µm.

canal potassique Kv2.1 et la neuroligine 1 (NLG). Dans les travaux suivants, les motifs de Kv2.1 et NLG ont été fusionnés à la séquence de cAMP-sponge, afin de restreindre le blocage de la signalisation AMPc à ce compartiment cellulaire, sans l'utilisation de vecteurs viraux (**Figures 1-2**). La présence de cAMP-sponge a été identifiée grâce à sa fusion avec une séquence HA. Ces séquences ciblées ont été fusionnées à la protéine fluorescente YFP grâce à une séquence 2A, permettant le clivage de YFP et ainsi son expression dans tout le cytoplasme. L'efficacité de la transfection peut donc être visualisée grâce à l'expression de YFP.

Dans les neurones d'hippocampe transfectés *in vitro* avec cAMP-sponge-NLG, HA est détecté dans le compartiment somato-dendritique des neurones (**Figure 1 ; B**). L'électroporation *in utero* de rétines à 14 jours de développement embryonnaire (E14) avec cette construction ADN induit également l'expression de HA dans le compartiment somato-dendritique des CGR (**Figure 1 ; C**). HA n'est pas détecté dans le compartiment axonal des CGR électroporées avec cette construction ADN. La séquence de NLG permettrait donc l'expression ciblée de cAMP-sponge au compartiment somato-dendritique des neurones d'hippocampe *in vitro*, et des CGR *in vivo*.

Les neurones d'hippocampe ont été ensuite transfectés *in vitro* avec cAMP-sponge-Kv2.1. L'expression de HA est détectée dans le compartiment somato-dendritique des neurones, mais pas dans le compartiment axonal (**Figure 2 ; B**). Comme il a été décrit

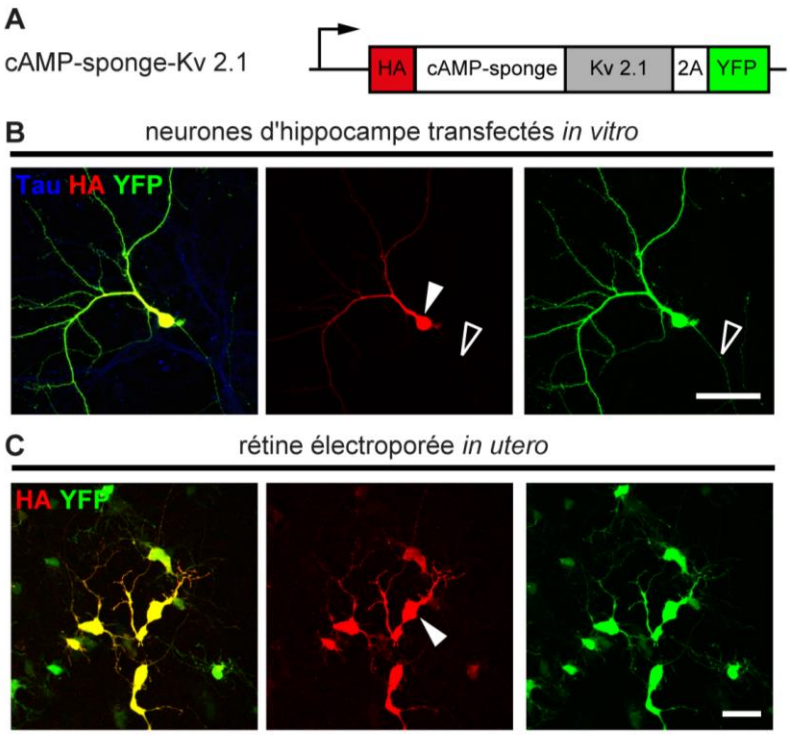


Figure 2 : Le motif Kv2.1 permet de cibler le compartiment somatique et les dendrites proximales. (A) Dans le plasmide cAMP-sponge-Kv2.1, la séquence de cAMP-sponge est fusionnée à HA et Kv2.1. Cette éponge ciblée est fusionnée à la YFP par une séquence 2A. **(B)** Les neurones d'hippocampe transfectés *in vitro* avec cette construction expriment HA, donc cAMP-sponge, dans le compartiment somatique (flèche pleine), mais pas le compartiment axonal (flèche vide). **(C)** Rétine électroporée *in utero* avec cAMP-sponge-Kv2.1. HA est présent dans le compartiment somato-dendritique (flèche pleine) des CGR. Barres d'échelle : B, 50 µm ; C, 20 µm.

précédemment (Wu et al., 2013), l'expression de Kv2.1 est détectée uniquement dans le soma et les dendrites proximales des neurones d'hippocampe (**Figure 2 ; B**). L'électroporation *in utero* de rétines avec cette construction ADN induit également l'expression de HA dans le compartiment somato-dendritique des CGR (**Figure 2 ; C**). La séquence de Kv2.1 induit donc l'expression spécifiquement au niveau somato-dendritque, et ainsi pourrait permettre de restreindre l'expression de cAMP-sponge au compartiment somatique et aux dendrites proximales des neurones d'hippocampe *in vitro*, et des CGR *in vivo*.

2. Stratégies de ciblage du compartiment axonal

Plusieurs motifs ADN permettant de cibler spécifiquement le compartiment axonal, grâce à l'utilisation de vecteurs viraux, ont récemment été mis en évidence dans les neurones de la substance noire compacte (Padmanabhan et al., 2013).

Afin de restreindre l'étude de la signalisation AMPc au compartiment axonal, le motif ADN constitué des 15 acides-aminés C-terminaux de la séquence de la protéine précurseur de l'amyloïde beta (cAPP), a donc été directement inséré en C-terminal de la séquence de cAMP-sponge (**Figure 3 ; A**). La présence de cAMP-sponge a été identifiée grâce à sa fusion avec la séquence HA. A nouveau, cette séquence ciblée est fusionnée à YFP grâce à une séquence 2A, permettant l'expression de YFP dans tout le cytoplasme.

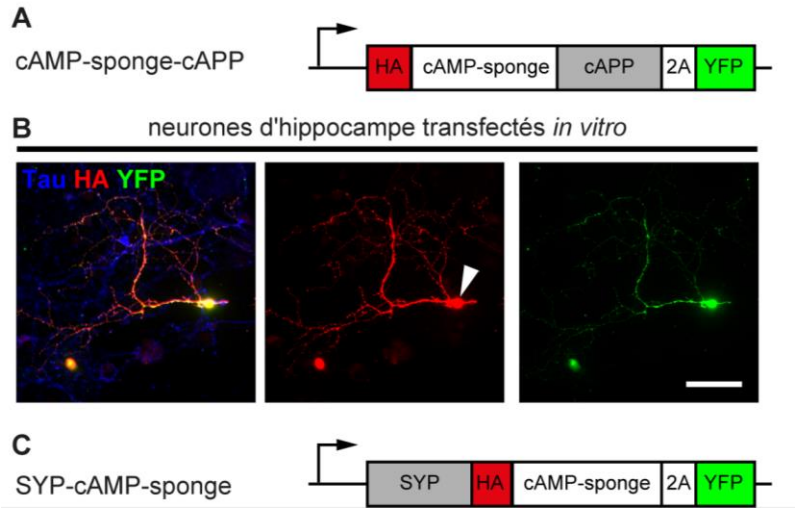


Figure 3: Le motif APP ne permet pas de cibler le compartiment axonal des neurones d'hippocampe *in vitro*. (A) Dans le plasmide cAMP-sponge-APP-YFP, la séquence de cAMP-sponge est fusionnée à un "tag" HA et à la partie C_{ter} de APP. Cette éponge ciblée est fusionnée à la YFP par une séquence 2A. **(B)** Les neurones d'hippocampe transfectés *in vitro* avec cette construction expriment HA, donc cAMP-sponge, dans le compartiment somatique (flèche pleine). **(C)** Dans le plasmide cAMP-sponge-SYP-YFP, la séquence de cAMP-sponge est fusionnée à un "tag" HA et à la partie C_{ter} de SYP. Cette éponge ciblée est fusionnée à la YFP par une séquence 2A. Barres d'échelle : B, 50 µm.

Les neurones d'hippocampe ont été transfectés *in vitro* avec cAPP-cAMP-sponge. L'expression de HA

n’est pas détectée dans l’axone, mais dans le corps cellulaire et les dendrites des neurones d’hippocampe (**Figure 3 ; B**). Le motif cAPP ne permet donc pas de cibler le compartiment axonal dans nos observations.

La synaptophysine est une glyco-protéine des vésicules synaptiques. Elle est donc présente de façon ubiquitaire à la synapse (Calhoun et al., 1996). L’utilisation de la séquence de la synaptophysine (SYP) dans la partie 1.3 a démontré que la synaptophysine était bien exprimée au niveau des synapses des rétino-thalamiques. SYP pourrait donc permettre de restreindre l’expression de cAMP-sponge à proximité des synapses, ou au compartiment axonal. La séquence de SYP a donc été fusionnée à cAMP-sponge, en suivant la même stratégie que pour les autres séquences de ciblage (**Figure 3 ; C**).

Conclusion

Dans l’ensemble, les résultats présentés ici décrivent des motifs ADN permettant de cibler spécifiquement le compartiment somato-dendritique des neurones. Ces motifs ADN, NLG et Kv2.1, encodés génétiquement, peuvent être transfectés *in vitro* ou électroporés *in vivo*. Grâce à ces motifs ADN, l’expression de cAMP-sponge serait restreinte au compartiment somato-dendritique. Ces nouveaux outils pourront ainsi permettre de mieux comprendre les signaux AMPc situés spécifiquement au niveau du soma. De plus, l’expression de Kv2.1 est restreinte au soma et aux dendrites proximales, tandis que NLG cible l’ensemble du compartiment somato-dendritique. Ces résultats sont en accord avec la littérature (Wu et al., 2013).

La séquence de cAPP, en revanche, n’a pas permis de cibler le compartiment axonal, comme indiqué dans de précédentes observations (Padmanabhan et al., 2013). Dans notre étude, la séquence de cAPP a été insérée en C-terminal de la séquence de cAMP-sponge. Lorsque les propriétés de ciblage du compartiment axonal par cAPP ont été décrites, cAPP avait été inséré en N-terminal de la protéine rapportrice (Padmanabhan et al., 2013). Cette erreur dans le clonage de la construction ADN pourrait expliquer que cette séquence n’ait pas permis de cibler l’axone. La construction ADN codant pour cAPP-cAMP-sponge, dans laquelle

cAPP est inséré en N-terminal de cAMP-sponge, est en cours de clonage. D'autres motifs ADN, décrits précédemment, pourraient cibler préférentiellement le compartiment axonal des neurones ; comme GAP43, un motif de palmitoylation (Padmanabhan et al., 2013), ou la SYP, exprimée directement au niveau de la synapse (Calhoun et al., 1996). Les mécanismes de coopération dépendants de l'AMPc, décrits précédemment (Louail et al., en préparation), pourraient dépendre de la modulation de la transmission rétino-thalamique glutamatergique. La restriction de cAMP-sponge au compartiment axonal permettrait d'étudier cette hypothèse.

RESULTATS ANNEXES

Pendant le développement de la connectivité rétinienne, les axones des CGR cheminent depuis la rétine jusqu'au CS en envoyant une branche dans le thalamus (Dhande et al., 2011). Il est largement établit que les axones rétiniens envoient une branche collatérale innervant le CGLd (Dhande et al., 2011) puis poursuivent leur trajet jusqu'au CS. Néanmoins, durant mes travaux de thèse, j'ai pu observer à P15 dans des conditions contrôles, certains axones envoyant des branches collatérales multiples pour innerver le CGLd (**Figure 24**).

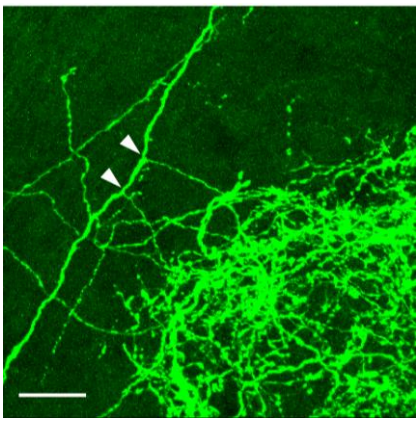


Figure 24 : Collatérales multiples dans le CGLd à P15. L'électroporation *in utero* d'axones rétiniens montre que certains présentent des branches collatérales multiples innervant le CGLd à P15. Barre d'échelle 10 µm.

PARTIE 1 : Interactions entre CGR ipsi-latérales dépendantes de l'AMPc

Les CGR dans lesquelles les mécanismes coopératifs ont été mis en évidence précédemment sont localisées dans la partie ventro-temporale de la rétine. Elle arborisent donc à proximité directe du territoire ipsi-latéral et sont ainsi directement impliquées dans la compétition binoculaire. Des CGR ipsi-latérales voisines ont également été électroporées *in utero* dans certains animaux décrits dans la section Résultats, partie 1 (Louail et al., en préparation) ; leur organisation dans le CGLd ipsi-latéral a été observée. Dans les conditions contrôles (ControlZaic), les axones exprimant les deux protéines fluorescentes arborisent toutes dans une région assez restreinte (**Figure 25**), correspondant à la localisation présumée du territoire ipsi-latéral. De plus, les branches axonales semblent bien regroupées, comme dans le CGLd de l'autre hémisphère. Chez les souris électroporées avec SpongeZaic, la surface recouverte par les arborisations axonales des CGR exprimant la CFP, dans lesquelles la signalisation AMPc n'est pas perturbée, semble être réduite (**Figure 25 ; B-C**). Comme nous l'avons décrit dans le CGLd de l'autre hémisphère, la surface recouverte par les arborisations des CGR dans lesquelles l'AMPc est bloqué ne paraît pas affectée (**Figure 25 ; A,C**). Les

arborisations axonales des CGR ipsi-latérales seraient donc affectées par le blocage de l'AMPc dans leurs voisines.

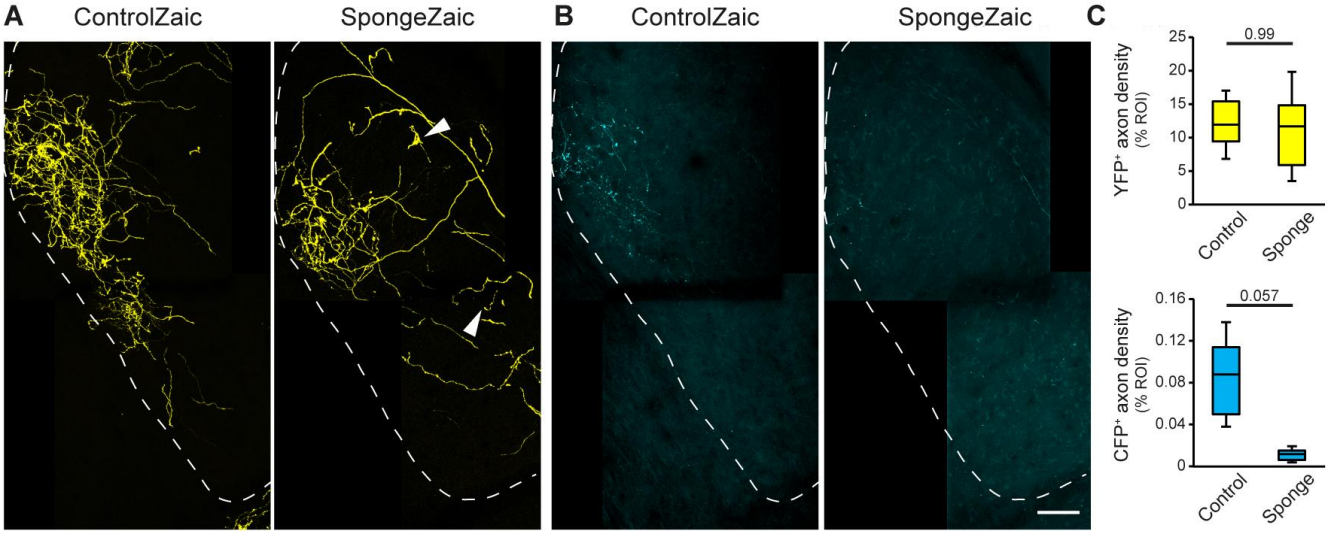


Figure 25 : Le développement des arborisations axonales des CGR ipsi-latérales semble affecté par le blocage de l'AMPc dans leurs voisines. Projections rétino-colliculaires exprimant la YFP **(A)** ou la CFP **(B)** à P15 de souris électroporées *in utero* avec ControlZaic (gauche) ou SpongeZaic (droite). Les flèches montrent des axones arborisant en dehors du territoire ipsi-latéral présumé. La ligne pointillée indique le contour du CGLd. **(C)** La quantification de la densité d'axones YFP (haut) ou CFP (bas) montre une diminution de la quantité d'axones CFP chez les souris SpongeZaic. Les valeurs des tests statistiques (Mann-Whitney) sont indiquées sur les graphiques. Barre d'échelle 50 µm. ControlZaic, n=4 ; SpongeZaic, n=3.

Les mécanismes coopératifs entre CGR décrits dans les CGR contra-latérales semblent être également présents dans les CGR ipsi-latérales. Néanmoins, l'électroporation ne cible qu'un nombre très restreint de cellules et la proportion de CGR ipsi-latérale est faible chez la souris (5 %) (Petros et al., 2008). Ces résultats devraient donc être confirmés pour pouvoir conclure incontestablement à la présence d'une coopération dans les CGR ipsi-latérales.

PARTIE 2 : Intensité des mécanismes coopératifs

Les mécanismes de coopération entre CGR décrits précédemment pourraient varier en fonction du nombre de cellules ayant une signalisation AMPc perturbée. La stratégie Zaic,

permettant l'étude de ces phénomènes coopératifs, est basée sur le système de recombinaison homologue. La variation du nombre de CGR exprimant la Cre recombinase (Cre) permettrait de mieux comprendre l'intensité de ces interactions entre neurones rétiniens. Le nombre de cellules ganglionnaires exprimant le bloqueur de l'AMPc peut être modulé en fonction de la quantité d'ADN codant pour la Cre utilisée lors de l'électroporation *in utero*. Ainsi, il est possible de moduler le nombre de neurones dans lesquels la signalisation AMPc est perturbée. Cette méthode permet d'évaluer la quantité minimale de CGR ayant cette signalisation bloquée nécessaire pour observer un raffinement excessif des axones de leurs voisines.

Dans la stratégie Zaic, décrite précédemment, l'électroporation *in utero* de 0.01 µg/µL au lieu de 0.1 µg/µL de pCAG-Cre permet de réduire considérablement le nombre de corps cellulaires exprimant la YFP dans la rétine à P15 (**Figure 26 ; A**). Dans le chiasma optique et le CGLd à P15, le nombre d'axones est également réduit (**Figure 26 ; B-C**). L'électroporation de 1/10 de Cre diminue bien le nombre de CGR exprimant la YFP et ainsi permettra de réduire la quantité de CGR exprimant Lyn-cAMP-Sponge suite à l'électroporation de SpongeZaic.

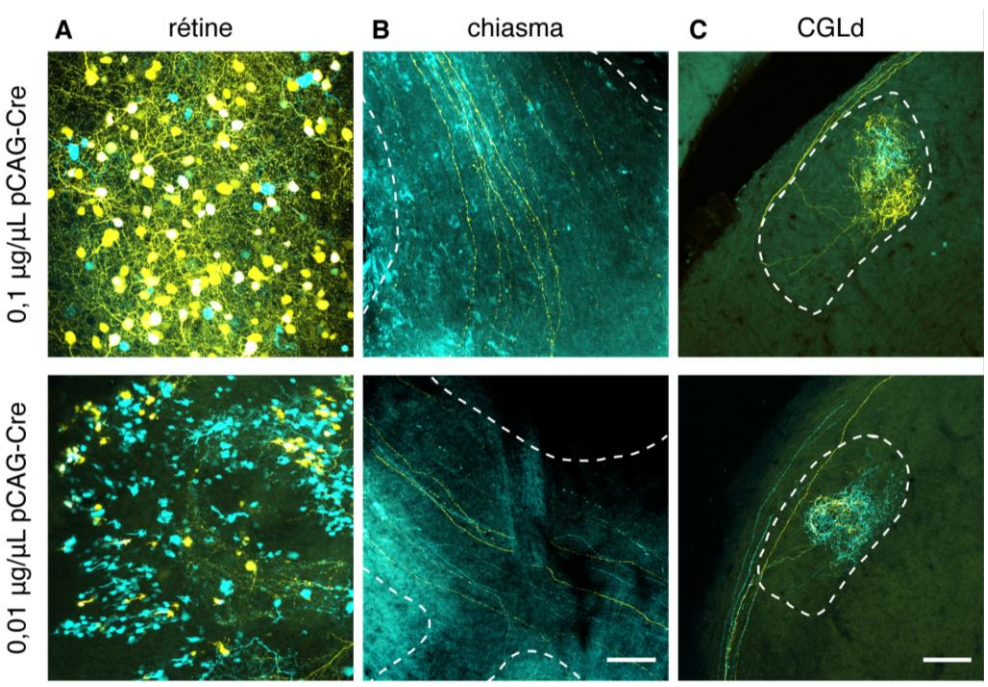


Figure 26: Le nombre de CGR exprimant la YFP dépend de la dose de Cre utilisée dans la stratégie Zaic. L'électroporation *in utero* de ControlZaic et 0,1 µg/µL (haut) ou 0,01 µg/µL (bas) de Cre influe sur le nombre de CGR observées à P15. **(A)** Mosaïque de CGR dans les rétines à P15. Le nombre des CGR exprimant la YFP est réduit avec 0,01 Cre. **(B)** Axones YFP et CFP navigant dans les chiasmas optiques à P15. **(C)** Arborisations axonales des CGR YFP et CFP dans les CGLd à P15. La ligne pointillée désigne **(B)** le chiasma optique ou **(C)** les limites du CGLd. Barre d'échelle : A, B, 50 µm ; C, 100 µm. n=3.

L'aire recouverte par les arborisations axonales des CGR a donc été mesurée dans le CGLd de ces animaux (**Figure 27**). Les CGR exprimant la CFP pourraient être une nouvelle fois affectées par le blocage de la

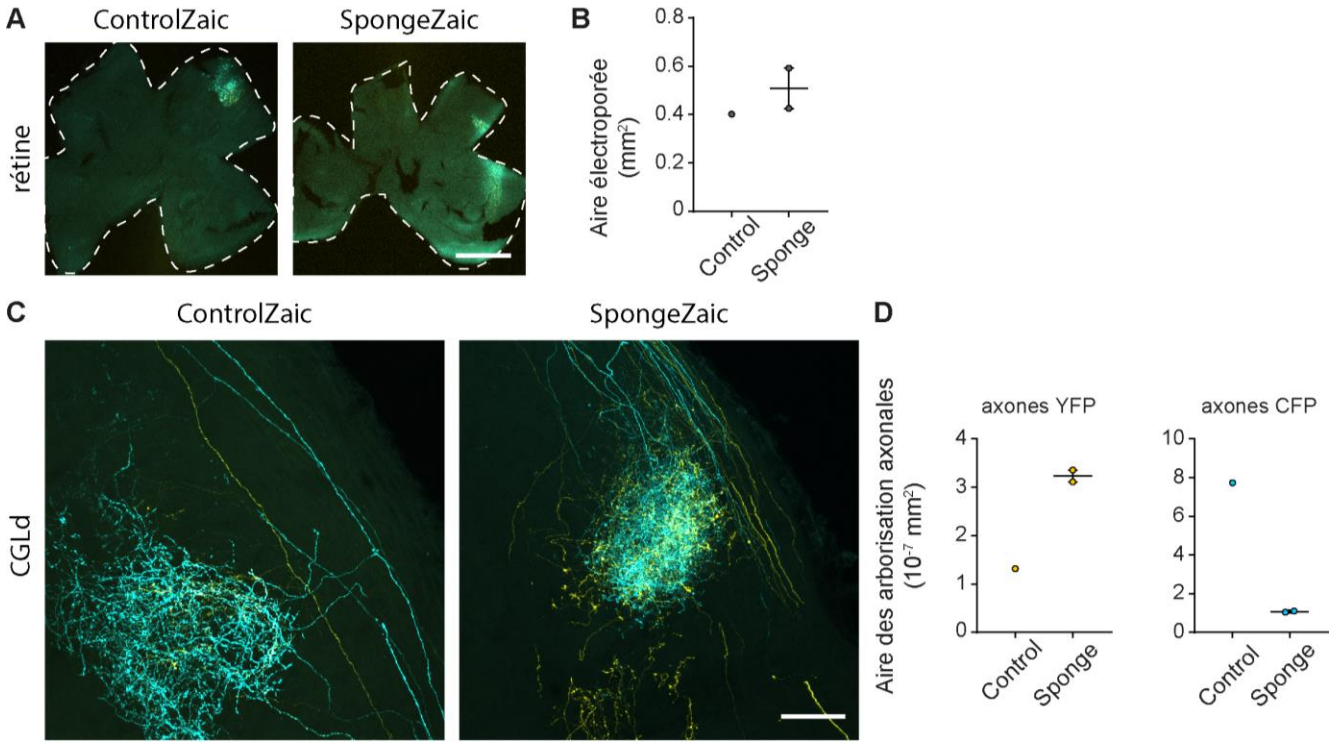


Figure 27: Arborisations axonales des CGR électroporées avec la stratégie Zaic et 1/10 de Cre. (A) Rétines électroporées *in utero* avec ControlZaic ou SpongeZaic et 0,01 µg/µL de Cre dans la partie ventro-temporale. **(B)** La taille de la région électroporée est similaire chez les souris électroporées avec ControlZaic ou SpongeZaic. **(C)** Projections rétiniennes exprimant YFP ou **(D)** CFP dans le CGLd contra-latéral à P15, chez des souris ControlZaic ou SpongeZaic. La ligne pointillée délimite le contour de la rétine. Barres d'échelle : A, 1 mm ; C, 50 µm. ControlZaic, n=1 ; SpongeZaic, n=3. Les données représentent la moyenne ± sem.

signalisation AMPc dans leurs voisines, même quand celles-ci sont beaucoup moins nombreuses. En revanche, ces observations sont très préliminaires. De plus, il n'y a que très peu de CGR exprimant la YFP dans l'unique cas contrôle (**Figure 27**), alors que la taille de l'électroporation n'est pas différente de celle des animaux SpongeZaic (**Figure 27**). La proportion de CGR exprimant la YFP est particulièrement faible et même plus basse chez les animaux ControlZaic que chez les animaux SpongeZaic. La recombinaison du plasmide ControlZaic pourrait avoir été perturbée dans cet animal, ce qui concorderait avec le nombre anormalement faible de CGR exprimant la YFP. Ces résultats devront donc être confirmés pour pouvoir conclure quant au nombre de CGR avec une signalisation AMPc perturbée requis pour observer une perturbation de la connectivité de leurs voisines.

PARTIE 3 : Impact du blocage de l'activité de quelques CGR sur le développement global de la carte binoculaire

Afin de déterminer si le blocage de l'activité de certaines CGR perturbe globalement le développement de la carte binoculaire, la stratégie Zaic a été une nouvelle fois combinée avec le traçage antérograde de l'ensemble projections rétiniennes. Les résultats décrits ici pourraient suggérer que l'aire recouverte par l'ensemble des projections de l'œil électroporé serait plus grande que celle du territoire des axones de l'autre œil chez les animaux KirZaic (**Figure 28 ; A-B**). Le blocage de l'activité électrique dans de rares CGR pourrait donner un avantage compétitif aux autres CGR de cet œil, de façon assez surprenante.

Les axones sans activité électrique sont affectés très tôt dans leur développement, puisque qu'ils n'envahissent pas le CGLd aussi loin que les contrôles. Par ailleurs, les axones CFP, voisins de ceux dont l'activité électrique est perturbée, pourraient envahir le CGLd légèrement plus loin suite au blocage de l'activité électrique dans leurs voisines (**section Résultats, Partie 2, Figure 3**). Ainsi, l'absence des axones dont l'activité électrique est perturbée très tôt pendant le développement pourrait donner un avantage compétitif aux CGR restantes, dont l'activité électrique n'est pas affectée. L'activité des CGR n'exprimant pas Kir2.1, elle, est toujours corrélée à celle de leurs voisines, toutes les cellules qui n'ont pas été électroporées avec la stratégie Zaic. La méthode de traçage antérograde grâce à la CtB permet d'observer les axones de l'ensemble des CGR dans le CGLd. Ces CGR, dont l'activité électrique n'a pas été perturbée par l'expression de Kir2.1, sont toujours synchrones, leurs connexions seraient donc stabilisées dans le CGLd. Elles pourraient ainsi prendre la place normalement occupée par les projections des CGR exprimant Kir2.1, qui sont ici absentes. Cette hypothèse pourrait expliquer l'avantage compétitif de l'œil électroporé avec KirZaic. Ces observations préliminaires ne concernent en revanche qu'un seul animal électroporé avec KirZaic. Des expériences sont en cours pour augmenter le nombre d'individus et valider ces résultats.

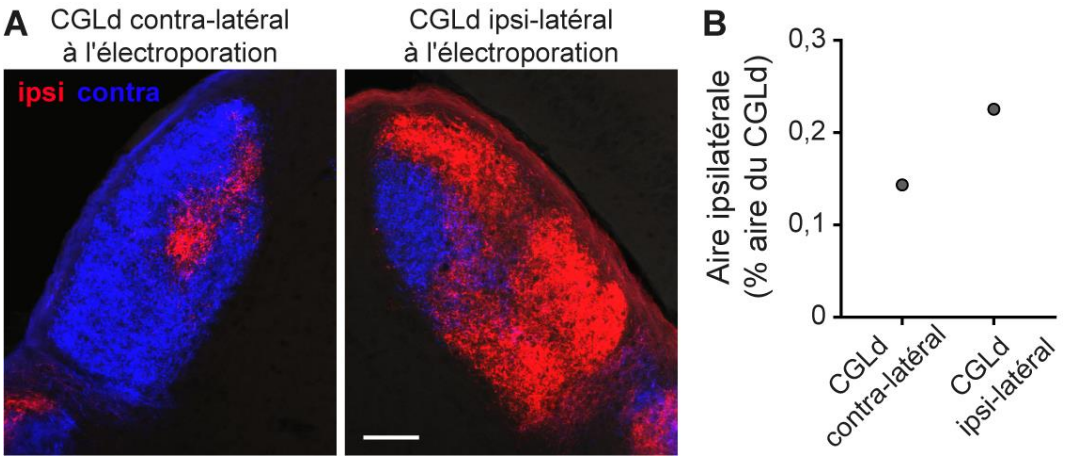


Figure 28: Le blocage mononucléaire de l'activité électrique dans quelques CGR pourrait donner un avantage compétitif à cet œil. (A) Sections coronales de CGLd à P15 de souris électroporées avec KirZaic. Les territoires ipsi-latéral (rouge) et contra-latéral (bleu) sont observables grâce à la CtB. **(B)** L'œil électroporé avec KirZaic semble avoir un territoire plus important que l'autre œil chez les animaux KirZaic. Barres d'échelle : 100 µm. n=1. Les données représentent la moyenne ± sem.

DISCUSSION

1. Le développement des projections rétiniennes en l'absence d'AMPc

Dans les résultats décrits précédemment (Louail et al., en préparation), la surface couverte par les arborisations axonales des CGR dans lesquelles la signalisation AMPc est directement perturbée n'est pas réduite, ce qui est assez surprenant. En effet, le rôle de l'AMPc dans le développement des projections visuelles a été décrit en détail. L'injection monoculaire d'AMPc augmente la taille du territoire couvert par les projections de cet œil (Stellwagen and Shatz, 2002). En outre, la délétion génétique d'AC1 empêche la ségrégation binoculaire et entraîne des défauts de rétinotopie (Nicol et al., 2006a; Ravary et al., 2003). Ces premières observations suggèrent que l'AMPc stabilise les arborisations axonales des CGR. En revanche, l'expression de Lyn-cAMP-sponge, le même bloqueur de la signalisation AMPc que celui utilisé dans nos résultats, empêche les axones des CGR de se rétracter en réponse à l'éphrine *in vitro* (Averaimo et al., 2016). De plus, l'expression *in vivo* de Lyn-cAMP-Sponge perturbe le raffinement des axones rétiniens : les CGR ont des branches axonales surnuméraires, qui dépassent leur zone de terminaison dans le CS (Averaimo et al., 2016).

L'expression de Lyn-cAMP-sponge par les CGR dans la stratégie Zaic (Louail et al., en préparation) pourrait empêcher leur rétraction ou le raffinement des branches axonales ectopiques dans le CGLd. La morphologie des axones exprimant Lyn-cAMP-sponge est inhabituelle dans le CGLd contra-latéral (Louail et al., en préparation). Le diamètre de ces banches axonales semble beaucoup plus fin que celui des axones contrôles et ne paraît pas homogène, comme si les branches étaient par endroit globuleuses. De plus, dans les conditions contrôles, les arborisations axonales des projections électroporées semblent exclues de la région correspondant au territoire des axones ipsi-latéraux. Les axones exprimant Lyn-cAMP-sponge (et la YFP), eux, ne paraissent pas laisser le territoire ipsi-latéral vacant. D'ailleurs, dans les observations combinées au traçage antérograde, certaines arborisations des projections exprimant Lyn-cAMP-sponge sont localisées à l'intérieur du territoire recouvert par les axones de l'autre œil. De la même façon, lorsque les GCR exprimant Lyn-cAMP-sponge projettent dans le CGLd ipsi-latéral, certains axones sont retrouvés arborisant en dehors de la localisation présumée du territoire correspondant à leur œil d'origine (**section Résultats**

annexes - **Figure 25 ; B**). Ces résultats sont en accord avec des défauts de rétraction et/ou de raffinement de la connectivité des axones rétiniens.

2. Le développement des synapses dans les mécanismes coopératifs

Les mécanismes de coopération entre CGR voisines décrits précédemment ne perturbent pas la propagation des vagues d'activité spontanée dans la rétine (Louail et al., en préparation). Ces résultats suggèrent que les niveaux d'AMPc dans les somas des CGR, localisés au sein de la rétine, ne sont pas affectés. De plus, cette co-stabilisation de branches axonales participe à l'étape de raffinement des axones rétiniens dans le CGLd et pourrait ainsi impliquer le développement des synapses rétino-thalamiques.

2.1. Morphologie des synapses

Le marquage des synapses rétino-thalamiques des CGR voisines de celles dont la signalisation AMPc est perturbée suggère que la morphologie des synapses est altérée (**section Résultats, Partie 1.3**). Ainsi, la surface et la densité des synapses pourraient être réduites dans ces axones (**section Résultats, Partie 1.3, Figure 2**). Il a été montré précédemment que pendant le raffinement fonctionnel des synapses, la taille des boutons pré-synaptiques augmente et les synapses se regroupent (Hong et al., 2014). Le blocage de la signalisation AMPc dans les CGR pourrait donc affecter le développement des synapses de leurs voisines. Ces résultats ne concernent en revanche qu'un seul animal dans lequel la signalisation AMPc a été perturbée. Des expériences sont en cours pour augmenter le nombre d'individus et valider ces résultats.

Comme il en a été discuté précédemment (**section Discussion, Partie 1**), la morphologie des axones ayant une signalisation AMPc perturbée est inhabituelle dans le CGLd à P15. De plus, certains de ces axones pourraient arboriser en dehors du territoire appartenant aux projections de leur œil. Il a par ailleurs été montré que les axones exprimant cet outil présentaient des défauts de raffinement de leurs branches axonales dans le CS *in vivo* (Averaimo et al., 2016). Afin de mieux comprendre le phénotype observé dans les axones dont la signalisation AMPc est perturbée, il serait intéressant de marquer directement les synapses de ces CGR. Les données de la littérature ont établi le rôle de l'AMPc dans la régulation de la taille et de la ségrégation des territoires œil-spécifiques (Nicol et al., 2006a; Ravary et al., 2003; Stellwagen and Shatz, 2002). De plus, la délétion d'AC1 a montré que cette enzyme était requise dans les CGR pour la formation de la zone de terminaison axonale et l'élimination des branches collatérales ectopiques (Dhande et al., 2012). En revanche, la morphologie des synapses des CGR dans un contexte de perturbation de la signalisation AMPc, au sein des radeaux lipidiques, n'a pas été directement évaluée. L'étude des synapses des CGR exprimant Lyn-cAMP-sponge dans la stratégie Zaic permettrait d'examiner le rôle de cette signalisation AMPc sur le développement des synapses.

2.2. Transmission synaptique

Les mécanismes coopératifs entre CGR, qui se produisent lors du raffinement de la connectivité, pourraient donc affecter la morphologie des synapses rétino-thalamiques. De plus, l'activité des CGR au sein de la rétine n'est pas affectée dans nos observations. Il est donc envisageable que la transmission synaptique des CGR soit impliquée dans la diminution des arborisations axonales des CGR voisines de celles dont la signalisation AMPc est perturbée.

La transmission synaptique s'effectue grâce à la libération de vésicules au niveau des terminaisons axonales. L'entrée de calcium suite à un potentiel d'action permet l'exocytose des vésicules synaptiques (Sudhof, 2004). Il a récemment été montré que la libération de glutamate

par les CGR ipsi-latérales était nécessaire à l'élimination des axones de l'autre œil du territoire ipsi-latéral (Koch et al., 2011). De plus, bien que les auteurs ne reportent pas de défaut de taille du territoire recouvert par les axones ipsi-latéraux (dans lesquels la transmission glutamatergique est inhibée), les projections semblent moins denses que dans les conditions contrôles. Par ailleurs, une autre étude récente a confirmé la nécessité de la libération synaptique pour le développement des cartes visuelles (Assali et al., 2017). Dans cette étude, la délétion conditionnelle de Rim1/2 induit des défauts tant de ségrégation que de rétinotopie. Les protéines Rim sont des protéines d'échafaudage de la zone active de la membrane plasmique et sont impliquées dans la fusion des vésicules synaptiques à la membrane plasmique (Dulubova et al., 1999). En revanche, des données *in vitro* ne semblent pas impliquer la libération synaptique dans le développement des projections visuelles. Dans un système de co-culture *in vitro* de rétines, dont l'exocytose des vésicules synaptiques est abolie (Munc18-KO), avec des CS contrôles ; la topographie des axones rétiniens n'est pas affectée (Nicol et al., 2007).

Les données de la littérature ne permettent donc pas de conclure quant au rôle de la libération synaptique dans le développement des projections rétiniennes. L'implémentation de la stratégie Zaic dans ces mutants conditionnels chez lesquels la libération synaptique est inhibée, permettrait d'étudier plus en détail le rôle de la libération synaptique des axones rétiniens. De plus, cette stratégie permettra également de déterminer si la transmission synaptique joue un rôle dans les mécanismes coopératifs entre CGR.

3. Rôle du compartiment axonal dans la coopération entre CGR

3.1. Signaux axonaux d'AMPc

Des signaux locaux d'AMPc dans les neurones ont été décrits précédemment : dans des neurones d'hippocampe, l'augmentation de la concentration locale d'AMPc dans un seul

neurite induit la formation de l'axone. Cette augmentation locale d'AMPc et accompagnée de la diminution des niveaux d'AMPc dans les autres neurites, qui deviennent des dendrites (Shelly et al., 2010). Ces résultats constituent la première observation de signaux axonaux d'AMPc.

Dans la coopération entre CGR décrite suite au blocage épars de la signalisation AMPc le raffinement des arborisations axonales des CGR est perturbé suite au blocage de la signalisation AMPc dans les CGR adjacentes. En revanche, la propagation des vagues rétiniennes spontanées n'est pas affectée. Or, il a été montré que la propagation de ces vagues d'activité calcique spontanée dépend de la signalisation AMPc (Stellwagen et al., 1999). L'injection monoculaire d'agents pharmacologiques augmentant la concentration d'AMPc provoque une expansion du territoire de cet œil et la propagation des vagues d'activité spontanée est perturbée (Stellwagen and Shatz, 2002). Dans cette étude chez le furet, les niveaux d'AMPc ont été augmentés directement par des injections dans l'œil et la ségrégation binoculaire n'est pas affectée. L'augmentation de la concentration d'AMPc aurait pu rester confinée dans la partie des CGR en contact avec la solution. Par ailleurs, l'ensemble des cellules de la rétine est resté en contact avec ces agents pharmacologiques pendant 8 jours. Les niveaux d'AMPc auraient ainsi pu être augmentés dans plusieurs types de cellules rétiniennes, notamment les cellules amacrines. Dans une autre étude, la signalisation AMPc a été inhibée grâce à la délétion génétique de AC1. Dans ce modèle, la rétinotopie et la ségrégation binoculaire sont perturbées (Nicol et al., 2006b; Ravary et al., 2003). Le blocage de la signalisation AMPc dépend ici de la localisation de AC1.

On peut envisager que des signaux AMPc localisés dans les corps cellulaires des CGR ne seraient pas affectés par Lyn-cAMP-sponge et que des signaux AMPc localisés spécifiquement en dehors du compartiment somatique pourraient jouer un rôle dans les mécanismes coopératifs. De plus, il a été montré que l'activation de la PKA dans le compartiment pré-synaptique est requise pour l'induction de la LTP dans les neurones de cervelet *in vitro* (Linden, 1999).

3.2. Traduction locale de protéines

De nombreuses études ces deux dernières décennies, tout particulièrement dans les neurones, ont montré que la traduction de protéines pouvait s'effectuer en dehors du compartiment axonal (*e.g*. Cioni et al., 2018). Les neurones sont des cellules hautement polarisées et leur morphologie complexe crée des compartiments biologiques distincts importants pour la fonction du neurone (Hanus and Schuman, 2013). Des études par hybridation *in situ* ont montré qu'entre 1000 et 4500 ARNm (ARN messagers) étaient présents dans les axones en croissance (Zivraj et al., 2010) et environ 2500 dans les dendrites (Cajigas et al., 2012). L'ARN peut être transporté à des localisations subcellulaires spécifiques et pourrait donc contribuer à la compartimentation des signaux neuronaux. Cette localisation spatiale des ARNm permet la traduction de protéines directement là où elles sont nécessaires à la cellule (Holt and Schuman, 2013). De plus, les composants de la machinerie permettant la traduction de protéine sont présents dans les axones pendant le développement et à l'âge adulte (Batista and Hengst, 2016). D'ailleurs, plusieurs études ont montré que la synthèse locale de protéine était à la base des mécanismes d'adaptation du cône de croissance, de réponse aux molécules de guidage et de changement de direction des axones (Leung et al., 2006; Ming et al., 2002; Piper and Holt, 2004; Yao et al., 2006). Enfin, il a également été montré dans des neurones hippocampaux *in vitro*, que les protéines SNAP25 et β-caténine (impliquées dans l'exocytose des vésicules synaptiques) étaient rapidement synthétisées localement et étaient permettaient la formation des sites pré-synaptiques (Batista and Hengst, 2016; Taylor et al., 2013).

Dans le système visuel, une étude a montré que certains ARNm, traduits directement au niveau de l'axone des CGR, codaient pour des protéines dont l'axone avait besoin à ce moment du développement (Shigeoka et al., 2016). Les ARNm axonaux sont globalement les mêmes que ceux présents dans le soma, mais ceux dont la fonction axonale a déjà été décrite sont enrichis. De plus, le translatome de l'axone est modifié pendant les différentes étapes du développement : des ARNm codant pour des gènes régulant l'élongation des axones entre E17,5 et P0 ; pour le remodelage des axones et des synapses à P7,5 ; pour la neurotransmission à l'âge adulte et enfin pour la survie et la dégénération axonale chez des

animaux plus âgés (Shigeoka et al., 2016). Les ARNm sont également présents au niveau des branchements axonaux des CGR et nécessaires à leur formation *in vivo* (Wong et al., 2017).

Enfin, il a été montré que l'ARNm codant pour CREB, un facteur de transcription activé en présence d'AMPc, était présent dans l'axone de neurones de ganglions des racines dorsales *in vitro* (Cox et al., 2008). CREB est ensuite transporté vers le noyau, où il active la transcription de nombreux gènes. L'expression de CREB dans le thalamus visuel et son rôle dans la formation des circuits visuels ont été démontrés précédemment (Pham et al., 2001).

Les mécanismes coopératifs, dépendants de l'AMPc décrits précédemment pourraient donc être sous-tendus par des modifications locales des ARNm et de leur traduction. Afin de répondre rapidement à des signaux provenant des axones adjacents, les projections des CGR pourraient traduire différentes protéines directement au niveau de l'axone. A cette période du développement, les ARNm présents au niveau de l'axone des CGR sont déjà majoritairement ceux codant pour le remodelage des axones et des synapses.

4. Autres mécanismes potentiellement impliqués dans les mécanismes coopératifs

4.1. Signalisation rétrograde

Les principaux acteurs de la signalisation rétrograde sont les endocannabinoïdes (CB). Suite à l'activation du neurone post-synaptique, les CB sont produits et libérés grâce à l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} et/ou à l'activation des récepteurs couplés à la protéine G (RCPG). Les CB se fixent ensuite sur leurs récepteurs (CB1R et CB2R) situés sur l'élément pré-synaptique. Ces CB peuvent réguler la transmission synaptique en influençant la dépression à court terme (STD) et à long terme (LTD), pouvant conduire à

l'élimination de synapses (*e.g*. Ohno-Shosaku and Kano, 2014). Les récepteurs aux endocannabinoïdes font partie de la famille des RCPG et sont souvent couplées à la sous-unité inhibitrice de la protéine G (Howlett and Fleming, 1984). De plus, il a été montré que l'activation des CB1R inhibe des AC transmembranaires et induit une diminution de la concentration d'AMPc (Howlett and Fleming, 1984). De plus, les CBR sont fréquemment couplés à la sous-unité inhibitrice de la protéine G, qui inhibe spécifiquement un certain nombre d'AC, notamment celles dépendantes du Ca^{2+}. Ces AC dépendantes du Ca^{2+} sont localisées dans le compartiment membranaire dans lequel les signaux AMPc nécessaires aux interactions entre CGR sont localisés (les radeaux lipidiques).

Les récepteurs aux endocannabinoïdes sont exprimés dans la rétine, dans les cellules ganglionnaires et dans leurs axones (Buckley et al., 1997; Lalonde et al., 2006). CB2R est exprimé le long du trajet rétino-thalamique et exerce un effet négatif sur le guidage axonal (Duff et al., 2013). CB1R est également exprimé dans le CGLd chez le singe vervet ou le macaque (Eggan and Lewis, 2007; Javadi et al., 2015). L'utilisation d'un agoniste de CB1R dans des CGR *in vitro* a montré que les courants calciques voltage-dépendants sont inhibés par les endocannabinoïdes (Lalonde et al., 2006). Il a également été montré que la libération de GABA ou de glutamate peut être modulée par les CB dans la rétine, l'hippocampe et le cervelet (Diana et al., 2002; Middleton and Protti, 2011; Wilson and Nicoll, 2001). Dans le thalamus visuel du rongeur, l'activation de CB1R a mis en évidence deux populations distinctes de cellules : des effets excitateurs suite à l'activation de CB1R sur environ 28 % des cellules et inhibiteurs sur environ 72 % des cellules (Dasilva et al., 2012). En outre, les cellules dont l'activité est inhibée par CB1R présentent une activité spontanée plus forte que celles qui sont excitées par CB1R. Ces données dans l'ensemble suggèrent que la signalisation CB pourrait jouer un rôle primordial dans le contrôle de la balance excitation/inhibition (balance E/I), soit la contribution relative des synapses excitatrices et inhibitrices reçues par un neurone. Elle serait essentielle pour maintenir la fonction des réseaux neuronaux (Liu, 2004). Enfin, il a été montré que l'activation de CB2R peut moduler l'activation des cellules microgliales en réponse à un traumatisme (Zarruk et al., 2011), ce qui pourrait augmenter leur englobement des synapses et ainsi l'élimination de synapses.

La balance E/I peut également être modulée par les interneurones inhibiteurs. Ces interneurones sont répartis de façon homogène dans le CGLd à la fin de la deuxième semaine post-natale (Golding et al., 2014) et leur nombre augmente de P5 à P21 (Charalambakis et al., 2019). De plus, la taille de leur soma, le nombre de branches et la surface recouverte par ces interneurones sont particulièrement élevés de P7 à P28 (Charalambakis et al., 2019), de façon concomitante avec la période de raffinement actif de la connectivité rétino-thalamique.

L'étape de raffinement des projections rétiniennes semble donc impliquer une signalisation rétrograde provenant des cibles visuelles (Charalambakis et al., 2019; Lalonde et al., 2006). Cette signalisation rétrograde influe sur la stabilisation des contacts synaptiques et ainsi sur l'élimination de terminaisons axonales (Ohno-Shosaku and Kano, 2014). Les CGR expriment les récepteurs aux CB et leur transmission synaptique peut être modulée par les CB (Lalonde et al., 2006). Ainsi, ce rétro-contrôle provenant du thalamus pourrait jouer un rôle fondamental dans les mécanismes coopératifs décrits dans ce travail de thèse, qui se déroulent pendant le raffinement de la connectivité.

Les mécanismes coopératifs décrits dans ces travaux de thèse se déroulent pendant le raffinement des projections visuelles, lorsque les synapses sont déjà établies mais sont soumises à une étape de stabilisation ou élimination. La perturbation de la signalisation AMPc dans certaines CGR pourrait induire une modification de la transmission rétino-thalamique et ainsi affecter les CB libérés par les neurones thalamiques. Ces CB libérés par les neurones post-synaptiques pourraient jouer un rôle sur l'élimination des des arborisations axonales des CGR voisines de celles dont l'AMPc est perturbé. Il est ainsi envisageable que la signalisation rétrograde provenant des neurones thalamiques puisse jouer un rôle dans les mécanismes coopératifs entre CGR.

4.2. Microglie

Les cellules microgliales sont présentes dans tout le système visuel et leurs ramifications sont en contact direct avec les épines dendritiques en cours de maturation (Tremblay et al., 2010). De plus, dans le thalamus, la microglie englobe également les terminaux pré-synaptiques des CGR, de façon activité-dépendante. Cet englobement des synapses est maximal à P5, pendant le raffinement des connexions (Schafer et al., 2012). Dans l'hippocampe, la microglie englobe activement les terminaux synaptiques et joue un rôle déterminant dans le raffinement de ces synapses (Paolicelli et al., 2011). L'utilisation d'agents pharmacologiques pour augmenter ou réduire l'activité d'un œil a mis en évidence que la microglie englobait préférentiellement les terminaux provenant de l'œil le moins actif (Schafer et al., 2012). Ces manipulations de l'activité relative des deux yeux ont déjà montré que ces projections provenant de l'œil le moins actif étaient réduites dans le thalamus (Huberman et al., 2008; Penn et al., 1998; Stellwagen and Shatz, 2002). Ces données sont en accord avec l'hypothèse d'un rôle primordial des microglies dans le raffinement des connexions visuelles. En outre, la perturbation du nombre ou de la fonction des microglies dans le cerveau induit des défauts majeurs dans l'organisation des projections visuelles (Stevens et al., 2007).

Des études ont également montré que les microglies sont capables d'exprimer les récepteurs et de répondre *in vitro* à certains neurotransmetteurs comme le GABA ou le glutamate (*e.g*. Schafer et al., 2013). De plus, la transmission glutamatergique par les CGR augmente la motilité des ramifications microgliales *in vitro* (Fontainhas et al., 2011). En revanche, des résultats discordants ont été obtenus sur des tranches d'hippocampes *in vitro*. L'induction de la potentialisation à long terme (LTP) augmente la transmission synaptique et induit une réduction du mouvement des microglies (Grinberg et al., 2011). Malgré ces divergences, ces données démontrent dans l'ensemble l'importance des cellules microgliales dans les mécanismes de raffinement de la connectivité neuronale. Par ailleurs, les microglies du cortex visuel (V1) sont en contact direct avec les épines dendritiques et les terminaux synaptiques (Tremblay et al., 2010). Cette étude a également mis en évidence que les épines dont la taille était réduite au contact de la microglie étaient souvent éliminées par la suite. Il reste encore à déterminer si la microglie joue un rôle passif ou actif dans ces mécanismes.

Les résultats décrits dans le paragraphe précédent, concernant une diminution de la motilité des cellules microgliales suite à l'induction d'une LTP (Grinberg et al., 2011), ont été obtenus suite à l'augmentation de la concentration d'AMPc. Ces données pourraient résulter de l'augmentation des niveaux d'AMPc dans les neurones et non directement de l'efficacité de la transmission synaptique. Ainsi, l'augmentation de la concentration d'AMPc dans les neurones pourrait réduire le mouvement des microglies. Cette hypothèse pourrait également suggérer que des niveaux réduits d'AMPc dans les neurones, ou les CGR, pourraient induire une augmentation de la motilité des microglies. De cette façon, les terminaux synaptiques des CGR seraient plus englobés par les microglies suite à la réduction des niveaux d'AMPc. En poursuivant ce raisonnement, la diminution des arborisations axonales des CGR observée suite au blocage de l'AMPc dans leurs voisines, pourrait être corrélée à une augmentation du nombre ou de la motilité des microglies, ou encore de leur englobement de synapses. Cette hypothèse devrait être étudiée pour mieux comprendre les procédés coopératifs, dépendants de l'AMPc, impliqués dans le raffinement de la connectivité.

5. Rôle de l'activité des CGR pendant le développement des projections rétiniennes

5.1. L'absence d'activité électrique dans les CGR perturbe le développement de leur connectivité

Les résultats présentés dans ces travaux démontrent que le blocage de l'activité électrique des CGR perturbe le développement de leur connectivité dès les deux premières semaines post-natales (**section Résultats, Partie 2**). Les axones de ces CGR sont éliminés du CGLd entre P3 et P15. De plus, il semble que les axones des CGR dont l'activité électrique est inhibée n'envahissent pas le CGLd aussi loin que leurs contrôles à P3.

Il a été reporté précédemment que l'expression de *Kir2.1* par les CGR ne perturbe pas leur guidage dans le cerveau, mais affecte le développement de leurs branches axonales (Benjumeda et al., 2013). Les auteurs ont décrit un élargissement de la zone de terminaison des axones exprimant *Kir2.1* dans le CS, mais il semble également que la densité de ces axones dans le CS soit réduite à P9. Nos résultats démontrent une diminution des arborisations axonales dans le CGLd à P15 (**section Résultats, Partie 2**) ; en accord avec cette diminution de la densité d'axones dans le CS à P9 (Benjumeda et al., 2013). Par ailleurs, chez les souris β2nAChR-KO, l'activité spontanée des CGR est abolie dans la rétine. Chez ces animaux, la manipulation est différente puisqu'ici toutes les cellules sont affectées ; tandis que dans le cas de l'électroporation de Kir2.1, seules quelques cellules n'ont pas d'activité électrique. Il a été montré que les défauts d'organisation des axones rétiniens des animaux β2nAChR-KO ne résultent pas de la phase de guidage et de positionnement à la bonne zone de terminaison, mais du raffinement des projections. Les axones β2nAChR-KO sont effectivement correctement ramifiés, mais leurs terminaisons sont plus larges, particulièrement dans le CS (Dhande et al., 2011). Ces données de la littérature sont donc en accord nos observations : l'inhibition de l'activité électrique des CGR perturbe le développement de leurs connexions dans les cibles visuelles primaires.

5.2. L'activité relative des CGR adjacentes pourrait instruire le développement de la connectivité rétinienne

Il a été montré que l'activité relative plutôt que absolue des deux yeux détermine la proportion de territoire recouverte par chaque œil dans le cerveau pendant le développement de la carte binoculaire. Dans cette étude, l'activité des deux yeux a été augmentée par l'injection monoculaire ou binoculaire d'agents pharmacologiques. Le développement des projections rétiniennes est affecté par la perturbation de l'activité relative entre les deux rétines, mais pas par l'augmentation de l'activité dans les deux rétines en même temps (Stellwagen and Shatz, 2002).

En revanche, l'importance de l'activité relative entre les CGR de la même rétine n'a pas été examinée jusqu'ici. En effet, la plupart des données de la littérature a décrit jusqu'ici des modèles dans lesquelles les modifications de l'activité étaient effectuées globalement dans toutes les CGR. Les premières expériences de blocage de l'activité rétinienne ont été effectuées grâce à la TTX, un bloqueur des canaux sodiques qui inhibe la formation des potentiels d'action. Ces agents pharmacologiques, injectés directement dans l'œil, agissent ainsi sur l'ensemble des cellules de la rétine. Cette inhibition de l'activité de toutes les cellules d'une rétine perturbe le développement des projections visuelles (Cook et al., 1999; O'Leary et al., 1986). Chez les souris β2nAChR-KO, l'activité des CGR est inhibée et l'organisation des projections visuelles est fortement perturbée, tant au niveau de la taille que de la ségrégation des territoires œil-spécifiques. Dans ces modèles, l'activité est bloquée dans l'ensemble des cellules exprimant β2nAChR ; dans la rétine, l'activité de toutes les CGR et des cellules amacrines est donc pratiquement abolie (Muir-Robinson et al., 2002; Rossi et al., 2001). Comme il a été décrit dans l'introduction, ces modèles ne permettent donc malheureusement pas de distinguer le rôle intrinsèque de l'activité de celui de la corrélation de l'activité entre CGR adjacentes.

Une première étude récente a utilisé une technique très proche de la nôtre pour perturber l'activité électrique dans un nombre restreint de CGR (Benjumeda et al., 2013). L'inhibition de l'activité des CGR induit une dispersion de leurs axones dans le CS à P9 (Benjumeda et al., 2013). Dans cette étude, l'activité électrique n'a été inhibée que dans quelques CGR grâce à l'électroporation *in utero* ; et seul le développement des arborisations axonales de ces axones a été examiné. Ainsi, contrairement aux études précédentes, l'activité n'est pas totalement inhibée dans la rétine ; mais ce ne sont que quelques CGR qui n'ont pas d'activité intrinsèque. La stratégie KirZaic ressemble beaucoup à la méthode utilisée par ces auteurs, mais permet en plus de visualiser les arborisations axonales des cellules dont l'activité électrique n'est pas perturbée. Les données obtenues suite à l'électroporation de KirZaic suggèrent que les axones qui n'expriment pas Kir2.1 ne sont pas affectés dans leur développement (**section Résultats, Partie 2**).

On ne sait donc pas encore totalement les mécanismes par le biais desquels l'activité des CGR influe sur le développement des projections visuelles et si ces phénomènes sont coopératifs ou non. D'ailleurs les blocages monoculaire et binoculaire de l'activité rétinienne induisent des défauts d'organisation des projections rétiniennes (Cook et al., 1999), tandis que l'augmentation monoculaire mais pas binoculaire affecte projections perturbe les projections (Stellwagen and Shatz, 2002). L'hypothèse de mécanismes d'actions différents pour l'activité intrinsèque des CGR, ou l'activité synchrone de CGR adjacentes, pourrait expliquer ces résultats contradictoires.

Les CGR dont l'activité intrinsèque est inhibée suite à l'expression de Kir2.1 sont moins nombreuses dans les cibles visuelles primaires après la première semaine post-natale (Benjumeda et al., 2013 ; **section Résultats, Partie 2**). De plus, l'activité électrique est essentielle à la formation des connexions (Butts, 2002). L'activité intrinsèque des CGR pourrait donc être indispensable à l'établissement de leurs connexions dans les cibles visuelles. L'absence d'activité électrique dans une CGR induirait ainsi une élimination de son axone des cibles, de façon cellulaire-autonome, sans impacter les cellules voisines.

L'activité synchrone, corrélée, des CGR adjacentes pourrait, elle, jouer un rôle primordial plutôt dans la co-stabilisation de connexions. En effet, les arborisations axonales des CGR exprimant la CFP ne sont pas perturbées (**section Résultats, Partie 2**). Les activités de ces cellules, contrairement à celles qui expriment Kir2.1, sont toujours synchrones avec celles des autres CGR. Les données du traçage antérograde combiné à KirZaic permettent d'observer les axones de l'ensemble des CGR dans le CGLd. Deux populations de cellules, dont l'activité est normale, peuvent être envisagées dans l'œil électroporé : les cellules exprimant la CFP (**section Résultats, Partie 2**) et les cellules qui n'expriment pas KirZaic mais sont marquées avec la CtB. Les activités électriques de ces deux populations de cellules sont corrélées et il semble que leurs arborisations axonales sont maintenues dans le CGLd à P15. Ainsi, la synchronisation des activités électriques de CGR adjacentes permettrait de co-stabiliser leurs connexions dans les cibles visuelles primaires.

6. L'activité spontanée et la signalisation AMPc dans les interactions entre CGR pendant le développement de la connectivité visuelle

Les voies de signalisation intracellulaire impliquant l'AMPc et l'activité rétinienne sont étroitement liées. Tous les acteurs de cette boucle de signalisation cellulaire et leurs rôles n'ont pas encore été élucidés. L'existence de domaines subcellulaires de signalisation AMPc au sein des neurones, avec des implications différentes, a déjà été décrite dans les différentes régions du cône de croissance axonal, dans les radeaux lipidiques, dans les compartiments somatique ou axonal (Averaimo et al., 2016; Nicol et al., 2011; Shelly et al., 2010; Zhong et al., 2019).

Un schéma de signalisation pourrait expliquer l'ensemble de ces phénomènes et démêler la boucle de signalisation intracellulaire reliant l'AMPc à l'activité électrique rétinienne (**Figure 29**).

6.1. Deux composantes de l'activité électrique

L'activité des CGR pourrait avoir deux composantes : une composante intrinsèque et une composante coopérative. L'activité intrinsèque des CGR leur serait nécessaire pour développer et maintenir leur axone dans le cerveau, individuellement. Ainsi, les axones des CGR dont l'activité électrique est abolie sont absents du thalamus à P15, et semblent déjà envahir moins loin le CGLd à P3 (Louail et al., en préparation). Il a d'ailleurs déjà été montré que l'activité électrique des CGR est nécessaire au guidage des axones et à leur réponse aux éphrines (Nicol et al., 2007), ainsi qu'à l'élaboration d'une zone de terminaison dense dans le CS (Benjumeda et al., 2013). En revanche, elle n'est pas suffisante puisque lorsque la signalisation AMPc est perturbée dans quelques CGR sans affecter les vagues, les axones voisins sont déstabilisés. Une seconde composante dépendrait de l'activité synchrone des CGR adjacentes, et jouerait un rôle dans la co-stabilisation de leurs synapses. Les techniques expérimentales disponibles n'ont jusqu'ici pas permis d'étudier cette hypothèse.

6.2. La signalisation AMPc dans le compartiment somatique corrèle l'activité électrique des CGR

Un premier compartiment de signalisation AMPc serait localisé au sein de la rétine, dans les somas des CGR et dans les cellules amacrines (SAC). Ce compartiment de signaux AMPc jouerait un rôle en amont de la propagation des vagues calciques en influençant la corrélation des activités électriques des CGR adjacentes (**Figure 29**). Des données de la littérature pourraient être en accord avec cette hypothèse. Ainsi, l'augmentation locale de la concentration d'AMPc dans l'œil augmente la taille et la fréquence des vagues d'activité spontanée dans la rétine (Stellwagen et al., 1999). De plus, la signalisation AMPc au sein des SAC régule la propagation des vagues d'activité spontanée (Hsiao et al., 2019). Les mécanismes coopératifs de co-stabilisation des axones dépendent de l'AMPc, mais n'influent en revanche ni sur le guidage des axones, ni sur la mort cellulaire, ni sur la propagation des vagues d'activité calcique dans la rétine. Or, le rôle de l'AMPc dans ces différents évènements développementaux a déjà été décrit (Corredor et al., 2012; Dunn et al., 2006; Nicol et al., 2006a). Ces signaux AMPc pourraient ne pas avoir été perturbés par l'expression de notre bloqueur, Lyn-cAMP-sponge, bien que l'expression de Lyn-cAMP-sponge altère la réponse des axones aux éphrinesA5 (Averaimo et al., 2016). Néanmoins, ces observations sont dans l'ensemble en accord avec l'existence de signaux AMPc distincts ayant des rôles différents dans divers processus biologiques.

6.3. La signalisation AMPc dans le compartiment axonal agit en aval de l'activité synchrone des CGR pour co-stabiliser leurs synapses

Un second compartiment de signalisation AMPc serait situé dans les axones des CGR et jouerait un rôle au niveau des cibles visuelles primaires. L'activité synchrone des CGR adjacentes influerait sur la concentration d'AMPc dans les axones (**Figure 29**). Comme il a été

démontré dans la littérature, les vagues calciques spontanées induisent des oscillations de la concentration d'AMPc dans les CGR (Dunn et al., 2006). La signalisation AMPc impliquée dans les mécanismes coopératifs pourrait donc agir en aval de l'activité corrélée pour influencer la co-stabilisation de synapses adjacentes. En accord avec cette hypothèse, la co-activation d'un axone avec ses voisins co-stabilise leurs synapses dans le système visuel de xénope (Munz et al., 2014). En outre, les synapses co-actives dans le cortex visuel de souris sont consolidées (Winnubst et al., 2015).

Il a été montré que la délétion génétique d'AC1 entraîne des défauts dans l'organisation des projections visuelles (Ravary et al., 2003). Dans cette étude, la perturbation de la signalisation AMPc est encodée génétiquement et donc potentiellement effective dans le compartiment somatique et axonal. Les défauts décrits apparaissent entre P3 et l'âge adulte, ce qui pourrait être en accord avec un défaut dans la stabilisation des synapses. Les mécanismes coopératifs de co-stabilisation des arborisations axonales apparaissent également après P3 (Louail et al., en préparation), au début de la période de stabilisation des synapses (Huberman et al., 2003). Enfin, dans le cervelet, l'AMPc influence la potentialisation ou la dépression synaptique (Linden, 1999). De plus, l'observation de la morphologie des synapses des CGR jouxtant celles dont la signalisation AMPc est perturbée suggère également que ces interactions permettraient de co-stabiliser leurs synapses. Ces données sont en accord avec des signaux AMPc impliqués dans la stabilisation des synapses.

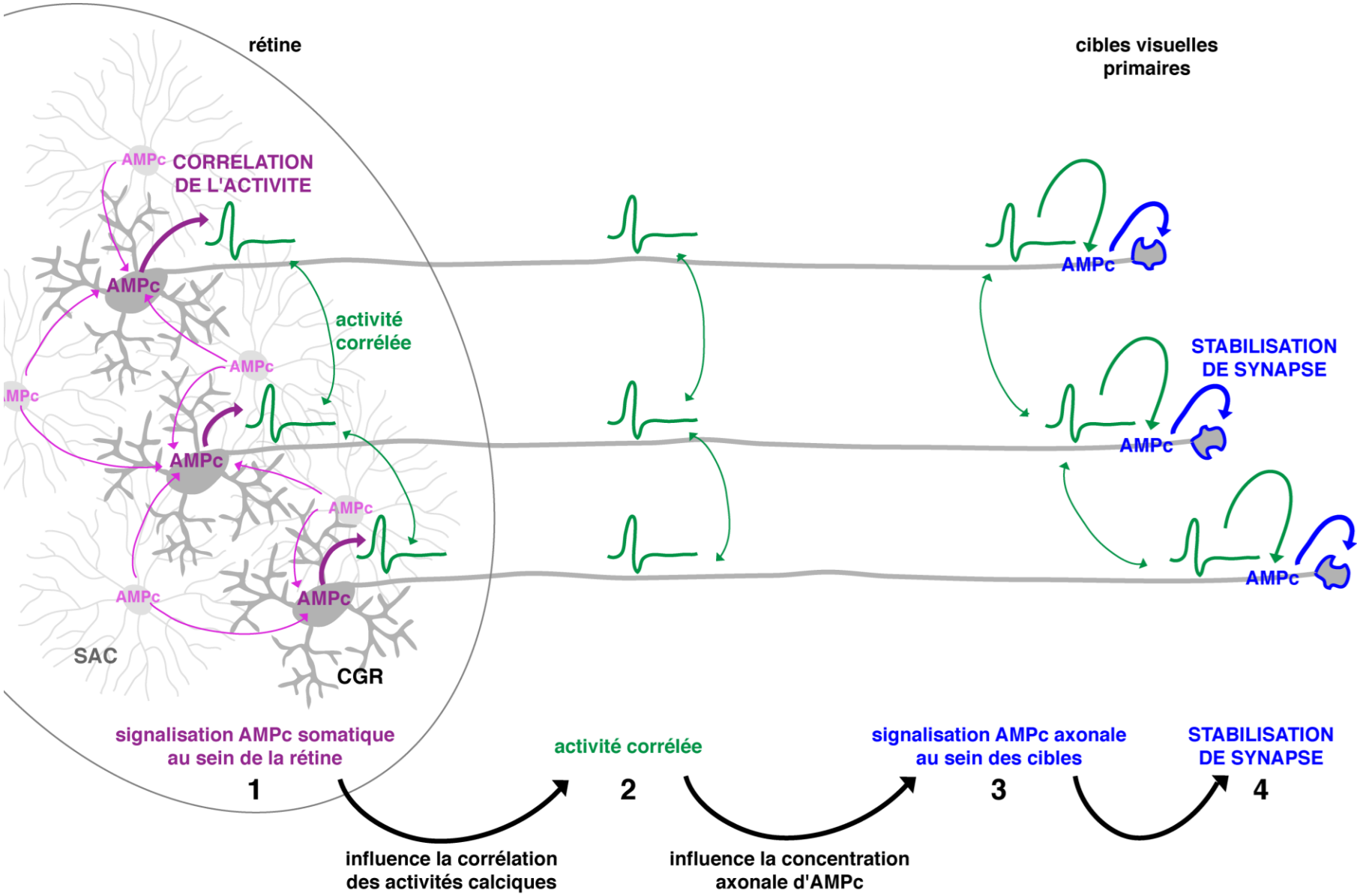
Le bloqueur de la signalisation AMPc utilisé dans ces travaux est restreint aux radeaux lipidiques de la membrane plasmique (Averaimo et al., 2016; Louail et al., en préparation). Il existe différents types de radeaux lipidiques, qui sont très hétérogènes (Pike, 2003). De plus, leur localisation dépend du type cellulaire (Hou et al., 2008). Les radeaux lipidiques sont impliqués dans un grand nombre de procédés développementaux comme l'adhésion, le guidage axonal ou la neurotransmission (*e.g*. Tsui-Pierchala et al., 2002) . Enfin, il a été montré que les récepteurs AMPA sont localisés dans les radeaux lipidiques avant d'être externalisés au niveau de la synapse (Hou et al., 2008). L'augmentation du nombre d'AMPA-R à la synapse

est corrélée à la maturation des synapses glutamatergiques, le même type de synapses que celles des CGR (Constantine-Paton and Cline, 1998).

Figure 29 (page suivante)**: Deux composantes de la signalisation AMPc pourraient agir en amont et en aval de l'activité électrique dans les CGR.**

(1) Les signaux AMPc au sein de la rétine, dans les cellules amacrines étoilées et les somas des CGR, influenceraient la propagation des vagues calciques spontanées et ainsi la corrélation des activités électriques des CGR voisines. **(2)** L'activité corrélée des cellules adjacentes se propage le long des axones jusque dans les cibles visuelles, dans lesquelles elle influence des signaux locaux d'AMPc. **(3)** Ces signaux axonaux d'AMPc joueraient un rôle dans les **(4)** mécanismes de co-stabilisation des arborisations axonales.

AMPc, AMP cyclique ; SAC, cellule amacrine étoilée, CGR, cellule ganglionnaire de la rétine


rétine
cibles visuelles primaires
AMPc
CORRELATION DE L'ACTIVITE
activité corrélée
STABILISATION DE SYNAPSE
SAC
CGR
signalisation AMPc somatique au sein de la rétine
1
activité corrélée
2
signalisation AMPc axonale au sein des cibles
3
STABILISATION DE SYNAPSE
4
influence la corrélation des activités calciques
influence la concentration axonale d'AMPc

Les outils moléculaires présentés dans ces travaux de thèse, permettant un blocage exclusif de la signalisation AMPc dans l'un ou l'autre de ces deux compartiments permettraient de vérifier ces hypothèses. D'une part, la perturbation des signaux AMPc au sein de la rétine et dans les somas des CGR pourrait ainsi affecter la propagation des vagues calciques spontanées. D'autre part, le blocage des signaux AMPc au niveau de l'axone et des terminaisons axonales pourrait perturber la stabilisation globale des synapses.

ANNEXES

Adénylate cyclase	Principale expression dans le SNC	Expression		Rôle dans la formation du système visuel	Régulation			Localisation subcellulaire
		dans les CGR	dans le système visuel		calcium	RCPG	PKA/PKC	
AC1	cortex, hippocampe, thalamus, cervelet, striatum, moelle épinière Forte pendant le développement, élevée chez l'adulte	oui expression forte entre P4 et P10	- CGLd - CS	oui AC1-KO : défauts de raffinement dans CGLd et CS	- stimulation via CaM - Inhibition via $CaMK_{IV}$	- stimulation : $G_s\alpha$ - inhibition : $G_i\alpha$, $G\beta\gamma$		membrane plasmique (DANS radeaux lipidiques)
AC2	cortex, striatum, bulbe olfactif, thalamus`	oui expression forte entre P4 et P10	- faible expression CGLd - CS		non	- stimulation : $G_s\alpha$, $G\beta\gamma$ - inhibition : non	stimulation par PKC	membrane plasmique (HORS des radeaux lipidiques)
AC3	épithélium olfactif	oui	non		- stimulation via CaM (*in vitro*) - inhibition directe ou via $CaMK_{II}$	- stimulation : $G_s\alpha$ - inhibition : $G_i\alpha$		membrane plasmique (DANS radeaux lipidiques)
AC4	*restreinte aux vaisseaux sanguins*	non	non		non	- stimulation : $G_s\alpha$, $G\beta\gamma$ - inhibition : non	stimulation par PKC	membrane plasmique (HORS des radeaux lipidiques)
AC5	striatum, hippocampe,	oui	non	non	Inhibition directe	- stimulation : $G_s\alpha$	- inhibition par PKA	membrane plasmique (DANS

	bulbe olfactif, thalamus	expression forte entre P4 et P10				- inhibition : $G_i\alpha$	- stimulation par PKC	radeaux lipidiques)
AC6	hippocampe, cortex, bulbe olfactif, thalamus, striatum	non	non		inhibition directe	- stimulation : $G_s\alpha$ - inhibition : $G_i\alpha$	- inhibition par PKA - stimulation ou inhibition par PKC	membrane plasmique (DANS radeaux lipidiques)
AC7	*aucune*	non	non		non	stimulation : $G_s\alpha$, $G\beta\gamma$	stimulation par PKC	membrane plasmique (HORS des radeaux lipidiques)
AC8	cortex, hippocampe, thalamus, bulbe olfactif Faible pendant le développement, élevée chez l'adulte	oui expression forte entre P4 et P10	oui	non	- stimulation via CaM	- stimulation : $G_s\alpha$ - inhibition : $G_i\alpha$, $G\beta\gamma$		membrane plasmique (DANS radeaux lipidiques)
AC9	hippocampe, bulbe olfactif	oui	non		- inhibition via calcineurine	- stimulation : $G_s\alpha$ - inhibition : $G_i\alpha$	inhibition par PKC	membrane plasmique (HORS des radeaux lipidiques)
sAC	exprimée dans certains neurones du SNC	oui		*in vitro* : survie des CGR et élongation axonale	stimulation directe	non		Cytoplasme, noyau, mitochondrie, cytosquelette

Table 1 : Expression des AC dans les tissus.

BIBLIOGRAPHIE

Ackman, J., Burbridge, T., and Crair, M. (2012). Retinal waves coordinate patterned activity throughout the developing visual system. Nature *490*, 219.
Antoni, F., Palkovits, M., Simpson, J., Smith, S., Leitch, A., Rosie, R., Fink, G., and Paterson, J. (1998). Ca2+/Calcineurin-Inhibited Adenylyl Cyclase, Highly Abundant in Forebrain Regions, Is Important for Learning and Memory. J Neurosci *18*, 9650–9661.
Argaw, A., Duff, G., Zabouri, N., Cécyre, B., Chainé, N., Cherif, H., Tea, N., Lutz, B., Ptito, M., and Bouchard, J.-F. (2011). Concerted Action of CB1 Cannabinoid Receptor and Deleted in Colorectal Cancer in Axon Guidance. J Neurosci *31*, 1489–1499.
Assali, A., Gaspar, P., and Rebsam, A. (2014). Activity dependent mechanisms of visual map formation--from retinal waves to molecular regulators. Semin. Cell Dev. Biol. *35*, 136–146.
Assali, A., Magueresse, C., Bennis, M., Nicol, X., Gaspar, P., and Rebsam, A. (2017). RIM1/2 in retinal ganglion cells are required for the refinement of ipsilateral axons and eye-specific segregation. Sci Reports *7*, 3236.
Averaimo, S., and Nicol, X. (2014). Intermingled cAMP, cGMP and calcium spatiotemporal dynamics in developing neuronal circuits. Front Cell Neurosci *8*, 376.
Averaimo, S., Assali, A., Ros, O., Couvet, S., Zagar, Y., Genescu, I., Rebsam, A., and Nicol, X. (2016). A plasma membrane microdomain compartmentalizes ephrin-generated cAMP signals to prune developing retinal axon arbors. Nat Commun *7*, 12896.
Bacskai, B., Hochner, B., Mahaut-Smith, M., Adams, A., Kaang, B., Kandel, E., and Tsien, R. (1993). Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in Aplysia sensory neurons. Science *260*, 222–226.
Bansal, A., Singer, J.H., Hwang, B.J., Xu, W., Beaudet, A., and Feller, M.B. (2000). Mice Lacking Specific Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits Exhibit Dramatically Altered Spontaneous Activity Patterns and Reveal a Limited Role for Retinal Waves in Forming ON and OFF Circuits in the Inner Retina. The Journal of Neuroscience *20*, 7672–7681.
Barlow, H., Hill, R., and Levick, W. (1964). Retinal ganglion cells responding selectively to direction and speed of image motion in the rabbit. J Physiology *173*, 377–407.
Barnstable, C.J., and Dräger, U.C. (1984). Thy-1 antigen: A ganglion cell specific marker in rodent retina. Neuroscience *11*, 847–855.
Bassett, E., and Wallace, V. (2012). Cell fate determination in the vertebrate retina. Trends Neurosci *35*, 565–573.
Batista, A., and Hengst, U. (2016). Intra-axonal protein synthesis in development and beyond. Int J Dev Neurosci *55*, 140–149.
Beavo, J., and Brunton, L. (2002). Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. Nat Rev Mol Cell Biol. *3*.
Benjumeda, I., Escalante, A., Law, C., Morales, D., Chauvin, G., Muça, G., Coca, Y., Márquez, J., López-Bendito, G., Kania, A., et al. (2013). Uncoupling of EphA/ephrinA Signaling and Spontaneous Activity in Neural Circuit Wiring. J Neurosci *33*, 18208–18218.
Berson, D., Dunn, F., and Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. Science *295*.
Bickford, M., Slusarczyk, A., Dilger, E., Krahe, T., Kucuk, C., and Guido, W. (2010). Synaptic development of the mouse dorsal lateral geniculate nucleus. J Comp Neurol *518*, 622–635.
Blankenship, A., and Feller, M. (2009). Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. Nat Rev Neurosci *11*, 18.
Blankenship, A.G., Ford, K.J., Johnson, J., Seal, R.P., Edwards, R.H., Copenhagen, D.R., and Feller, M.B. (2009). Synaptic and extrasynaptic factors governing glutamatergic retinal waves. Neuron *62*, 230–241.
Borgdorff, A.J., and Choquet, D. (2002). Regulation of AMPA receptor lateral movements. Nature *417*, 649–653.
Brusés, J.L., Chauvet, N., and Rutishauser, U. (2001). Membrane lipid rafts are necessary for the maintenance of the (alpha)7 nicotinic acetylcholine receptor in somatic spines of ciliary neurons. J. Neurosci. *21*, 504–512.

Buckley, N.., Hansson, S., Harta, G., and Mezey, É. (1997). Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. Neuroscience *82*, 1131–1149.
Burbridge, T.J., Xu, H.-P.P., Ackman, J.B., Ge, X., Zhang, Y., Ye, M.-J.J., Zhou, Z.J., Xu, J., Contractor, A., and Crair, M.C. (2014). Visual circuit development requires patterned activity mediated by retinal acetylcholine receptors. Neuron *84*, 1049–1064.
Burrone, J., O'Byrne, M., and Murthy, V. (2002). Multiple forms of synaptic plasticity triggered by selective suppression of activity in individual neurons. Nature *420*, nature01242.
Butcher, R., and Sutherland, E. (1962). Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. J Biol Chem.
Butts, D.A. (2002). Retinal waves: implications for synaptic learning rules during development. Neuroscientist *8*, 243–253.
Butts, D.A., Kanold, P.O., and Shatz, C.J. (2007). A burst-based "Hebbian" learning rule at retinogeniculate synapses links retinal waves to activity-dependent refinement. PLoS Biol. *5*, e61.
Cadd, G.G., Uhler, M.D., and McKnight, G.S. (1990). Holoenzymes of cAMP-dependent protein kinase containing the neural form of type I regulatory subunit have an increased sensitivity to cyclic nucleotides. J. Biol. Chem. *265*, 19502–19506.
Cajigas, I.J., Tushev, G., Will, T.J., tom Dieck, S., Fuerst, N., and Schuman, E.M. (2012). The Local Transcriptome in the Synaptic Neuropil Revealed by Deep Sequencing and High-Resolution Imaging. Neuron *74*, 453–466.
Caleo, M., Menna, E., Chierzi, S., Cenni, M., and Maffei, L. (2000). Brain-derived neurotrophic factor is an anterograde survival factor in the rat visual system. Curr Biol *10*, 1155–1161.
Calhoun, M., Jucker, M., Martin, L., Thinakaran, G., Price, D., and Mouton, P. (1996). Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. J Neurocytol.
Campbell, G, and Shatz, CJ (1992). Synapses formed by identified retinogeniculate axons during the segregation of eye input. The Journal of Neuroscience.
Cang, J., Rentería, R., Kaneko, M., Liu, X., Copenhagen, D., and Stryker, M. (2005). Development of Precise Maps in Visual Cortex Requires Patterned Spontaneous Activity in the Retina. Neuron *48*, 797–809.
Cang, J., and Feldheim, D.A. (2013). Developmental mechanisms of topographic map formation and alignment. Annu. Rev. Neurosci. 36, 51–77.
Carnegie, G., and Scott, J. (2003). A-kinase anchoring proteins and neuronal signaling mechanisms. Gene Dev *17*, 1557–1568.
Cases, O., Seif, I., Grimsby, J., Gaspar, P., Chen, K., Pournin, S., Müller, U., Aguet, M., Babinet, C., Shih, J., et al. (1995). Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. Science.
Cepko, C.L., Austin, C.P., Yang, X., Alexiades, M., and Ezzedine, D. (1996). Cell fate determination in the vertebrate retina. PNAS *93*, 589–595.
Chaffiol, A., Caplette, R., Jaillard, C., Brazhnikova, E., Desrosiers, M., Dubus, E., Duhamel, L., Macé, E., Marre, O., Benoit, P., et al. (2017). A New Promoter Allows Optogenetic Vision Restoration with Enhanced Sensitivity in Macaque Retina. Molecular Therapy.
Charalambakis, N., Govindaiah, G., Campbell, P., and Guido, W. (2019). Developmental Remodeling of Thalamic Interneurons Requires Retinal Signaling. J Neurosci *39*, 3856–3866.
Chen, Y., Harry, A., Li, J., Smit, M., Bai, X., Magnusson, R., Pieroni, J., Weng, G., and Iyengar, R. (1997). Adenylyl cyclase 6 is selectively regulated by protein kinase A phosphorylation in a region involved in Gαs stimulation. Proc National Acad Sci *94*, 14100–14104.
Cho, A., Sampath, A., and Weiland, J. (2011). Physiological Response of Mouse Retinal Ganglion Cells to Electrical Stimulation: Effect of Soma Size.
Cioni, J.-M., Koppers, M., and Holt, C. (2018). Molecular control of local translation in axon development and maintenance. Curr Opin Neurobiol *51*, 86–94.
Cline, H., and Constantine-Paton, M. (1990). NMDA receptor agonist and antagonists alter retinal ganglion cell arbor structure in the developing frog retinotectal projection. J Neurosci *10*, 1197–1216.

Collingridge, G., Isaac, J., and Wang, Y. (2004). Receptor trafficking and synaptic plasticity. Nat Rev Neurosci *5*, 952–962.
Constantine-Paton, M., and Cline, H. (1998). LTP and activity-dependent synaptogenesis: the more alike they are, the more different they become. Curr Opin Neurobiol *8*, 139–148.
Cook, P., Prusky, G., and Ramoa, A. (1999). The role of spontaneous retinal activity before eye opening in the maturation of form and function in the retinogeniculate pathway of the ferret. Vis Neurosci.
Cooper, D.M., Schell, M.J., Thorn, P., and Irvine, R.F. (1998). Regulation of adenylyl cyclase by membrane potential. J. Biol. Chem. *273*, 27703–27707.
Corredor, R., Trakhtenberg, E., Pita-Thomas, W., Jin, X., Hu, Y., and Goldberg, J. (2012). Soluble Adenylyl Cyclase Activity Is Necessary for Retinal Ganglion Cell Survival and Axon Growth. J Neurosci *32*, 7734–7744.
Cox, L., Hengst, U., Gurskaya, N., Lukyanov, K., and Jaffrey, S. (2008). Intra-axonal translation and retrograde trafficking of CREB promotes neuronal survival. Nat Cell Biol *10*, ncb1677.
Dasilva, M., Grieve, K., Cudeiro, J., and Rivadulla, C. (2012). Endocannabinoid CB1 receptors modulate visual output from the thalamus. Psychopharmacology *219*, 835–845.
Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D., Dustin, M., and Gan, W.-B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. Nat Neurosci *8*, 752.
Debski, E., and Cline, H. (2002). Activity-dependent mapping in the retinotectal projection. Curr Opin Neurobiol *12*, 93–99.
Dhande, O., and Huberman, A. (2014). Retinal ganglion cell maps in the brain: implications for visual processing. Curr Opin Neurobiol *24*, 133–142.
Dhande, O., Hua, E., Guh, E., Yeh, J., Bhatt, S., Zhang, Y., Ruthazer, E., Feller, M., and Crair, M. (2011). Development of Single Retinofugal Axon Arbors in Normal and β2 Knock-Out Mice. J Neurosci *31*, 3384–3399.
Dhande, O.S., Bhatt, S., Anishchenko, A., Elstrott, J., Iwasato, T., Swindell, E.C., Xu, H.-P.P., Jamrich, M., Itohara, S., Feller, M.B., et al. (2012). Role of adenylate cyclase 1 in retinofugal map development. J. Comp. Neurol. *520*, 1562–1583.
Dhande, O.S., Stafford, B.K., Lim, J.A., and Huberman, A.D. (2015). Contributions of Retinal Ganglion Cells to Subcortical Visual Processing and Behaviors. Annual Review of Vision Science.
Diana, M.A., Levenes, C., Mackie, K., and Marty, A. (2002). Short-term retrograde inhibition of GABAergic synaptic currents in rat Purkinje cells is mediated by endogenous cannabinoids. J. Neurosci. *22*, 200–208.
Di Donato, V., De Santis, F., Albadri, S., Auer, T., Duroure, K., Charpentier, M., Condorcet, J., Gebhardt, C., and Del Bene, F. (2018). An Attractive Reelin Gradient Establishes Synaptic Lamination in the Vertebrate Visual System. Neuron.
Dräger, U.C., and Hubel, D.H. (1975). Responses to visual stimulation and relationship between visual, auditory, and somatosensory inputs in mouse superior colliculus. J. Neurophysiol. *38*, 690–713.
Duan, X., Qiao, M., Bei, F., Kim, I.-J., He, Z., and Sanes, J.R. (2015). Subtype-Specific Regeneration of Retinal Ganglion Cells following Axotomy: Effects of Osteopontin and mTOR Signaling. Neuron *85*, 1244–1256.
Dudek, S., and Bear, M. (1992). Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. Proc Natl Acad Sci U S A.
Duff, G., Argaw, A., Cecyre, B., Cherif, H., Tea, N., Zabouri, N., Casanova, C., Ptito, M., and Bouchard, J.-F. (2013). Cannabinoid Receptor CB2 Modulates Axon Guidance. Plos One *8*, e70849.
Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Südhof, T., and Rizo, J. (1999). A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. Embo J *18*, 4372–4382.
Dunn, T., Wang, C.-T., Colicos, M., Zaccolo, M., DiPilato, L., Zhang, J., Tsien, R., and Feller, M. (2006). Imaging of cAMP Levels and Protein Kinase A Activity Reveals That Retinal Waves Drive Oscillations in Second-Messenger Cascades. The Journal of Neuroscience *26*, 12807–12815.
Dunn, T.A., Storm, D.R., and Feller, M.B. (2009). Calcium-dependent increases in protein kinase-A activity in mouse retinal ganglion cells are mediated by multiple adenylate cyclases. PLoS ONE *4*, e7877.

Eggan, S., and Lewis, D. (2007). Immunocytochemical Distribution of the Cannabinoid CB1 Receptor in the Primate Neocortex: A Regional and Laminar Analysis. Cereb Cortex *17*, 175–191.
Erskine, L., Williams, S.E., Brose, K., Kidd, T., Rachel, R.A., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., and Mason, C.A. (2000). Retinal ganglion cell axon guidance in the mouse optic chiasm: expression and function of robos and slits. J. Neurosci. *20*, 4975–4982.
Erskine, L., Reijntjes, S., Pratt, T., Denti, L., Schwarz, Q., Vieira, J.M., Alakakone, B., Shewan, D., and Ruhrberg, C. (2011). VEGF Signaling through Neuropilin 1 Guides Commissural Axon Crossing at the Optic Chiasm. Neuron *70*, 951–965.
Esposito, G., Jaiswal, B., Xie, F., Krajnc-Franken, M., Robben, T., Strik, A., Kuil, C., Philipsen, R., Duin, M., Conti, M., et al. (2004). Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. P Natl Acad Sci Usa *101*, 2993–2998.
Fagan, K.A., Mahey, R., and Cooper, D.M. (1996). Functional co-localization of transfected Ca(2+)-stimulable adenylyl cyclases with capacitative Ca2+ entry sites. J. Biol. Chem. *271*, 12438–12444.
Failor, S., Chapman, B., and Cheng, H.-J.J. (2015). Retinal waves regulate afferent terminal targeting in the early visual pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *112*, E2957–66.
Famiglietti, E., and Kolb, H. (1976). Structural basis for ON-and OFF-center responses in retinal ganglion cells. Science.
Farah, M., and Easter, S. (2005). Cell birth and death in the mouse retinal ganglion cell layer. Journal of Comparative Neurology *489*, 120–134.
Fawcett, J., O'Leary, D., and Cowan, W. (1984). Activity and the control of ganglion cell death in the rat retina. PNAS.
Feldheim, D.A., and O'Leary, D.D. (2010). Visual map development: bidirectional signaling, bifunctional guidance molecules, and competition. Cold Spring Harb Perspect Biol *2*, a001768.
Feldheim, D., Nakamoto, M., Osterfield, M., Gale, N., DeChiara, T., Rohatgi, R., Yancopoulos, G., and Flanagan, J. (2004). Loss-of-Function Analysis of EphA Receptors in Retinotectal Mapping. J Neurosci *24*, 2542–2550.
Feller, M., Wellis, D., Stellwagen, D., FS, and Shatz, C. (1996). Requirement for cholinergic synaptic transmission in the propagation of spontaneous retinal waves. Science.
Fontainhas, A., Wang, M., Liang, K., Chen, S., Mettu, P., Damani, M., Fariss, R., Li, W., and Wong, W. (2011). Microglial Morphology and Dynamic Behavior Is Regulated by Ionotropic Glutamatergic and GABAergic Neurotransmission. Plos One *6*, e15973.
Fujitani, Y., Fujitani, S., Luo, H., Qiu, F., Burlison, J., Long, Q., Kawaguchi, Y., Edlund, H., MacDonald, R., Furukawa, T., et al. (2006). Ptf1a determines horizontal and amacrine cell fates during mouse retinal development. Development *133*, 4439–4450.
Galli, L., and Maffei, L. (1988). Spontaneous impulse activity of rat retinal ganglion cells in prenatal life. Science *242*, 90–91.
Garcia-Frigola, C., Carreres, M.I., Vegar, C., and Herrera, E. (2007). Gene delivery into mouse retinal ganglion cells by in utero electroporation. BMC Dev. Biol. *7*, 103.
García-Frigola, C., Carreres, M., Vegar, C., Mason, C., and Herrera, E. (2008). Zic2 promotes axonal divergence at the optic chiasm midline by EphB1-dependent and -independent mechanisms. Development *135*, 1833–1841.
Gervasi, N., Tchénio, P., and Preat, T. (2010). PKA Dynamics in a Drosophila Learning Center: Coincidence Detection by Rutabaga Adenylyl Cyclase and Spatial Regulation by Dunce Phosphodiesterase. Neuron *65*, 516–529.
Gifford, J., Walsh, M., and Vogel, H. (2007). Structures and metal-ion-binding properties of the Ca2+-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. Biochem J.
Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M., Conway, S., Ng, L., Stanley, E., et al. (2010). Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. Science *330*, 841–845.
Godement, P., Saillour, P., and Imbert, M. (1980). The ipsilateral optic pathway to the dorsal lateral geniculate nucleus and superior colliculus in mice with prenatal or postnatal loss of one eye. J. Comp. Neurol. *190*, 611–626.

Godement, P., Salaün, J., and Imbert, M. (1984). Prenatal and postnatal development of retinogeniculate and retinocollicular projections in the mouse. J. Comp. Neurol. *230*, 552–575.
Golding, B., Pouchelon, G., Bellone, C., Murthy, S., Di Nardo, A.A., Govindan, S., Ogawa, M., Shimogori, T., Lüscher, C., Dayer, A., et al. (2014). Retinal Input Directs the Recruitment of Inhibitory Interneurons into Thalamic Visual Circuits. Neuron *81*, 1443.
Goodman, C.S., and Shatz, C. (1992). Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. Cell.
Gorbunova, Y.V., and Spitzer, N.C. (2002). Dynamic interactions of cyclic AMP transients and spontaneous Ca(2+) spikes. Nature *418*, 93–96.
Grinberg, Y., Milton, J., and Kraig, R. (2011). Spreading Depression Sends Microglia on Lévy Flights. Plos One *6*, e19294.
Grubb, M., Rossi, F., Changeux, J.-P., and Thompson, I. (2003). Abnormal Functional Organization in the Dorsal Lateral Geniculate Nucleus of Mice Lacking the β2 Subunit of the Nicotinic Acetylcholine Receptor. Neuron *40*, 1161–1172.
Guido, W. (2008). Refinement of the retinogeniculate pathway. J Physiology *586*, 4357–4362.
Guirland, C., Suzuki, S., Kojima, M., Lu, B., and Zheng, J. (2004). Lipid Rafts Mediate Chemotropic Guidance of Nerve Growth Cones. Neuron *42*, 51–62.
Hagiwara, M., Brindle, P., Harootunian, A., Armstrong, R., Rivier, J., Vale, W., Tsien, R., and Montminy, M. (1993). Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. Mol Cell Biol *13*, 4852–4859.
Hammer, S., Carrillo, G., Govindaiah, G., Monavarfeshani, A., Bircher, J., Su, J., Guido, W., and Fox, M. (2014). Nuclei-specific differences in nerve terminal distribution, morphology, and development in mouse visual thalamus. Neural Dev *9*, 1–21.
Han, J., Han, L., Tiwari, P., Wen, Z., and Zheng, J. (2007). Spatial targeting of type II protein kinase A to filopodia mediates the regulation of growth cone guidance by cAMP. J Cell Biology *176*, 101–111.
Hanus, C., and Schuman, E. (2013). Proteostasis in complex dendrites. Nat Rev Neurosci *14*, 638–648.
Hattar, S., Liao, H.-W., Takao, M., Berson, D., and Yau, K.-W. (2002). Melanopsin-Containing Retinal Ganglion Cells: Architecture, Projections, and Intrinsic Photosensitivity. Science *295*, 1065–1070.
Hayashi, Y., Shi, S.-H., Esteban, J., Piccini, A., Poncer, J.-C., and Malinow, R. (2000). Driving AMPA Receptors into Synapses by LTP and CaMKII: Requirement for GluR1 and PDZ Domain Interaction. Science *287*, 2262–2267.
Hebb, D. (1949). The Organization of Behavior. Wiley.
Hering, H., Lin, C.-C., and Sheng, M. (2003). Lipid Rafts in the Maintenance of Synapses, Dendritic Spines, and Surface AMPA Receptor Stability. J Neurosci *23*, 3262–3271.
Herrera, E., Brown, L., Aruga, J., Rachel, R., Dolen, G., Mikoshiba, K., Brown, S., and Mason, C. (2003). Zic2 Patterns Binocular Vision by Specifying the Uncrossed Retinal Projection. Cell *114*, 545–557.
Herrera, E., Erskine, L., and Morenilla-Palao, C. (2017). Guidance of retinal axons in mammals. Seminars in Cell & Developmental Biology.
Hickey, T.L. (1981). The developing visual system. Trends Neurosci *4*, 41–44.
Hindges, R., McLaughlin, T., Genoud, N., Henkemeyer, M., and O'Leary, D. (2002). EphB Forward Signaling Controls Directional Branch Extension and Arborization Required for Dorsal-Ventral Retinotopic Mapping. Neuron *35*, 475–487.
Holt, C.E., and Schuman, E.M. (2013). The Central Dogma Decentralized: New Perspectives on RNA Function and Local Translation in Neurons. Neuron *80*, 648–657.
Hong, Y.K., and Chen, C. (2011). Wiring and rewiring of the retinogeniculate synapse. Current Opinion in Neurobiology.
Hong, Y.K., Park, S., Litvina, E.Y., Morales, J., Sanes, J.R., and Chen, C. (2014). Refinement of the retinogeniculate synapse by bouton clustering. Neuron *84*, 332–339.
Hooks, B.M., and Chen, C. (2006). Distinct roles for spontaneous and visual activity in remodeling of the retinogeniculate synapse. Neuron *52*, 281–291.

Hou, Q., Huang, Y., Amato, S., Snyder, S., Huganir, R., and Man, H.-Y. (2008). Regulation of AMPA receptor localization in lipid rafts. Mol Cell Neurosci *38*, 213–223.
Howlett, A.C., and Fleming, R.M. (1984). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. Mol. Pharmacol. *26*, 532–538.
Hsiao, Y.-T., Shu, W.-C., Chen, P.-C., Yang, H.-J., Chen, H.-Y., Hsu, S.-P., Huang, Y.-T., Yang, C.-C., Chen, Y.-J., Yu, N.-Y., et al. (2019). Presynaptic SNAP-25 regulates retinal waves and retinogeniculate projection via phosphorylation. Proc National Acad Sci *116*, 201812169.
Huang, L., and Pallas, S. (2001). NMDA antagonists in the superior colliculus prevent developmental plasticity but not visual transmission or map compression. J Neurophysiol.
Huberman, A., Stellwagen, D., and Chapman, B. (2002). Decoupling Eye-Specific Segregation from Lamination in the Lateral Geniculate Nucleus. J Neurosci *22*, 9419–9429.
Huberman, A., Wei, W., Elstrott, J., Stafford, B., Feller, M., and Barres, B. (2009). Genetic Identification of an On-Off Direction- Selective Retinal Ganglion Cell Subtype Reveals a Layer-Specific Subcortical Map of Posterior Motion. Neuron *62*, 327–334.
Huberman, A., Clandinin, T., and Baier, H. (2010). Molecular and Cellular Mechanisms of Lamina-specific Axon Targeting. Csh Perspect Biol *2*, a001743.
Huberman, A.D., Wang, G.-Y.Y., Liets, L.C., Collins, O.A., Chapman, B., and Chalupa, L.M. (2003). Eye-specific retinogeniculate segregation independent of normal neuronal activity. Science *300*, 994–998.
Huberman, A.D., Feller, M.B., and Chapman, B. (2008). Mechanisms underlying development of visual maps and receptive fields. Annu. Rev. Neurosci. *31*, 479–509.
Hérincs, Z., Corset, V., Cahuzac, N., Furne, C., Castellani, V., Hueber, A.-O., and Mehlen, P. (2005). DCC association with lipid rafts is required for netrin-1-mediated axon guidance. J Cell Sci *118*, 1687–1692.
Höpker, V.H., Shewan, D., Tessier-Lavigne, M., Poo, M., and Holt, C. (1999). Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. Nature *401*, 69–73.
Isaac, J., Nicoll, R., and Malenka, R. (1995). Evidence for silent synapses: Implications for the expression of LTP. Neuron *15*, 427–434.
Iwami, G., Kawabe, J., Ebina, T., Cannon, P.J., Homcy, C.J., and Ishikawa, Y. (1995). Regulation of adenylyl cyclase by protein kinase A. J. Biol. Chem. *270*, 12481–12484.
Jaiswal, B., and Conti, M. (2003). Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. Proc National Acad Sci *100*, 10676–10681.
Jaubert-Miazza, L., Green, E., Lo, F.-S., Bui, K., Mills, J., and Guido, W. (2005). Structural and functional composition of the developing retinogeniculate pathway in the mouse. Visual Neuroscience *22*, 661–676.
Javadi, P., Bouskila, J., Bouchard, J.-F., and Ptito, M. (2015). The endocannabinoid system within the dorsal lateral geniculate nucleus of the vervet monkey. Neuroscience *288*, 135–144.
Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M., Kreutzberg, G., Sher, A., and Littman, D. (2000). Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. Mol Cell Biol *20*, 4106–4114.
Jurevicius, J., and Fischmeister, R. (1997). Longitudinal distribution of Na+ and Ca2+ channels and beta-adrenoceptors on the sarcolemmal membrane of frog cardiomyocytes. J. Physiol. (Lond.) *503 (Pt 3)*, 471–477.
Kalatsky, V., and Stryker, M. (2003). New Paradigm for Optical Imaging Temporally Encoded Maps of Intrinsic Signal. Neuron *38*, 529–545.
Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimotodani, Y., Uchigashima, M., and Watanabe, M. (2009). Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. Physiol. Rev. *89*, 309–380.
Kawaguchi, Y., Cooper, B., Gannon, M., Ray, M., MacDonald, R., and Wright, C. (2002). The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. Nat Genet *32*, 128–134.
Kelly, M., Adamowicz, W., Bove, S., Hartman, A., Mariga, A., Pathak, G., Reinhart, V., Romegialli, A., and Kleiman, R. (2014). Select 3′,5′-cyclic nucleotide phosphodiesterases exhibit altered expression in the aged rodent brain. Cell Signal *26*, 383–397.

Kim, I.-J., Zhang, Y., Yamagata, M., Meister, M., and Sanes, J. (2008). Molecular identification of a retinal cell type that responds to upward motion. Nature *452*, 478.
Kim, I.-J., Zhang, Y., Meister, M., and Sanes, J. (2010). Laminar Restriction of Retinal Ganglion Cell Dendrites and Axons: Subtype-Specific Developmental Patterns Revealed with Transgenic Markers. J Neurosci *30*, 1452–1462.
Kirkby, L., and Feller, M. (2013). Intrinsically photosensitive ganglion cells contribute to plasticity in retinal wave circuits. Proc National Acad Sci *110*, 12090–12095.
Kirkby, L.A., Sack, G.S., Firl, A., and Feller, M.B. (2013). A Role for Correlated Spontaneous Activity in the Assembly of Neural Circuits. Neuron *80*, 1129–1144.
Klauck, T., Faux, M., Labudda, K., Langeberg, L., Jaken, S., and Scott, J. (1996). Coordination of Three Signaling Enzymes by AKAP79, a Mammalian Scaffold Protein. Science *271*, 1589–1592.
Koch, S.M., Dela Cruz, C.G., Hnasko, T.S., Edwards, R.H., Huberman, A.D., and Ullian, E.M. (2011). Pathway-specific genetic attenuation of glutamate release alters select features of competition-based visual circuit refinement. Neuron *71*, 235–242.
Koh, W., Yang, K., and Kaminski, N. (1995). Cyclic AMP is an essential factor in immune responses. Biochem Biophys Res Commun. .
Kolodziejczak, M., Béchade, C., Gervasi, N., Irinopoulou, T., Banas, S.M., Cordier, C., Rebsam, A., Roumier, A., and Maroteaux, L. (2015). Serotonin Modulates Developmental Microglia via 5-HT2B Receptors: Potential Implication during Synaptic Refinement of Retinogeniculate Projections. ACS Chem Neurosci *6*, 1219–1230.
Krieger, B., Qiao, M., Rousso, D., Sanes, J., and Meister, M. (2017). Four alpha ganglion cell types in mouse retina: Function, structure, and molecular signatures. Plos One *12*, e0180091.
Krupinski, J., Coussen, F., Bakalyar, H., Tang, W., Feinstein, P., Orth, K., Slaughter, C., Reed, R., and Gilman, A. (1989). Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. Science *244*, 1558–1564.
Kuffler, S.W. (1953). Discharge patterns and functional organization of mammalian retina.
Lalonde, M., Jollimore, C., Stevens, K., Barnes, S., and Kelly, M. (2006). Cannabinoid receptor-mediated inhibition of calcium signaling in rat retinal ganglion cells. Mol Vis.
Land, P., Kyonka, E., and Shamalla-Hannah, L. (2004). Vesicular glutamate transporters in the lateral geniculate nucleus: expression of VGLUT2 by retinal terminals. Brain Res *996*, 251–254.
Ledesma, M., Simons, K., and Dotti, C. (1998). Neuronal polarity: Essential role of protein–lipid complexes in axonal sorting. Proc National Acad Sci *95*, 3966–3971.
Lee, D., Carmichael, D., Krebs, E., and McKnight, G. (1983). Isolation of a cDNA clone for the type I regulatory subunit of bovine cAMP-dependent protein kinase. Proc National Acad Sci *80*, 3608–3612.
Lee, K., Soares, C., Thivierge, J.-P., and Béïque, J.-C. (2016). Correlated Synaptic Inputs Drive Dendritic Calcium Amplification and Cooperative Plasticity during Clustered Synapse Development. Neuron *89*, 784–799.
Lee, M., Sitko, A., Khalid, S., Shirasu-Hiza, M., and Mason, C. (2019). Spatiotemporal distribution of glia in and around the developing mouse optic tract. J Comp Neurol *527*, 508–521.
Lefkimmiatis, K., Moyer, M.P., Curci, S., and Hofer, A.M. (2009). “cAMP sponge”: a buffer for cyclic adenosine 3’, 5'-monophosphate. PLoS ONE *4*, e7649.
Leterrier, C., Lainé, J., Darmon, M., Boudin, H., Rossier, J., and Lenkei, Z. (2006). Constitutive Activation Drives Compartment-Selective Endocytosis and Axonal Targeting of Type 1 Cannabinoid Receptors. J Neurosci *26*, 3141–3153.
Leung, K.-M., Horck, F., Lin, A., Allison, R., Standart, N., and Holt, C. (2006). Asymmetrical β-actin mRNA translation in growth cones mediates attractive turning to netrin-1. Nat Neurosci *9*, 1247–1256.
Linden, D., and S (1999). Activation of presynaptic cAMP-dependent protein kinase is required for induction of cerebellar long-term potentiation. J Neuroscience *19*.
Litvin, T., Kamenetsky, M., Zarifyan, A., Buck, J., and Levin, L. (2003). Kinetic Properties of “Soluble” Adenylyl Cyclase SYNERGISM BETWEEN CALCIUM AND BICARBONATE. J Biol Chem *278*, 15922–15926.
Liu, G. (2004). Local structural balance and functional interaction of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal dendrites. Nat Neurosci *7*, 373–379.

Livesey, F., and Cepko, C. (2001). Vertebrate neural cell-fate determination: Lessons from the retina. Nat Rev Neurosci *2*, 35053522.
Lo, F.-S., and Mize, R. (2000). Synaptic Regulation of L-Type Ca2+ Channel Activity and Long-Term Depression during Refinement of the Retinocollicular Pathway in Developing Rodent Superior Colliculus. J Neurosci *20*, RC58–RC58.
Louail, A., Sierksma, M., Chaffiol, A., Assali, A., Couvet, S., Nedjam, M., Roche, F., Zagar, Y., Duebel, J., and Nicol, X. cAMP-dependant interactions between adjacent retinal ganglion cells influence axon pruning. In Preparation.
Lugnier, C. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. Pharmacol Ther.
Lund, R., Lund, J., and Wise, R. (1974). The organization of the retinal projection to the dorsal lateral geniculate nucleus in pigmented and albino rats. J Comp Neurol *158*, 383–403.
Luo, L., and Flanagan, J. (2007). Development of continuous and discrete neural maps. Neuron.
Lyckman, A., Fan, G., Rios, M., Jaenisch, R., and Sur, M. (2005). Normal eye-specific patterning of retinal inputs to murine subcortical visual nuclei in the absence of brain-derived neurotrophic factor. Visual Neuroscience *22*, 27–36.
Lüthi, A., Chittajallu, R., Duprat, F., Palmer, M., Benke, T., Kidd, F., Henley, J., Isaac, J., and Collingridge, G. (1999). Hippocampal LTD Expression Involves a Pool of AMPARs Regulated by the NSF–GluR2 Interaction. Neuron *24*, 389–399.
Ma, Y.-T., Hsieh, T., Forbes, M., Johnson, J., and Frost, D. (1998). BDNF Injected into the Superior Colliculus Reduces Developmental Retinal Ganglion Cell Death. J Neurosci *18*, 2097–2107.
Madison, D.V., Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1991). Mechanisms underlying long-term potentiation of synaptic transmission. Annu. Rev. Neurosci. *14*, 379–397.
Marachlian, E., Avitan, L., Goodhill, G., and Sumbre, G. (2018). Principles of Functional Circuit Connectivity: Insights From Spontaneous Activity in the Zebrafish Optic Tectum. Front Neural Circuit *12*, 46.
Markram, H., Lübke, J., Frotscher, M., and Sakmann, B. (1997). Regulation of Synaptic Efficacy by Coincidence of Postsynaptic APs and EPSPs. Science *275*, 213–215.
Masland, R. (1977). Maturation of function in the developing rabbit retina. J Comp Neurol *175*, 275–286.
Matzakos-Karvouniari, D., Gil, L., Orendorff, E., Marre, O., Picaud, S., and Cessac, B. (2019). A biophysical model explains the spontaneous bursting behavior in the developing retina. Sci Rep.
McLaughlin, T., Torborg, C., Feller, M., and O'Leary, D. (2003). Retinotopic Map Refinement Requires Spontaneous Retinal Waves during a Brief Critical Period of Development. Neuron *40*, 1147–1160.
Meister, M., Wong, R., Baylor, D., and Shatz, C. (1991). Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina. Science.
Middleton, T., and Protti, D. (2011). Cannabinoids modulate spontaneous synaptic activity in retinal ganglion cells. Vis Neurosci.
Mika, D., Leroy, J., Vandecasteele, G., and Fischmeister, R. (2012). PDEs create local domains of cAMP signaling. J Mol Cell Cardiol *52*, 323–329.
Ming, G.L., Wong, S.T., Henley, J., Yuan, X.B., Song, H.J., Spitzer, N.C., and Poo, M.M. (2002). Adaptation in the chemotactic guidance of nerve growth cones. Nature *417*, 411–418.
Mize, R., and Salt, T. (2004). Contribution of GABAergic inhibition to synaptic responses and LTD early in postnatal development in the rat superior colliculus. Eur J Neurosci *20*, 1331–1340.
Mooney, R., Klein, B., AM, and Rhoades, R. (1985). Extensive recrossing of retinotectal axons after neonatal unilateral superior collicular lesions in hamster. Brain Res.
Mooney, R., Shi, M., and Rhoades, R. (1994). Modulation of retinotectal transmission by presynaptic 5-HT1B receptors in the superior colliculus of the adult hamster. Journal of Neurophysiology.
Mooney, R., Penn, A., Gallego, R., and Shatz, C. (1996). Thalamic Relay of Spontaneous Retinal Activity Prior to Vision. Neuron *17*, 863–874.
Muir-Robinson, G., Hwang, B.J., and Feller, M.B. (2002). Retinogeniculate axons undergo eye-specific segregation in the absence of eye-specific layers. J. Neurosci. *22*, 5259–5264.

Munz, M., Gobert, D., Schohl, A., Poquérusse, J., Podgorski, K., Spratt, P., and Ruthazer, E.S. (2014). Rapid Hebbian axonal remodeling mediated by visual stimulation. Science *344*, 904–909.
Nevin, L., Taylor, M., and Baier, H. (2008). Hardwiring of fine synaptic layers in the zebrafish visual pathway. Neural Dev *3*, 36.
Nicol, X., and Gaspar, P. (2014). Routes to cAMP: shaping neuronal connectivity with distinct adenylate cyclases. Eur. J. Neurosci. *39*, 1742–1751.
Nicol, X., Muzerelle, A., Bachy, I., Ravary, A., and Gaspar, P. (2005). Spatiotemporal localization of the calcium-stimulated adenylate cyclases, AC1 and AC8, during mouse brain development. J Comp Neurol *486*, 281–294.
Nicol, X., Muzerelle, A., Rio, J.P., Métin, C., and Gaspar, P. (2006a). Requirement of adenylate cyclase 1 for the ephrin-A5-dependent retraction of exuberant retinal axons. J. Neurosci. *26*, 862–872.
Nicol, X., Bennis, M., Ishikawa, Y., Chan, G.C., Repérant, J., Storm, D.R., and Gaspar, P. (2006b). Role of the calcium modulated cyclases in the development of the retinal projections. Eur. J. Neurosci. *24*, 3401–3414.
Nicol, X., Voyatzis, S., Muzerelle, A., Narboux-Nême, N., Südhof, T., Miles, R., and Gaspar, P. (2007). cAMP oscillations and retinal activity are permissive for ephrin signaling during the establishment of the retinotopic map. Nat Neurosci *10*, 340–347.
Nicol, X., Hong, K.P., and Spitzer, N.C. (2011). Spatial and temporal second messenger codes for growth cone turning. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *108*, 13776–13781.
Nikolaev, V.O., Moshkov, A., Lyon, A.R., Miragoli, M., Novak, P., Paur, H., Lohse, M.J., Korchev, Y.E., Harding, S.E., and Gorelik, J. (2010). Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. Science *327*, 1653–1657.
Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science *308*, 1314–1318.
Ohno-Shosaku, T., and Kano, M. (2014). Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission. Curr Opin Neurobiol *29*, 1–8.
O'Leary, D., Fawcett, J., and Cowan, W. (1986). Topographic targeting errors in the retinocollicular projection and their elimination by selective ganglion cell death. J Neurosci.
Padmanabhan, Kareva, Kholodilov, and Burke (2013). Quantitative morphological comparison of axon-targeting strategies for gene therapies directed to the nigro-striatal projection. Gene Therapy *21*, 115–122.
Paolicelli, R., and Gross, C. (2011). Microglia in development: linking brain wiring to brain environment. Neuron Glia Biol.
Paolicelli, R., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giusetto, M., Ferreira, T., Guiducci, E., Dumas, L., et al. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. Sc Ience *333*.
Peace, A., and Shewan, D. (2011). New perspectives in cyclic AMP-mediated axon growth and guidance: The emerging epoch of Epac. Brain Res Bull *84*, 280–288.
Penn, A.A., Riquelme, P.A., Feller, M.B., and Shatz, C.J. (1998). Competition in retinogeniculate patterning driven by spontaneous activity. Science *279*, 2108–2112.
Petros, T., Rebsam, A., and Mason, C. (2008). Retinal Axon Growth at the Optic Chiasm: To Cross or Not to Cross. Annu Rev Neurosci *31*, 295–315.
Petros, T.J., Shrestha, B.R., and Mason, C. (2009). Specificity and sufficiency of EphB1 in driving the ipsilateral retinal projection. J. Neurosci. *29*, 3463–3474.
Pfeiffenberger, C., Cutforth, T., Woods, G., Yamada, J., Rentería, R.C.C., Copenhagen, D.R., Flanagan, J.G., and Feldheim, D.A. (2005). Ephrin-As and neural activity are required for eye-specific patterning during retinogeniculate mapping. Nat. Neurosci. *8*, 1022–1027.
Pfeiffenberger, C., Yamada, J., and Feldheim, D. (2006). Ephrin-As and Patterned Retinal Activity Act Together in the Development of Topographic Maps in the Primary Visual System. J Neurosci *26*, 12873–12884.
Pham, T., Rubenstein, J., Silva, A., Storm, D., and Stryker, M. (2001). The CRE/CREB pathway is transiently expressed in thalamic circuit development and contributes to refinement of retinogeniculate axons. Neuron.

Pietrobon, M., Zamparo, I., Maritan, M., Franchi, S., Pozzan, T., and Lodovichi, C. (2011). Interplay among cGMP, cAMP, and Ca2+ in Living Olfactory Sensory Neurons In Vitro and In Vivo. J Neurosci *31*, 8395–8405.
Pike, L. (2003). Lipid rafts bringing order to chaos. J Lipid Res *44*, 655–667.
Piper, M., and Holt, C. (2004). RNA TRANSLATION IN AXONS. Cell Dev Biology *20*, 505–523.
Plas, D., Visel, A., Gonzalez, E., She, W.-C., and Crair, M. (2004). Adenylate Cyclase 1 dependent refinement of retinotopic maps in the mouse. Vision Res *44*, 3357–3364.
Purves, D., Williams, S., Nundy, S., and Lotto, R. (2003). Perceiving the intensity of light. Psychological Review *111*, 142–158.
Qiao, J., Mei, F., Popov, V., Vergara, L., and Cheng, X. (2002). Cell Cycle-dependent Subcellular Localization of Exchange Factor Directly Activated by cAMP. J Biol Chem *277*, 26581–26586.
Ravary, A., Muzerelle, A., Hervé, D., Pascoli, V., Ba-Charvet, K.N., Girault, J.-A.A., Welker, E., and Gaspar, P. (2003). Adenylate cyclase 1 as a key actor in the refinement of retinal projection maps. J. Neurosci. *23*, 2228–2238.
Renier, N., Schonewille, M., Giraudet, F., Badura, A., Tessier-Lavigne, M., Avan, P., Zeeuw, C., and Chédotal, A. (2010). Genetic Dissection of the Function of Hindbrain Axonal Commissures. Plos Biol *8*, e1000325.
Rhoades, R., Bennett-Clarke, C., Lane, R., Leslie, M., and Mooney, R. (1993). Increased serotoninergic innervation of the hamster's superior colliculus alters retinotectal projections. J Comp Neurol *334*, 397–409.
Ringstedt, T., Braisted, J.E., Brose, K., Kidd, T., Goodman, C., Tessier-Lavigne, M., and O'Leary, D.D. (2000). Slit inhibition of retinal axon growth and its role in retinal axon pathfinding and innervation patterns in the diencephalon. J. Neurosci. *20*, 4983–4991.
Rodger, J., and Frost, D. (2009). Effects of trkB knockout on topography and ocular segregation of uncrossed retinal projections. Exp Brain Res *195*, 35–44.
Rodriguez, A.R., Perez de Sevilla Müller, L., and Brecha, N.C. (2014). The RNA binding protein RBPMS is a selective marker of ganglion cells in the mammalian retina. J Comp Neurol *522*, 1411–1443.
De Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A., and Bos, J.L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. Nature *396*, 474–477.
Rossi, F., Pizzorusso, T., Porciatti, V., Marubio, L., Maffei, L., and Changeux, J.-P. (2001). Requirement of the nicotinic acetylcholine receptor β2 subunit for the anatomical and functional development of the visual system. Proc National Acad Sci *98*, 6453–6458.
Salichon, N., Gaspar, P., Upton, A.L., Picaud, S., Hanoun, N., Hamon, M., De Maeyer, E., Murphy, D.L., Mossner, R., Lesch, K.P., et al. (2001). Excessive activation of serotonin (5-HT) 1B receptors disrupts the formation of sensory maps in monoamine oxidase a and 5-ht transporter knock-out mice. J. Neurosci. *21*, 884–896.
Sanes, J., and Masland, R. (2015). The types of retinal ganglion cells: current status and implications for neuronal classification. Annu Rev Neurosci.
Savier, E., Eglen, S., Bathélémy, A., Perraut, M., Pfrieger, F., Lemke, G., and Reber, M. (2017). A molecular mechanism for the topographic alignment of convergent neural maps. Elife *6*, e20470.
Schafer, D., Lehrman, E., and Stevens, B. (2013). The "quad-partite" synapse: Microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. Glia *61*, 24–36.
Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., Ransohoff, R.M., Greenberg, M.E., Barres, B.A., and Stevens, B. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. Neuron *74*, 691–705.
Scholl, B., Wilson, D., and Fitzpatrick, D. (2017). Local Order within Global Disorder: Synaptic Architecture of Visual Space. Neuron *96*, 1127–1138.e4.
Scott, J., Glaccum, M., Zoller, M., Uhler, M., Helfman, D., McKnight, G., and Krebs, E. (1987). The molecular cloning of a type II regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase from rat skeletal muscle and mouse brain. Proc National Acad Sci *84*, 5192–5196.

Sernagor, E., Young, C., and Eglen, S. (2003). Developmental modulation of retinal wave dynamics: shedding light on the GABA saga. J Neurosci.
Shah, R.D., and Crair, M.C. (2008). Retinocollicular synapse maturation and plasticity are regulated by correlated retinal waves. J. Neurosci. *28*, 292–303.
Shelly, M., Lim, B., Cancedda, L., Heilshorn, S., Gao, H., and Poo, M. (2010). Local and Long-Range Reciprocal Regulation of cAMP and cGMP in Axon/Dendrite Formation. Science *327*, 547–552.
Sherman, S., and Guillery, R. (2002). The role of the thalamus in the flow of information to the cortex. The Royal Society.
Sherman, S., and Spear, P. (1982). Organization of visual pathways in normal and visually deprived cats. Physiol Rev.
Shigeoka, T., Jung, H., Jung, J., Turner-Bridger, B., Ohk, J., Lin, J.Q., Amieux, P.S., and Holt, C.E. (2016). Dynamic Axonal Translation in Developing and Mature Visual Circuits. Cell *166*, 181–192.
Sickle, M., Duncan, M., Kingsley, P., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J., et al. (2005). Identification and Functional Characterization of Brainstem Cannabinoid CB_2 Receptors. Science *310*, 329–332.
Silva, A., Kogan, J., Frankland, P., and S (1998). CREB and memory. Annu Rev Neurosci.
Simon, D., and O'Leary, D. (1992). Influence of position along the medial-lateral axis of the superior colliculus on the topographic targeting and survival of retinal axons. Dev Brain Res *69*, 167–172.
Sitko, A.A., Kuwajima, T., and Mason, C. (2017). Eye-specific segregation and differential fasciculation of developing RGCs axons in the mouse visual pathway. Journal of Comparative Neurology.
Skalhegg, B., and Tasken, K. (2000). Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression,regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. Front Biosci.
Squarzoni, P., Thion, M., and Garel, S. (2015). Neuronal and microglial regulators of cortical wiring: usual and novel guideposts. Front Neurosci.
Sretavan, D.W., and Shatz, C. (1986). Prenatal development of cat retinogeniculate axon arbors in the absence of binocular interactions. J Neuroscience *6*.
Stacy, R., Demas, J., Burgess, R., Sanes, J., and Wong, R. (2005). Disruption and Recovery of Patterned Retinal Activity in the Absence of Acetylcholine. J Neurosci *25*, 9347–9357.
Stanton, P.K., and Sejnowski, T.J. (1989). Associative long-term depression in the hippocampus induced by hebbian covariance. Nature *339*, 215–218.
Stellwagen, D., and Shatz, C.J. (2002). An instructive role for retinal waves in the development of retinogeniculate connectivity. Neuron *33*, 357–367.
Stellwagen, D., Shatz, C.J., and Feller, M.B. (1999). Dynamics of retinal waves are controlled by cyclic AMP. Neuron *24*, 673–685.
Stevens, B., Allen, N., Vazquez, L., Howell, G., Christopherson, K., Nouri, N., Micheva, K., Mehalow, A., Huberman, A., Stafford, B., et al. (2007). The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. Cell *131*, 1164–1178.
Sudhof, T.C. (2004). The synaptic vesicle cycle. Annu. Rev. Neurosci. *27*, 509–547.
Sun, C., Speer, C., Wang, G.-Y., Chapman, B., and Chalupa, L. (2008). Epibatidine Application In Vitro Blocks Retinal Waves Without Silencing All Retinal Ganglion Cell Action Potentials in Developing Retina of the Mouse and Ferret. Journal of Neurophysiology *100*, 3253–3263.
Sunahara, R.K., Dessauer, C.W., and Gilman, A.G. (1996). Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *36*, 461–480.
Syed, M., Lee, S., Zheng, J., and Zhou, Z. (2004). Stage-dependent dynamics and modulation of spontaneous waves in the developing rabbit retina. J Physiology *560*, 533–549.
Takanaga, H., Yoshitake, T., Hara, S., Yamasaki, C., and Kunimoto, M. (2004). cAMP-induced Astrocytic Differentiation of C6 Glioma Cells Is Mediated by Autocrine Interleukin-6. J Biol Chem *279*, 15441–15447.
Taskén, K., and Aandahl, E.M. (2004). Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. Physiol. Rev. *84*, 137–167.
Taskén, K.A., Knutsen, H.K., Attramadal, H., Taskén, K., Jahnsen, T., Hansson, V., and Eskild, W. (1991). Different mechanisms are involved in cAMP-mediated induction of mRNAs for subunits of cAMP-dependent protein kinases. Mol. Endocrinol. *5*, 21–28.

Taylor, A., Wu, J., Tai, H.-C., and Schuman, E. (2013). Axonal Translation of β-Catenin Regulates Synaptic Vesicle Dynamics. J Neurosci *33*, 5584–5589.
Taylor, S., Buechler, J., and Yonemoto, W. (1990). cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. Annu Rev Biochem.
Thompson, L., and Holt, C. (1989). Effects of intraocular tetrodotoxin on the development of the retinocollicular pathway in the syrian hamster. J Comp Neurol *282*, 371–388.
Thompson, W.J., and Appleman, M.M. (1971). Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases of rat tissues. J. Biol. Chem. *246*, 3145–3150.
Torborg, C., and Feller, M. (2004). Unbiased analysis of bulk axonal segregation patterns. J Neurosci Meth *135*, 17–26.
Torborg, C., and Feller, M. (2005). Spontaneous patterned retinal activity and the refinement of retinal projections. Prog Neurobiol. *76*.
Tremblay, M.-È., Lowery, R., and Majewska, A. (2010). Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience. Plos Biol *8*, e1000527.
Triplett, J., and Feldheim, D. (2012). Eph and ephrin signaling in the formation of topographic maps. Semin Cell Dev Biol 23, 7–15.
Tsui-Pierchala, B.A., Encinas, M., J, and Johnson, E.M. (2002). Lipid rafts in neuronal signaling and function. TRENDS in Neuroscience *25*.
Upton, A.L., Salichon, N., Lebrand, C., Ravary, A., Blakely, R., Seif, I., and Gaspar, P. (1999). Excess of serotonin (5-HT) alters the segregation of ispilateral and contralateral retinal projections in monoamine oxidase A knock-out mice: possible role of 5-HT uptake in retinal ganglion cells during development. J. Neurosci. *19*, 7007–7024.
Upton, A.L., Ravary, A., Salichon, N., Moessner, R., Lesch, K.-P.P., Hen, R., Seif, I., and Gaspar, P. (2002). Lack of 5-HT(1B) receptor and of serotonin transporter have different effects on the segregation of retinal axons in the lateral geniculate nucleus compared to the superior colliculus. Neuroscience *111*, 597–610.
Vincent, P., Castro, L., Gervasi, N., Brito, M., and Paupardin-Tritsch, D. (2012). PDE4 control on cAMP/PKA compartmentation revealed by biosensor imaging in neurons. Horm Metab Res.
Visel, A., Alvarez-Bolado, G., Thaller, C., and Eichele, G. (2006). Comprehensive analysis of the expression patterns of the adenylate cyclase gene family in the developing and adult mouse brain. J Comp Neurol *496*, 684–697.
Voyatzis, S., Muzerelle, A., Gaspar, P., and Nicol, X. (2012). Modeling Activity and Target-Dependent Developmental Cell Death of Mouse Retinal Ganglion Cells Ex Vivo. Plos One *7*, e31105.
Wayman, G., Wei, J., Wong, S., and Storm, D. (1996). Regulation of type I adenylyl cyclase by calmodulin kinase IV in vivo. Mol Cell Biol *16*, 6075–6082.
Wayman, G.A., Impey, S., and Storm, D.R. (1995). Ca2+ inhibition of type III adenylyl cyclase in vivo. J. Biol. Chem. *270*, 21480–21486.
Wells, J.N., Wu, Y.J., Baird, C.E., and Hardman, J.G. (1975). Phosphodiesterases from porcine coronary arteries: inhibition of separated forms by xanthines, papaverine, and cyclic nucleotides. Mol. Pharmacol. *11*, 775–783.
Whitaker, C.M., and Cooper, N.G.F. (2009). The novel distribution of phosphodiesterase-4 subtypes within the rat retina. Neuroscience *163*, 1277–1291.
Wigström, H., and Gustafsson, B. (1985). Facilitation of hippocampal long-lasting potentiation by GABA antagonists. Acta Physiol Scand.
Williams, S., Mann, F., Erskine, L., Sakurai, T., Wei, S., Rossi, D., Gale, N., Holt, C., Mason, C., and Henkemeyer, M. (2003). Ephrin-B2 and EphB1 Mediate Retinal Axon Divergence at the Optic Chiasm. Neuron *39*, 919–935.
Willoughby, D., and Cooper, D. (2007). Organization and Ca2+ regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. Physiol Rev.
Wilson, R.I., and Nicoll, R.A. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. Nature *410*, 588–592.
Winnubst, J., Cheyne, J.E., Niculescu, D., and Lohmann, C. (2015). Spontaneous Activity Drives Local Synaptic Plasticity In Vivo. Neuron *87*, 399–410.

Wong, R. (1995). Effects of glutamate and its analogs on intracellular calcium levels in the developing retina. Vis Neurosci.
Wong, W., and Scott, J. (2004). AKAP signalling complexes: focal points in space and time. Nat Rev Mol Cell Bio *5*, 959–970.
Wong, H.H., Lin, J.Q., Ströhl, F., Roque, C.G.G., Cioni, J.-M.M., Cagnetta, R., Turner-Bridger, B., Laine, R.F., Harris, W.A., Kaminski, C.F., et al. (2017). RNA Docking and Local Translation Regulate Site-Specific Axon Remodeling In Vivo. Neuron *95*, 852–868.e8.
Wong, W.T., Myhr, K.L., Miller, E.D., and Wong, R.O. (2000). Developmental changes in the neurotransmitter regulation of correlated spontaneous retinal activity. J. Neurosci. *20*, 351–360.
Wu, C., Ivanova, E., Zhang, Y., and Pan, Z.-H.H. (2013). rAAV-mediated subcellular targeting of optogenetic tools in retinal ganglion cells in vivo. PLoS ONE *8*, e66332.
Wu, G.-C., Lai, H.-L., Lin, Y.-W., Chu, Y.-T., and Chern, Y. (2001). N-Glycosylation and Residues Asn805 and Asn890 Are Involved in the Functional Properties of Type VI Adenylyl Cyclase. J Biol Chem *276*, 35450–35457.
Wu, H., Cork, R., and Mize, R. (2000). Normal development of the ipsilateral retinocollicular pathway and its disruption in double endothelial and neuronal nitric oxide synthase gene knockout mice. J Comp Neurol *426*, 651–665.
Wu, K., Zippin, J., Huron, D., Kamenetsky, M., Hengst, U., Buck, J., Levin, L., and Jaffrey, S. (2006). Soluble adenylyl cyclase is required for netrin-1 signaling in nerve growth cones. Nat Neurosci *9*, 1257–1264.
Xiao, T., Roeser, T., Staub, W., and Baier, H. (2005). A GFP-based genetic screen reveals mutations that disrupt the architecture of the zebrafish retinotectal projection. Development *132*, 2955–2967.
Xiao, T., Staub, W., Robles, E., Gosse, N.J., Cole, G.J., and Baier, H. (2011). Assembly of Lamina-Specific Neuronal Connections by Slit Bound to Type IV Collagen. Cell *146*, 164–176.
Xu, H.-P., Burbridge, T., Ye, M., Chen, M., Ge, X., Zhou, Z., and Crair, M. (2016). Retinal Wave Patterns Are Governed by Mutual Excitation among Starburst Amacrine Cells and Drive the Refinement and Maintenance of Visual Circuits. J Neurosci *36*, 3871–3886.
Xu, H.P., Furman, M., Mineur, Y.S., Chen, H., King, S.L., Zenisek, D., Zhou, Z.J., Butts, D.A., Tian, N., Picciotto, M.R., et al. (2011). An instructive role for patterned spontaneous retinal activity in mouse visual map development. Neuron *70*, 1115–1127.
Yakura, T., Fukuda, Y., and Sawai, H. (2002). Effect of Bcl-2 overexpression on establishment of ipsilateral retinocollicular projection in mice. Neuroscience *110*, 667–673.
Yamada, M., Terao, M., Terashima, T., Fujiyama, T., Kawaguchi, Y., Nabeshima, Y., and Hoshino, M. (2007). Origin of Climbing Fiber Neurons and Their Developmental Dependence on Ptf1a. J Neurosci *27*, 10924–10934.
Yao, J., Sasaki, Y., Wen, Z., Bassell, G., and Zheng, J. (2006). An essential role for β-actin mRNA localization and translation in Ca2+-dependent growth cone guidance. Nat Neurosci *9*, nn1773.
Young, R. (1984). Cell death during differentiation of the retina in the mouse. J Comp Neurol *229*, 362–373.
Zarruk, J., Fernández-López, D., I, García-Gutiérrez, M., Vivancos, J., Nombela, F., Torres, M., Burgete, M., Manzanares, J., Lizasoain, I., et al. (2011). Cannabinoid type 2 receptor activation downregulates stroke-induced classic and alternative brain macrophage/microglial activation concomitant to neuroprotection. Stroke *43*.
Zhang, J., Ackman, J.B., Xu, H.-P.P., and Crair, M.C. (2012). Visual map development depends on the temporal pattern of binocular activity in mice. Nat. Neurosci. *15*, 298–307.
Zhang, L., Tao, H., Holt, C., Harris, W., and Poo, M. (1998). A critical window for cooperation and competition among developing retinotectal synapses. Nature.
Zhong, H., Sia, G., Sato, T., Gray, N., Mao, T., Khuchua, Z., Huganir, R., and Svoboda, K. (2019). Subcellular dynamics of type II PKA in neurons. Neuron.
Ziburkus, J., Dilger, E.K., Lo, F.-S.S., and Guido, W. (2009). LTD and LTP at the developing retinogeniculate synapse. J. Neurophysiol. *102*, 3082–3090.

Zivraj, K., Tung, Y., Piper, M., Gumy, L., Fawcett, J., Yeo, G., and Holt, C. (2010). Subcellular Profiling Reveals Distinct and Developmentally Regulated Repertoire of Growth Cone mRNAs. J Neurosci *30*, 15464–15478.

La coopération entre cellules ganglionnaires de la rétine façonne la connectivité du système visuel

Les cartes visuelles formées par les projections rétiniennes dans le cerveau se développent progressivement grâce à des mécanismes compétitifs, dépendants notamment de l'activité des neurones et de la signalisation AMPc. Il a été montré que ces mécanismes compétitifs dépendaient de l'activité relative entre les deux yeux (inter-œil). Le rôle de l'activité relative des cellules adjacentes (intra-œil) a également été suggéré, mais n'a en revanche pas été étudié jusqu'ici compte-tenu du défi technique que posent ces investigations. Cette thèse de doctorat s'intéresse tout particulièrement à l'étude des mécanismes compétitifs et coopératifs impliqués dans le développement des cartes visuelles. Le développement d'un outil moléculaire générant une mosaïque de deux populations de cellules a permis l'examen de ces interactions entre CGR dans un organisme intact.

Les résultats décrits dans ce travail démontrent que des mécanismes coopératifs participent au raffinement des connexions des CGR adjacentes. Cette coopération lors de la stabilisation des arborisations axonales dépend de la signalisation AMPc au sein des CGR. Elle n'influence en revanche ni le guidage des axones, ni la mort cellulaire, ni les vagues d'activité spontanée rétiniennes ; suggérant une localisation de ces mécanismes au niveau des cibles visuelles plutôt que de la rétine. De plus, des résultats préliminaires suggèrent que des changements de morphologie des synapses pourraient être impliqués. Ces données dans l'ensemble supposent l'existence de signaux locaux d'AMPc, comme il a déjà été envisagé dans la littérature, dans le compartiment somatique ou axonal des CGR. J'ai développé des outils moléculaires qui permettraient la perturbation de la signalisation AMPc spécifiquement au niveau de l'un ou l'autre de ces deux compartiments.

Un deuxième projet de ce travail de thèse révèle que l'activité électrique intrinsèque des CGR est essentielle pour leur développement et leur maintien au sein de leurs cibles, dès que leurs axones atteignent le thalamus.

Dans l'ensemble, ce travail de thèse démontre l'existence de mécanismes de co-stabilisation de connexions de neurones adjacents, qui coopèrent pendant la compétition entre axones. Puisque l'activité spontanée des neurones voisins est synchrone dans de nombreuses régions du cerveau, ces données permettront de mieux comprendre les procédés qui sous-tendent les mécanismes compétitifs pendant le développement de la connectivité neuronale.