



Étude du lignage des cellules progénitrices rétiniennes chez le poulet : origine des classes et types neuronaux

Franck Maurinot

► To cite this version:

Franck Maurinot. Étude du lignage des cellules progénitrices rétiniennes chez le poulet : origine des classes et types neuronaux. Neurobiologie. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS275 . tel-03143968

HAL Id: tel-03143968

<https://theses.hal.science/tel-03143968>

Submitted on 17 Feb 2021

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 Université

ED158 – Ecole Doctorale Cerveau, Cognition, Comportement

Institut de la Vision

SU UM80, Inserm U968, CNRS UMR7210

Étude du lignage des cellules progénitrices rétiniennes chez le poulet : origine des classes et types neuronaux

Thèse de doctorat en Neurobiologie

Par Franck MAURINOT

Présentée et soutenue publiquement le 26 septembre 2019

Devant un jury composé de :

Isabelle CAILLÉ

Muriel PERRON

Xavier MORIN

Laure BALLY-CUIF

Jean LIVET

Présidente du jury

Rapporteure

Rapporteur

Examinatrice

Directeur de thèse



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

À Patou, à Mimiche

*À M^{me} Grajwoda, M. Douchet
et Isabelle Caillé*

Sommaire

	Page
Liste des figures	7
Liste des abréviations	9
 Remerciements	 11
 Introduction	 13
Avant-propos	15
I] L'œil des vertébrés	17
II] Développement du système visuel	41
III] Approches de suivi du lignage des RPC	77
Objectifs de la thèse	83
 Matériel & méthodes	 85
 Résultats	 93
I] Marquage de clones rétiniens chez l'embryon de poulet avec la stratégie MAGIC Markers	95
II] Le développement des classes de neurones rétiniens	105
III] Dispersion tangentielle des clones rétiniens	121
IV] Le développement des types neuronaux rétiniens	125
V] Approche de perturbation de la mosaïque des types neuronaux rétiniens	149
VI] Premiers éléments de caractérisation physiologique des types neuronaux de la rétine aviaire	155
 Discussion	 161
 Bibliographie	 179
Annexes	201

Liste des figures

Introduction

- Figure 1 – Anatomie de l'œil humain**
- Figure 2 – Organisation de la rétine des vertébrés**
- Figure 3 – Morphologie de la glie de Müller**
- Figure 4 – Méthodes classiques d'identification des types de neurones rétiniens**
- Figure 5 – Méthodes exhaustives d'identification des types de neurones rétiniens**
- Figure 6 – Échantillonnage du champ visuel par la rétine**
- Figure 7 – Répartition hétérogène des photorécepteurs dans les rétines de trois vertébrés**
- Figure 8 – Circuit physiologique des neurones excitateurs de la rétine**
- Figure 9 – Développement du système visuel de la drosophile**
- Figure 10 – Développement précoce de l'œil chez les vertébrés**
- Figure 11 – Modélisation des propriétés mécaniques des épithelia**
- Figure 12 – Ordre de naissance des différentes classes de cellules rétinienne**
- Figure 13 – Réseaux de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des différentes classes de cellules rétinienne**
- Figure 14 – Identification des différentes classes de neurones rétiniens dans les lignées de poissons zèbres *SoFa***
- Figure 15 – Modèles du lignage des RPC et de la génération des différentes classes de cellules rétinienne**
- Figure 16 – Modèles d'établissement de la mosaïque des neurones rétiniens**

Résultats

Orientation et nomenclature des images :

Toutes les vues radiales (en coupe) des rétines sont présentées dans l'orientation conventionnelle en neurosciences, avec la face externe vers le haut et la face interne vers le bas des images.

Sauf exception, le marquage employé est indiqué dans le coin inférieur gauche des images, les informations sur l'expérience dont la rétine est issue sont mentionnées dans le coin supérieur droit, et la barre d'échelle est située en bas à droite. La lettre "e" désigne le stade d'électroporation, "t" le stade éventuel d'injection de 4-hydroxytamoxifène et "s" le stade de sacrifice.

Boxplots :

Les boxplots, ou boîtes à moustaches, présentées dans cette thèse ont été tracées avec R et le package ggplot2. La boîte représente l'intervalle entre le premier et le troisième quartile de la distribution étudiée. Les moustaches s'étendent entre les données minimales et maximales dont la valeur ne dépasse pas 1,5x l'écart interquartile. Les valeurs anormalement éloignées ("outliers") sont représentées par des points séparés aux extrémités des moustaches.

Figure 17 – Suivi du lignage cellulaire dans la rétine aviaire avec l'approche *MAGIC Markers*

Figure 18 – Exemples de clones rétiniens identifiés par les *MAGIC markers*

Figure 19 – Morphologie de la rétine aviaire à différents stades

Figure 20 – Critères de définition des clones rétiniens avec la stratégie *MAGIC Markers*

Figure 21 – Analyse de l'organisation radiale des colonnes de cellules composant les clones rétiniens

Figure 22 – Hybridation *in situ* du gène *Btg2*

Figure 23 – iOn, un nouveau système de restriction de l'expression épisomale des transposons ouvrant la voie à l'étude de sous-lignages spécifiques chez le poulet

Figure 24 – Contrôle de l'activation du marquage *Brainbow* avec $^{PB}Atoh7^{\infty}Cre$

Figure 25 – Analyse des potentialités individuelles des RPC *Atoh7*⁺

Figure 26 – Observation des clones générés par des RPC *Atoh7*⁺ à différents stades de développement

Figure 27 – Dispersion tangentielle des clones rétiniens

Figure 28 – Caractérisation spatiale et cinétique de la dispersion tangentielle des clones aux stades précoces

Figure 29 – Validation d'un protocole d'immunohistochimie et de transparisation compatible avec le marquage multicolore *Brainbow*

Figure 30 – Etapes d'imagerie et d'analyse pour l'étude du lignage des types neuronaux rétiniens

Figure 31 – Qualité de la segmentation

Figure 32 – Présentation des marqueurs de types neuronaux rétiniens choisis

Figure 33 – Caractérisation des marqueurs de cellules amacrines

Figure 34 – Tests de colocalisation des marqueurs de cellules amacrines

Figure 35 – Caractérisation des marqueurs de cellules ganglionnaires

Figure 36 – Distribution des trois types d'AC étudiés dans les clones identifiés par les MAGIC Markers

Figure 37 – Corrélation entre taille des clones et nombre d'AC marquées

Figure 38 – Modélisation de la distribution des différents types d'AC dans les clones

Figure 39 – Distribution du marqueur *Isl1* dans les clones au niveau de la RGL

Figure 40 – La surexpression de NICD par un vecteur iOn déforme la mosaïque des sous-types rétiniens

Figure 41 – Combinaison des informations fonctionnelles et ontogéniques dans un même échantillon

Figure 42 – Obtention de réponses unitaires à la lumière dans des rétines ex vivo avec un système de *microelectrode array* (MEA)

Figure 43 – Expression de GCaMP6f dans la rétine d'embryons aviaires tardifs

Discussion

Figure 44 – Modèles de l'établissement de l'organisation mosaïque des types neuronaux rétiniens via la dispersion des RPC précoces

Liste des abréviations

(Expression originale en anglais s'il y a lieu)

4-OH-TX : 4-hydroxyTamoxifène

5-HT : 5-HydroxyTryptamine, ou
sérotonine

AC : cellules amacrines (**A**macrine **C**ells)

BC : cellules bipolaires (**B**ipolar **C**ells)

CMZ : zone marginale ciliaire (**C**iliary
Marginal **Z**one)

dAC : cellules amacrines déplacées
(**d**isplaced **A**macrine **C**ells)

ddl : degrés de liberté

dRGC : cellules ganglionnaires
réiniennes déplacées (**d**isplaced **R**etinal
Ganglion **C**ells)

DRP : profil d'accumulation de la densité
(**D**ensity **R**ecovery **P**rofile)

dsRGC : cellules ganglionnaires
réiniennes spécifiques de la direction
(**d**irection-selective **R**etinal **G**anglion
Cells)

En : stade embryonnaire n (en jours)

FP : protéine fluorescente (**F**luorescent
Protein)

GECI : indicateurs calciques encodés
génétiquement (**G**enetically **E**ncoded
Calcium **I**ndicator)

GINA : rapporteurs transgéniques de
l'activité neuronale (**G**enetic **I**ndicator of
Neuronal **A**ctivity)

GMC : cellule mère ganglionnaire
(**G**anglion **M**other **C**ell)

HC : cellules horizontales (**H**orizontal
Cells)

IHC : ImmunoHistoChimie

ILM : membrane limitante interne (**I**nter
Limiting **M**embrane)

INL : couche nucléaire interne (**I**nter
Nuclear **L**ayer)

iOn : expression dépendante de
l'intégration (integration **O**n)

IPL : couche plexiforme interne (**I**nter
Plexiform **L**ayer)

ipRGC : cellules ganglionnaires
réiniennes intrinsèquement photosensibles
(intrinsically **p**hotosensitive **R**etinal
Ganglion **C**ells)

LFP : potentiel de champs local (**L**ocal
Field **P**otential)

LGN : corps géniculé latéral (**L**ateral
Geniculate **N**ucleus)

LiOn : version virtuellement sans fuite
d'iOn (**L**eakproof **i**On)

LMC : cellules monopolaires laminaires
(**L**amina **M**onopolar **C**ells)

LPC : cellules progénitrices de la lamina
(**L**amina **P**rogenitor **C**ells)

MAGIC markers : marqueurs colorés
multi-adressables intégrant le génome
(**M**ulti-**A**dressable **G**enome-**I**ntegrative
Color markers)

MEA : puce à microélectrodes (**M**icro-
Electrodes **A**rray)

MG : glie de Müller (**M**üller **G**lia)

NB : NeuroBlaste

NICD : domaine intracellulaire de Notch
(**N**otch **I**nter**C**ellular **D**omain)

ONL : couche nucléaire externe (**O**uter
Nuclear **L**ayer)

OPC : centre de prolifération externe
(**O**uter **P**roliferation **C**enter)

OPL : couche plexiforme externe (**O**uter
Plexiform **L**ayer)

PR : photorécepteurs (**P**hoto**R**eceptors)

PRE : territoire présomptif de la rétine
(**P**resumptive **R**etinal **E**ctoderm)

PSTH : histogramme du temps de
péristimulus (**P**eri**S**timulus **T**ime
Histogram)

PV : ParValbumine

RA : acide rétinoïque (**R**etinoic **A**cid)

Rétine : désigne la rétine neurale par simplification, sauf contre-indication

RBC : cellules bipolaires à bâtonnets (**Rod Bipolar Cells**)

RGC : cellules ganglionnaires rétinienne (**Retinal Ganglion Cells**)

RGL : couche ganglionnaire rétinienne (**Retinal Ganglion Layer**)

RI : indice de régularité (**Regularity Index**)

RPC : cellule progénitrice rétinienne (**Retinal Progenitor Cell**)

RPE : épithélium pigmentaire rétinien (**Retinal Pigmented Epithelium**)

SAC : cellules amacrines « starburst » (**Starburst Amacrine Cells**)

SNC : Système Nerveux Central

SNR : ratio signal/bruit (**Signal to Noise Ratio**)

Remerciements

Ce projet de recherche, commencé pendant mon stage de M2 et poursuivi en doctorat s'est étalé sur quatre années et demie. Il m'aurait été impossible de le conduire à bien sans l'aide de toutes les personnes qui m'ont accompagné sur ce chemin. Je tiens donc à toutes les remercier pour leur aide et leur soutien inestimables avant de présenter mes travaux.

Tout d'abord un grand merci aux membres de mon jury de thèse. À Isabelle Caillé, qui m'accompagne déjà depuis la L3 du Magistère Européen de Génétique ; je peux compter sur son oreille attentive et ses conseils précieux depuis tout ce temps. À Muriel Perron, qui a déjà suivi tout le projet à travers mes longs comités de suivi de thèse, j'ai grandement profité de ses conseils et son regard expert sur le développement de la rétine des vertébrés. À Xavier Morin ; j'ai déjà pu compter sur son hospitalité quand j'ai eu besoin de réaliser des expériences dans son labo ainsi que pour les discussions scientifiques toujours intéressantes. À Laure Bally-Cuiff, que j'avais déjà eu la chance d'avoir en cours durant mon master, pour sa bienveillance. Elle a accepté d'être mon examinatrice malgré un rapport HCERES à rendre pour toute son unité. Enfin, à tous les membres de mon jury pour leur patience et leur compréhension malgré l'envoi tardif du manuscrit ainsi que pour l'échange scientifique passionnant à la suite de ma soutenance.

Merci à mon directeur de thèse, Jean Livet, pour la grande liberté et la confiance qu'il m'a portée au cours de ma thèse. Pour les longues conversations passionnantes et sa large expertise scientifique en biologie. Enfin, également pour sa générosité, il a toujours fait en sorte que j'aie les moyens requis pour mon projet et il m'a donné l'opportunité de participer à des congrès et des cours d'été internationaux sans compter.

Mille mercis aux membres de mon équipe. En particulier à Mickaël et Marion sans qui je n'aurais tout simplement pas pu terminer cette thèse telle que vous l'avez aujourd'hui entre les mains. Ils ont littéralement électroporé des milliers d'œufs, réalisé des immunos sur des centaines de rétines, et compté pour moi des milliers de cellules sans compter le reste ! J'ai toujours pu compter sur eux que ce soit pour mon projet, pour les tâches de l'équipe ou même en dehors du labo. Leur aide aura été inestimable. À Karine, première personne que j'ai rencontrée à l'institut et grâce à qui j'ai rejoint l'équipe. À Raphaëlle, qui m'a transmis le protocole d'électroporation *in ovo* qu'elle avait elle-même mis en place au sein de l'équipe et bien d'autres choses. À Solène, doctorante qui m'a précédé d'un an dans l'équipe, nous avons pu nous soutenir dans les joies et les peines du doctorat ! À Jason, sur qui j'ai aussi pu compter pendant plusieurs années avant son départ et l'arrivée de Marion. À Laura avec qui je partage la même vocation pour l'enseignement, pour nos longues conversations passionnantes. Enfin, merci aussi à Katie, Takuma, Dragos et Samuel que j'ai eu la chance de côtoyer dans l'équipe à différentes périodes, pour vos conseils et nos discussions.

Merci aux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer : Célia, Michael, Elaine et Claire. Avec une mention particulière à Célia et Michael, qui m'ont aidé à mettre en place les protocoles d'immunohistochimie et de transposition sur rétine entière. Et à Claire, dont les travaux sur la dispersion des colonnes de cellules dans les clones rétinien sont inclus dans ces pages.

Un grand merci aux membres de l'administration qui travaillent avec mon équipe, en particulier Vera, la gestionnaire achat qui s'occupe de nos commandes. Sans son soutien administratif, ces travaux n'auraient pas été possibles. Et aussi à Christelle, Cédric et Nathalie pour leur aide ponctuelle au cours de mon doctorat.

Un immense merci aux membres des deux bureaux que j'ai eu la chance d'occuper avec eux. Tout d'abord à Amélie, Céline, Antoine et Oriane pendant mon stage. Puis à Chloé, François, Giuliana, Solène, Eljo, Sergi et Robin pendant mes longues années de thèse. À eux tous que ce soit pour les discussions scientifiques, pour l'oreille attentive ou pour les blagues qui permettent de décompresser !

Merci aux personnes qui m'ont aidé et transmis leur savoir dans des domaines pour lesquels je reste encore un peu profane. En l'occurrence à Antoine, Romain et Baptiste pour la physiologie, que ce soit l'acquisition ou le traitement des données. Et à Tristan et Anatole, pour leur aide précieuse dans l'analyse des données issues de la quantification des clones, qui se révèle plus subtile que je ne l'aurais cru.

Merci aux compagnons de la pièce poulet : Barbara, Diego, Elisabeth et Gérard. Et enfin aux autres doctorants de ma promo et aux autres personnes de l'IDV que j'ai aussi eu la chance de côtoyer et que je n'ai pas déjà cités : Alice, Kévin, Anna, Gregor, Fiona, Sarah, Johann, Sandrine, Manuela, Stéphane.

Merci également à mes collègues de TP à Jussieu : Anne, Soria, Alix et Solène. C'est en partie grâce à elles que l'enseignement a tenu une place toute particulière pour moi au cours de ma thèse.

Sur une note plus personnelle, je tiens aussi à remercier ma famille, en particulier mes parents, ils m'ont toujours soutenu et encouragé, quelles que soient les voies que je souhaite emprunter. Également à mes amis, Marie, Anastasia, Fanny, Ilan, Charlotte, Mélanie, dont certains ont partagé avec moi le chemin ardu du doctorat. Et un immense merci à Chris qui m'accompagne, me supporte et me soutient au quotidien depuis plus de sept ans déjà. La réussite de ce doctorat aurait été impossible pour moi sans le soutien indéfectible de mes proches.

Un mot enfin sur les dédicaces de cette thèse. À Patou, tu es pour moi un exemple de force et de bonté toujours renouvelé. À feu mon grand-oncle Michel, Mimiche pour la famille, tu étais un explorateur et un chercheur à ta façon et tu as ouvert pour moi le chemin de la curiosité. À M^{me} Grajwoda, M. Douchet et Isabelle Caillé, trois enseignants exceptionnels que j'ai eu la chance de croiser au cours de mon parcours académique. Ils m'ont ouvert la voie qui m'a mené jusqu'à cette thèse et m'ont permis de découvrir ma vocation pour l'enseignement. Tous continueront à m'inspirer pour le restant de mes jours.

Introduction

Le système nerveux central des vertébrés est un des principaux objets d'étude de la biologie moderne. Le tissu nerveux est riche et complexe. Son étude fait appel à plusieurs spécialités complémentaires qui ont progressées de manière importante dans les deux dernières décennies.

La physiologie emploie des approches de plus en plus raffinées capables de mesurer l'activité et de stimuler simultanément plusieurs neurones avec une résolution temporelle excellente. La génétique et la biologie moléculaire sont entrées dans l'ère « omique », avec notamment des analyses à haut débit permettant de disséquer l'identité moléculaire de plusieurs milliers de cellules individuelles dans un tissu. L'anatomie s'est également fortement développée avec l'essor de l'imagerie optique et électronique en 3D.

Ces avancées techniques permettent non seulement de mieux comprendre le système nerveux mature mais également son développement, intimement lié à sa future fonction.

Cette thèse a cherché à joindre ces deux aspects en utilisant comme modèle la rétine aviaire. Le poulet (*Gallus gallus*) est un organisme modèle qui présente de nombreux avantages et a été utilisé extensivement par le passé (Cajal 1893; Creuzet et al. 2005; Hamburger & Hamilton 1951). Son embryon situé dans l'œuf est facile d'accès et peut être manipulé à des stades très précoces. Cela permet d'explorer des questions sur le développement à des stades difficilement accessibles chez les mammifères. De plus, comme pour les humains, la vision est le sens premier des oiseaux. Certaines espèces de cette classe, comme les rapaces, possèdent même une à deux fovéas (Bringmann 2019).

Bien qu'il soit difficile d'établir des lignées transgéniques de poulet comparativement avec d'autres modèles comme la souris ou le poisson zèbre, de nouvelles techniques basées sur des vecteurs intégrables au génome procurent maintenant des capacités expérimentales quasi équivalentes. Ces nouvelles approches conduisent ces dernières années à un regain d'intérêt croissant pour le poulet comme modèle d'étude (Vergara & Canto-Soler 2012). Un désavantage de la rétine du poulet est cependant que, comme celle des autres oiseaux diurnes, elle est composée majoritairement de cônes. On peut donc s'attendre à des différences par rapport à la rétine humaine, majoritairement à bâtonnets, comme celles de nombreux mammifères.

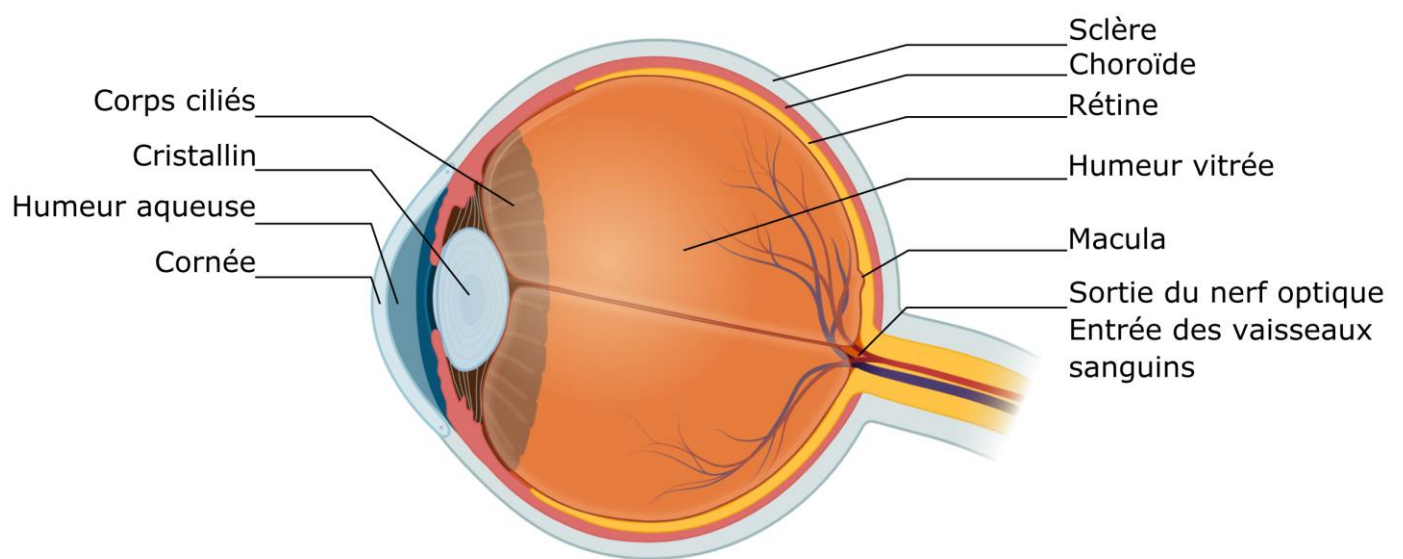


Figure 1 – Anatomie de l'œil humain

Schéma des différents tissus composant l'œil humain.

I] L'œil des vertébrés

Cette première partie de l'introduction propose d'abord une description succincte de l'œil des vertébrés, suivie d'une description plus détaillée de la rétine neurale. J'aborderai la hiérarchie des classes et des types utilisée pour classer les neurones dans le cas particulier de la rétine. Je décrirai également la physiologie de la rétine et des différentes classes et types de neurones rétiniens. En effet, leur catégorisation est avant tout physiologique et il apparaît capital de décrire cet aspect avant de passer à l'étude de la rétino-génèse.

I.1) Les différents tissus composant l'œil

L'œil des vertébrés (**figure 1**) est composé de plusieurs tissus organisés en couches concentriques, comprenant, de l'extérieur vers l'intérieur :

- La sclère, un tissu épais, blanc et opaque : elle maintient la forme de l'œil et le protège des chocs et des agressions mécaniques.
- La choroïde, un tissu fin, vascularisé et pigmenté : elle partage un rôle de soutien avec le RPE (voir ci-dessous). Elle participe, entre autres, à l'approvisionnement de la rétine en nutriments.
- La rétine, constituée elle-même de deux tissus :
 - L'épithélium pigmentaire rétinien (RPE), accolé à la rétine neurale et constitué d'une monocouche de cellules pigmentées. Il absorbe les photons et est de ce fait opaque à la lumière. En contact étroit avec les photorécepteurs de la rétine neurale, il participe au recyclage du rétinal au cours du cycle visuel, indispensable au bon fonctionnement des photorécepteurs.
 - La rétine neurale, la partie la plus interne de l'œil, contient les neurones et les cellules gliales impliqués dans la vision.

Les axones des cellules ganglionnaires fasciculent et convergent au niveau de la cicatrice de la fissure choroïde, point de fermeture de l'œil au cours du développement. C'est là que le nerf optique quitte l'œil avant de projeter vers le chiasma optique puis vers le colliculus supérieur et le corps géniculé latéral (LGN) chez les mammifères. Les projections se font en majorité vers le tectum optique chez les oiseaux.

Les vaisseaux sanguins entrent par le point de sortie du nerf optique pour irriguer la rétine. Chez les oiseaux, une structure spécialisée, le pecten, concentre les vaisseaux sanguins de la

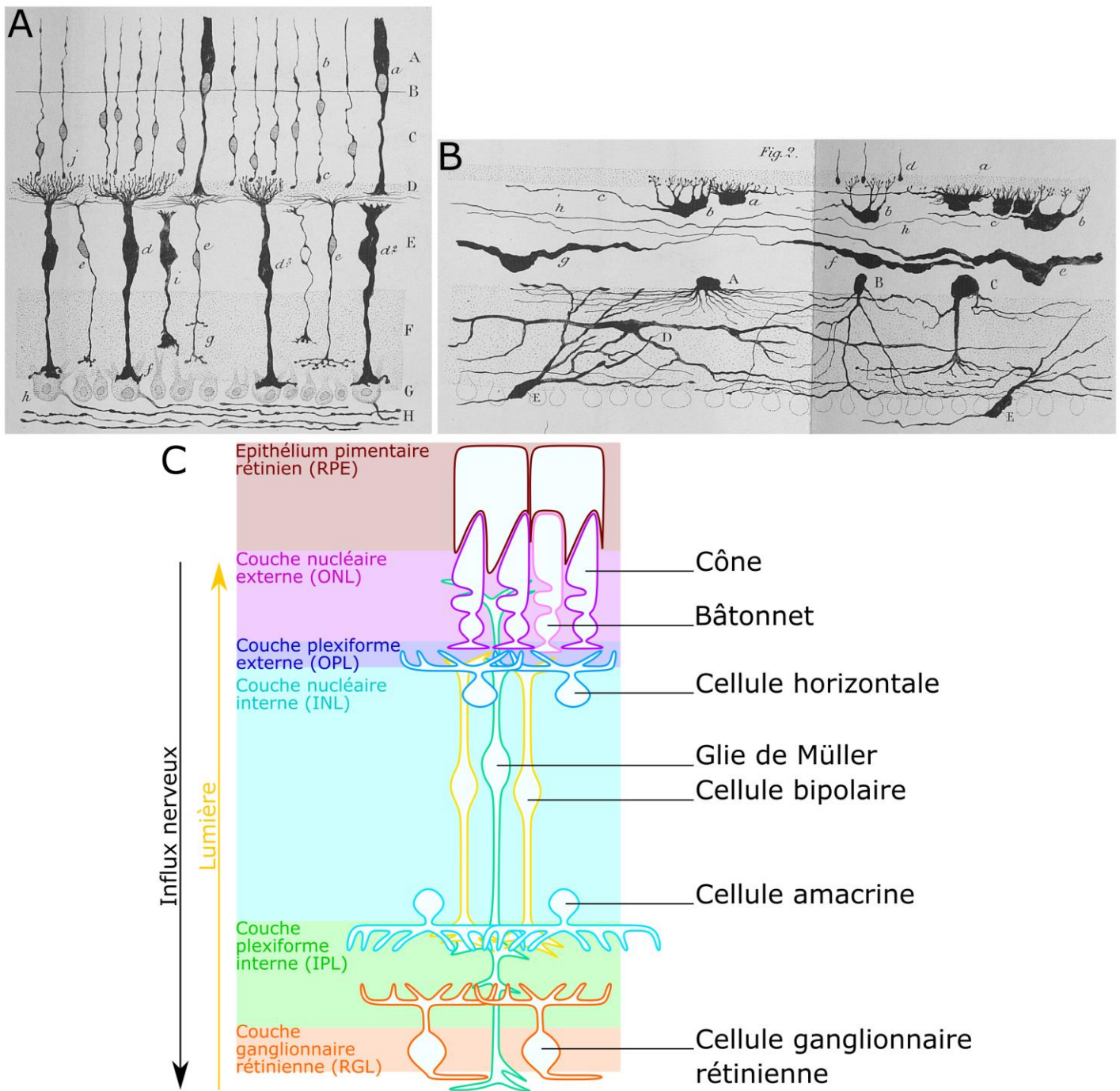


Figure 2 – Organisation de la rétine des vertébrés

A & B – Dessins issus de (Cajal 1893) de cellules de la rétine de poissons colorées avec la technique de Golgi. A – Cellules de la rétine de la sape (*Box salpa*). En (A) couche des segments externes des photorécepteurs, en (C) ONL, en (D) OPL, en (E) INL, en (F) IPL, en (G) RGL et en (H) couche des axones convergeant vers le nerf optique. Des cônes (a), des bâtonnets (b, c), des cellules bipolaires à bâtonnets (d, f, j) ainsi que des cellules bipolaires à cônes (e, g) sont représentées. Les cellules ganglionnaires sont également dessinées, plus claires, parfois avec leur axone (h). B – Cellules de l'INL et de la RGL de la carpe (*Cyprinus carpio*). Des cellules horizontales (a, b, c, e, f, g) sont représentées ainsi que diverses cellules amacrines (A, B, C, D) et des cellules ganglionnaires (E).

C – Schéma des différentes classes de cellules rétinienne organisées en couches.

rétine. Cela permet une oxygénation optimisée du tissu neural en diminuant la présence de vaisseaux dans la rétine qui bloqueraient sinon la transmission lumineuse.

I.2) L'organisation de la rétine

I.2.1) L'épithélium pigmentaire rétinien

De façon contre-intuitive, la lumière pénètre la rétine par sa face interne tandis que les cellules photosensibles se situent sur sa face la plus externe. Cette organisation a un rôle protecteur pour les photorécepteurs et permet un contact étroit entre les cellules du RPE, à l'extérieur de la rétine neurale, et les segments externes des photorécepteurs (**figure 2**).

Le RPE est à la base du renouvellement des segments externes des photorécepteurs. Il a également un rôle primordial pour le recyclage enzymatique du rétinol 11-cis requis pour la phototransduction dans les PR. Ce cycle diffère pour les cônes et les bâtonnets et, par conséquent, entre les espèces dont les rétines sont dominées par l'une ou l'autre sous-classe de PR (Mata et al. 2002). En particulier, l'isomérohydrolase RPE65 qui catalyse l'étape clef dans la régénération du rétinol 11-cis est plus efficace chez le poulet que chez les mammifères dont la rétine est dominée par des bâtonnets (Moiseyev et al. 2008). Chez le poulet, le cycle de régénération du rétinol prend aussi en partie place dans le RPE, les PR et la glie de Müller (Muniz et al. 2007; Trevino et al. 2005). Le RPE participe également à l'équilibre hydrique autour des PR, et contrôle concentrations ioniques et pression osmotique en fonction des conditions lumineuses (Li et al. 1993; Sato et al. 1985).

I.2.2) Classes et organisation radiale des neurones rétiniens

La rétine neurale comprend trois couches nucléaires : externe, interne et ganglionnaire. Ces couches contiennent les corps cellulaires des neurones des différentes classes ainsi que des cellules gliales de Müller. Les couches nucléaires sont séparées par deux couches plexiformes contenant les arborisations dendritiques des différentes classes de neurones et où se forment leurs contacts synaptiques (**figure 2**).

Le contenu des trois couches nucléaires de la rétine est le suivant :

- La couche nucléaire externe (ONL) contient des neurones spécialisés dans la transduction du signal lumineux en impulsions électriques. Ils forment la classe des photorécepteurs (PR), divisés en bâtonnets et cônes.

Nomenclature – Classes et types de neurones

Dans ce manuscrit, la nomenclature de classes et types suggérée par H. Zeng et J. R. Sanes (Zeng & Sanes 2017) est adoptée pour identifier les différentes catégories de neurones rétiniens.

Dans la rétine neurale, on utilisait historiquement les termes de type pour les différentes classes de neurones et de sous-type pour les différents types. Ce découpage type/sous-type sous-entend une relation hiérarchique potentiellement erronée entre ces deux niveaux de l'identité.

Cette nomenclature permet aussi une harmonisation avec d'autres régions du système nerveux comme le cortex. Dans ce dernier, on peut identifier plusieurs classes de neurones, elles-mêmes découpées en types qui peuvent être parfois découpées en sous-types. Aucun sous-type au sens de Zeng et Sanes n'a été observé à ce jour dans la rétine.

On peut observer dans la littérature qu'un nombre croissant d'auteurs adoptent cette nomenclature dans la rétine.

- La couche nucléaire interne (INL) contient la plus grande diversité de classes de neurones rétiniens. En son centre, elle contient les cellules bipolaires (BC) qui transmettent l'information visuelle des photorécepteurs vers la couche nucléaire la plus interne. L'INL contient les corps cellulaires des cellules horizontales (HC) dans sa partie la plus externe, et ceux de la majeure partie des cellules amacrines (AC) dans sa région interne. Ces deux classes d'interneurones rétiniens sont importantes pour le filtrage et le traitement de l'information visuelle dans les couches plexiformes externe et interne, respectivement. L'INL contient enfin le noyau et une partie du cytoplasme des cellules de la glie de Müller. Ces cellules gliales spécifiques de la rétine et originaires des mêmes progéniteurs que les différentes classes de neurones rétiniens ont plusieurs fonctions essentielles au bon fonctionnement de la rétine neurale (voir ci-dessous).

- La couche ganglionnaire rétinienne (RGL) est la plus interne. Elle contient les cellules ganglionnaires de la rétine (RGC). Ces cellules relaient vers le cerveau l'information visuelle transmise depuis les photorécepteurs via les cellules bipolaires. Elles possèdent chacune un axone convergeant vers le nerf optique qui sort de la rétine pour transmettre l'information visuelle vers les zones primaires du traitement de l'information visuelle dans le cerveau. Ces zones sont principalement le colliculus supérieur et le LGN chez la souris ou le tectum optique chez le poulet.

Les neurones rétiniens s'interconnectent au niveau de deux couches plexiformes :

- La couche plexiforme externe (OPL) est le lieu de l'interconnexion entre photorécepteurs et cellules bipolaires via les synapses en ruban. Elle contient également les arborisations dendritiques et les axones des cellules horizontales, des interneurones qui assurent un premier filtrage de l'information visuelle. De manière intéressante, les bâtonnets possèdent leur propre circuit et sont connectés à un type spécifique de cellules bipolaires.

- La couche plexiforme interne (IPL), est le lieu de la connexion entre cellules bipolaires et cellules ganglionnaires. Cette couche peut être subdivisée en cinq *laminae*. Celles-ci sont le siège de connexions spécifiques entre les différents types de BC, AC et RGC, comme exposé plus loin.

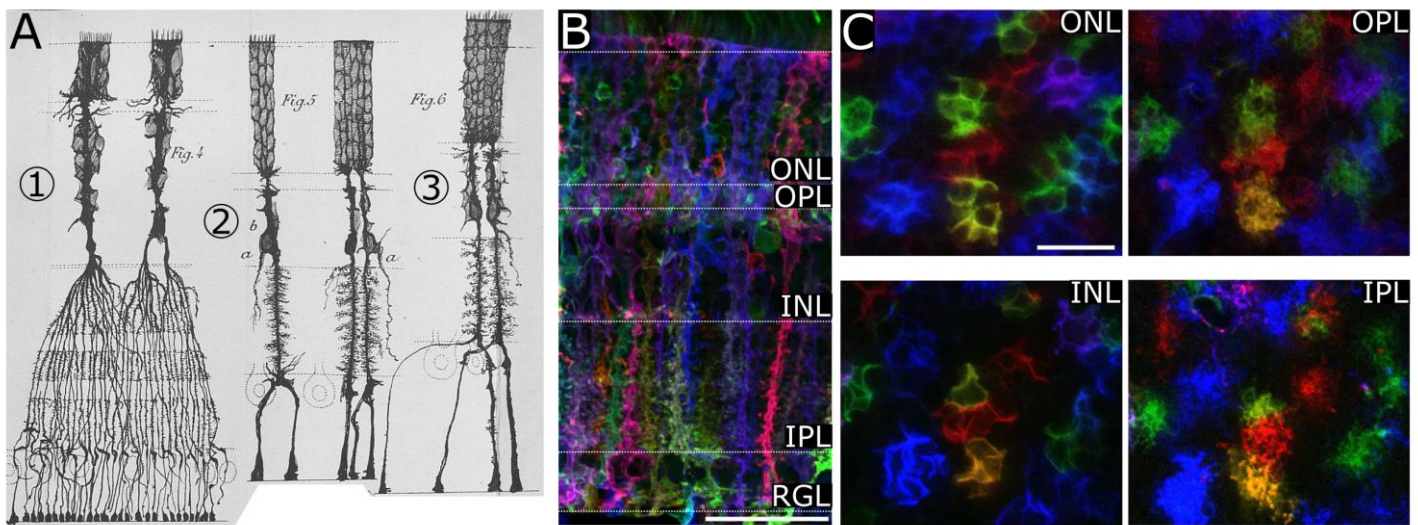


Figure 3 – Morphologie de la glie de Müller

A – Dessins issus de (Cajal 1893) de cellules de la glie de Müller visualisées avec la coloration de Golgi. Glie de Müller dans la rétine de poulet (1), de bœuf (2) et dans la rétine du bœuf à proximité du point de sortie du nerf optique. Les traits en pointillés délimitent, de haut en bas, l'ONL, l'OPL, l'INL, l'IPL et la RGL. B & C – Cellules de la glie de Müller dans une rétine de souris *GLAST-CreER* injectées avec des AAV Brainbow (figures issues de (Wang et al. 2017)). A – Vue radiale. B – Projection maximale en vue tangentielle dans quatre couches de la rétine. Noter les domaines exclusifs formés par les cellules marquées et voisines.

(Barres d'échelle : B - 40 μm ; C - 20 μm)

I.2.3) La glie de Müller

La glie de Müller (MG) joue dans la rétine un rôle similaire aux astrocytes dans le cerveau (**figure 3**). Elle est importante pour le maintien de la structure de la rétine et a un rôle de support pour le métabolisme des neurones rétinien (Vecino et al. 2016).

Chez certains vertébrés, mais pas naturellement chez les mammifères, les cellules gliales de Müller peuvent se différencier après une lésion pour acquérir une identité de progéniteur et participer à la régénération de la rétine (Centanin & Wittbrodt 2014). Chez la souris cependant, la différenciation de la MG peut être induite via *Ascl1* jusqu'à P16 pour générer des progéniteurs capables de régénérer différentes classes de cellules rétinien. L'inhibition de la déacétylase des histones permet même de garder l'effet activateur d'*Ascl1* au-delà de ce stade. Cette expérience nous indique que la capacité de régénération de la rétine serait toujours présente chez les mammifères et pourrait être réactivée avec un paysage chromatinien permissif (Jorstad et al. 2017).

Enfin, la glie de Müller aurait également un rôle dans la conduction des photons de la face interne à la face externe de la rétine neurale. Elle agirait comme une fibre optique dans la rétine des vertébrés, notamment chez le cochon d'inde (Franze et al. 2007).

La morphologie et la distribution de la MG ont été étudiées dans la rétine de souris, entre autres avec la stratégie de marquage Brainbow (Wang et al. 2017). Les cellules gliales de Müller forment des domaines avec un minimum de chevauchement et entourent les boutons synaptiques formés entre BC, RGC et AC dans l'IPL. Ces caractéristiques structurelles rappellent les astrocytes dans le cortex cérébral (Clavreul et al. 2019).

La glie de Müller est le seul type glial à être produit par les mêmes cellules progénitrices que les neurones rétinien. La rétine contient cependant d'autres types gliaux d'origine extérieure. On y trouve notamment des astrocytes et de la microglie qui envahissent la rétine à partir du nerf optique (Vecino et al. 2016). Il existerait également un autre type de glie encore mal défini qui ne serait ni des astrocytes ni de la MG qu'on retrouve dans l'INL du poulet et de certains mammifères (Fischer et al. 2010).

I.2.4) Méthodes d'identification des types de neurones rétinien

Dans ce manuscrit, la nomenclature de classes et types suggérée par H. Zeng et J. R. Sanes (Zeng & Sanes 2017) a été adoptée pour identifier les différentes catégories de neurones rétinien (voir encadré).

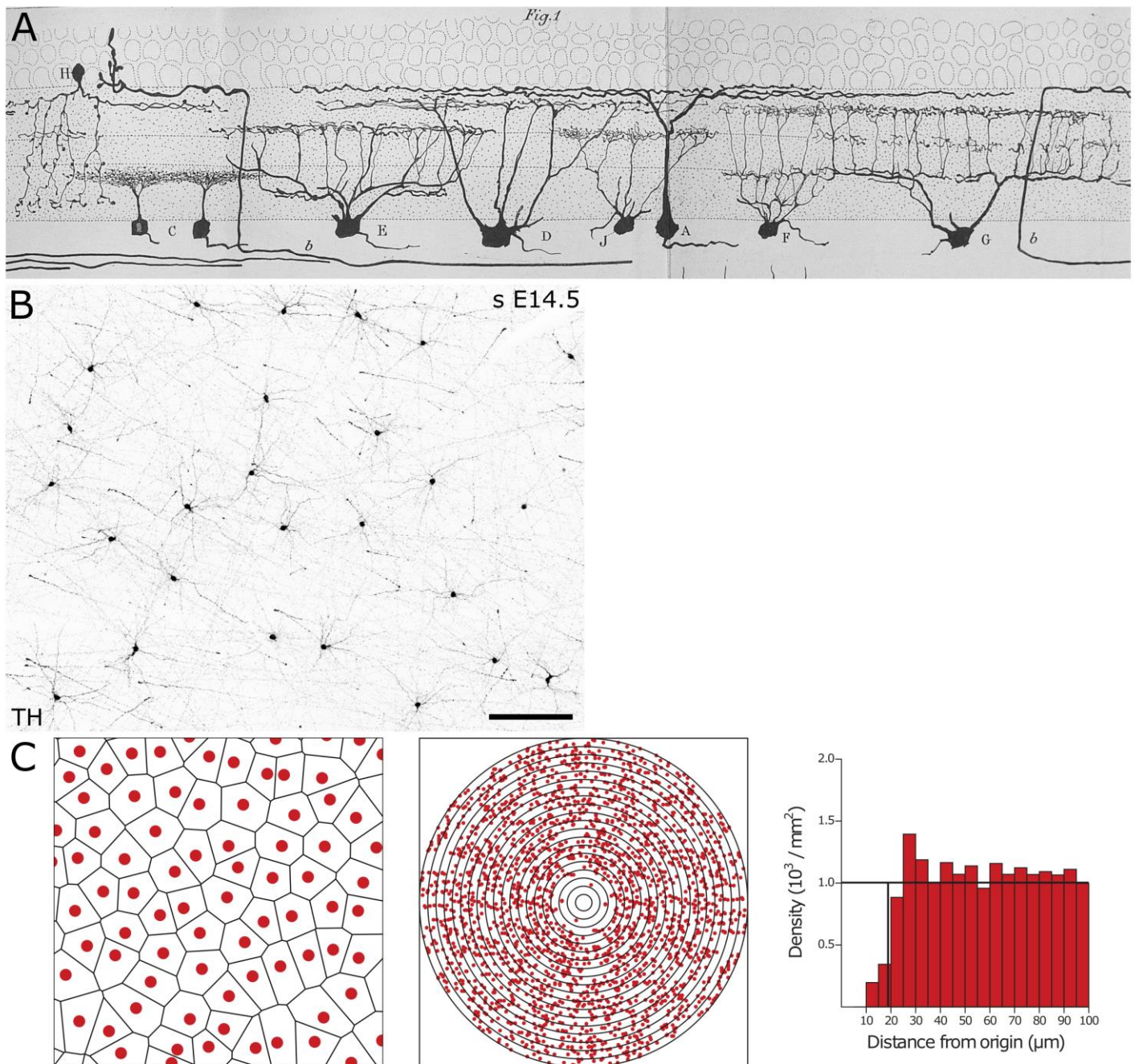


Figure 4 – Méthodes classiques d'identification des types de neurones rétiniens

A – Dessins issus de (Cajal 1893) de différents types de RGC marquées avec la technique de coloration de Golgi dans la rétine de poulet. La morphologie, la position et les niveaux de stratification des dendrites sont autant de paramètres pour définir différents types de RGC. On voit ici quelques exemples de la diversité de ces cellules chez le poulet (A, C, D, E, F, G). On peut noter également sur ce dessin la représentation des fibres nerveuses issues du noyau isthmo-optique qui projettent dans la rétine (b). B – Projection maximale en vue tangentielle des neurones dopaminergiques (AC) de la rétine de l'embryon de poulet à E14.5 révélés par immunohistochimie (IHC) avec un anticorps anti-TH. Les marqueurs immunologiques sont un moyen de révéler certains types neuronaux rétiniens. C – Outils d'analyse géométrique permettent de vérifier si un type spécifique forme une mosaïque régulière (figures issues de (Reese & Keeley 2014)). À gauche, les points rouges représentent la position en vue tangentielle des cellules horizontales dans la rétine de la souris adulte. La représentation est accompagnée d'une tessellation de Voronoï basée sur ces positions. Au centre, représentation de l'autocorrélation de Rodieck pour ces cellules. Dans cet outil, chaque cellule est utilisée tour à tour comme l'origine d'un graphe circulaire, puis les positions de toutes les autres cellules sont représentées avec cette nouvelle origine. Dans le cas de mosaïques, on voit apparaître une zone d'exclusion au centre du graphe, plus grande que le corps cellulaire. Le rayon de cette zone correspond à la distance minimale entre deux neurones rétiniens du même type. À droite, représentation du profil de récupération de la densité de Rodieck (DRP) pour les HC murines. Cet outil est basé sur l'autocorrélation, les cellules sont comptées dans des anneaux concentriques découpant le graphe (voir au centre). Le comptage dans chaque anneau est ensuite représenté sous forme d'histogramme. On peut ainsi déterminer que les HC de la souris ont une distance minimale de 20 μm environ. (Barre d'échelle : 150 μm)

L'identification des six classes de cellules rétiniennes est bien établie depuis la fin du XIX^{ème} siècle où Cajal et ses contemporains les ont baptisées (Cajal 1893). À la même époque, les auteurs étudiant la rétine des vertébrés avaient également relevé la grande diversité morphologique de différents types de neurones au sein de certaines classes (**figure 4 A**). On estime aujourd'hui le nombre de types de neurones rétiniens distincts à potentiellement une centaine et ce nombre a régulièrement augmenté dans les années passées (Masland 2012).

Les classes les moins diverses sont les HC et les PR. Les types neuronaux sont plus nombreux pour les autres classes : BC, RGC et AC, par ordre de diversité croissante. De plus, on retrouve les mêmes classes de cellules chez tous les vertébrés, tandis qu'il existe une certaine diversité de types entre espèces.

Il existe de nombreuses modalités pour définir un type neuronal : la morphologie, l'organisation spatiale, les déterminants moléculaires, la connectomique et la physiologie des cellules sont autant d'informations qui peuvent être combinées pour nous renseigner sur l'identité des neurones (**figure 4 & 5**).

La morphologie des cellules, tout d'abord, est un critère utilisé depuis la fin du XIX^{ème} siècle (**figure 4 A**) (Cajal 1893). La position du corps cellulaire, la position des dendrites dans les différentes *laminae* ainsi que la forme des arborisations dendritiques sont autant de caractéristiques sur lesquelles se base une première classification (Ehrlich 1981).

L'organisation des cellules d'un même type entre elles est également souvent stéréotypée dans la rétine. Les AC d'un même type forment par exemple des mosaïques régulières pouvant être analysées avec différents outils de géométrie (Eglen et al. 2003; Reese & Keeley 2014; Wässle et al. 2009). L'analyse des histogrammes de la distribution des distances entre voisin les plus proches met ainsi en évidence une distance minimale indiquant l'existence d'une zone d'exclusion entre les cellules d'un même type. Cette distance correspond au pas de la mosaïque formée. On peut aussi calculer l'indice de régularité (RI) qui quantifie le caractère régulier (mosaïque) ou stochastique de la répartition des cellules. Des calculs plus sophistiqués, comme l'autocorrélation et la DRP (Rodieck 1991) permettent de calculer avec précision la distance minimale entre les cellules d'un même type (**figure 4C**). Différents outils d'étude et de modélisation des mosaïques rétiniennes sont passés en revue par (Eglen 2012).

Des déterminants moléculaires ont également été mis en évidence comme marquant des types spécifiques. Ces marqueurs peuvent être révélés par immunohistochimie et hybridation *in situ* (**figure 4 B**) (Kishi et al. 2019; Siegert et al. 2012). Des lignées rapportrices de souris

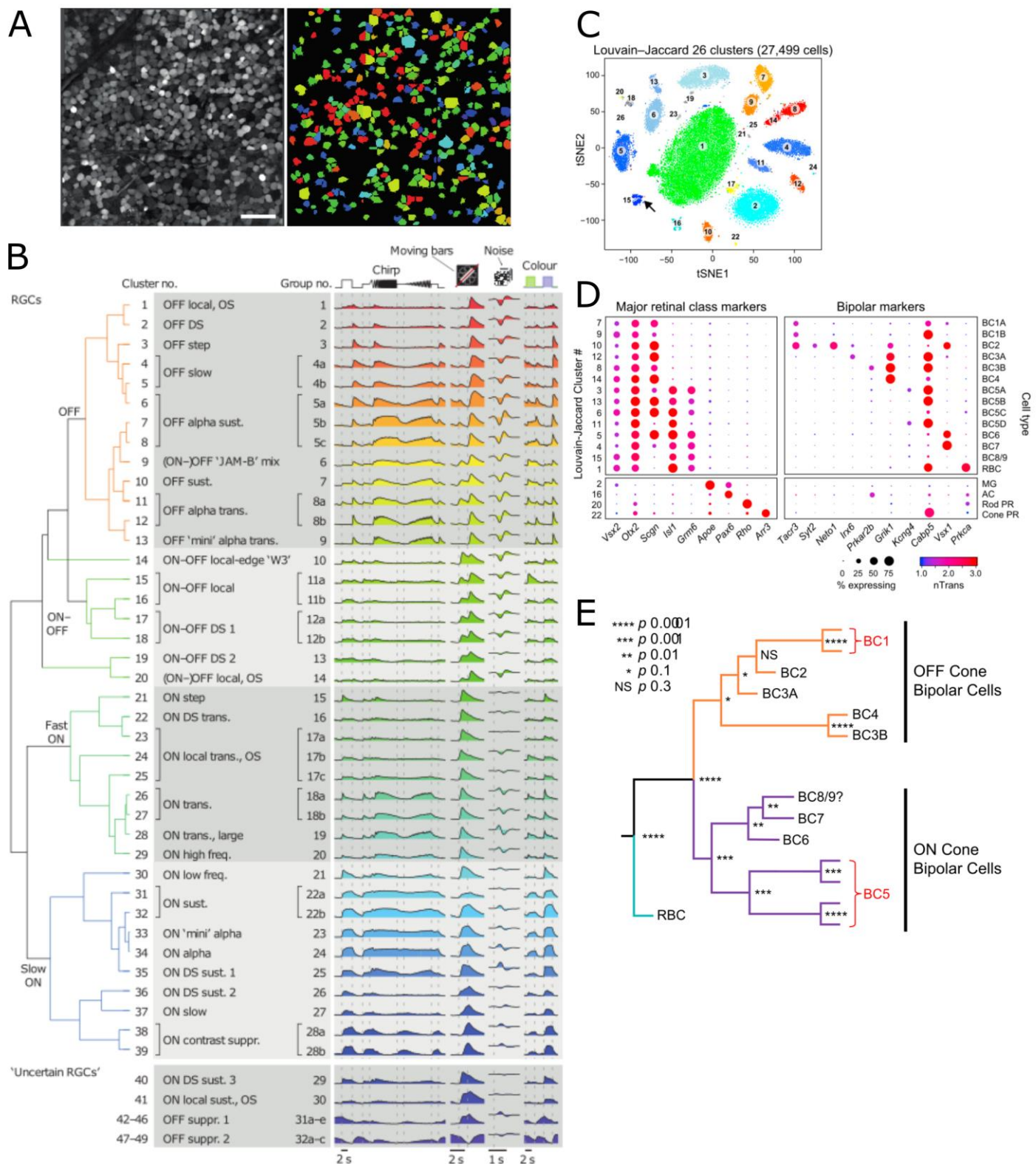


Figure 5 – Méthodes exhaustives d'identification des types de neurones réiniens

A & B – Identification des types de RGC de la souris par imagerie calcique (adapté de (Baden et al. 2016)). A – À gauche, cellules ganglionnaires électroporées avec un indicateur calcique chimique (l'Oregon Green BAPTA ou OGB). À droite, RGC en fausses couleurs représentant le type auxquelles elles appartiennent. B – Catégorisation des RGC enregistrées en fonction de leurs réponses à différents stimuli. La première ligne au-dessus du tableau schématise les stimuli utilisés. Les tracés représentent les réponses pour chaque type. Les couleurs indiquent les types appartenant à des groupes proches d'après la catégorisation hiérarchisée effectuée.

C, D & E – Identification de cellules réiniennes de la souris par transcriptomique (adapté de (Shekhar et al. 2016)). C – Graphe tSNE des clusters représentant différents types de cellules identifiées à partir de rétines dissociées de souris *Vsx2::GFP*. Les cellules GFP sont triées par FACS, on retrouve ainsi seulement des types cellulaires issus du lignage des RPC *Vsx2*⁺. D – Identification des différents types de cellules réiniennes catégorisées en fonction des gènes qu'elles expriment. Toutes les BC sont issues de RPC *Vsx2*⁺, on peut ainsi identifier les différents types constituant cette classe. E – Catégorisation hiérarchisée des différents types de BC identifiés. La p-value indique l'indice de confiance pour chaque point de branchement établi.

permettent également l'identification de types neuronaux supplémentaires inaccessibles avec l'immunohistochimie (Kim et al. 2008; Siegert et al. 2012).

Voici une liste non exhaustive d'exemples de déterminations réalisées avec ces différentes techniques :

- Le marqueur butyrylcholine révèle une sous-population d'AC spécifique chez le poulet. Ces cellules constituent un nouveau type par rapport aux AC cholinergiques déjà identifiées (Reiss et al. 1997).
- L'oxyde nitrique synthase (NOS) est un marqueur des sous-populations de neurones à acide nitrique appartenant à différentes classes (Kim et al. 2000).
- p57Kip2 est un marqueur spécifique d'un type d'AC chez la souris (Dyer & Cepko 2001).
- Une lignée de souris transgéniques basée sur JAM-B (une molécule d'adhésion cellulaire) permet de marquer un type spécifique de RGC, les OFF dsRGC (Kim et al. 2008).
- GNB3, une protéine G, est un marqueur spécifique des cônes et d'une sous-population de BC chez le poulet (Ritchey et al. 2010).

Pour aller plus loin et atteindre une plus grande exhaustivité dans l'analyse des types rétiniens, différents laboratoires ont combiné plusieurs des techniques mentionnées ci-dessus. Dans une première étude, les données issues de lignées transgéniques ont été croisées avec une analyse poussée de l'arborisation dendritique pour identifier de nombreux types de RGC (Sümbül et al. 2014). Dans une autre, quatre nouveaux types de RGC ont été documentés chez la souris en se basant sur le comarquage de FOXP2 avec BRN3b et BRN3c (Rousso et al. 2016). Toujours de façon similaire, d'autres types de RGC ont été définis en croisant les patrons d'expression d'Islet2, Tbr2, Satb1 et Satb2 chez la souris (Sweeney et al. 2017). Les types définis au sein de chaque classe avec ces techniques sont revues dans (Masland 2012; Sanes & Masland 2014; Wässle et al. 2009). Il est utile de rappeler que la rétine est une région du SNC. Ces études offrent ainsi également une référence intéressante pour la définition des types neuronaux du cortex cérébral, où leur caractérisation reste plus complexe (Seung & Sümbül 2014). En effet, le cortex comporte une diversité de types cellulaires potentiellement plus grande que la rétine, présente une taille plus importante et n'est pas organisé de façon aussi stéréotypée.

Depuis moins de dix ans, de nouvelles approches pouvant potentiellement être qualifiées d'exhaustives sont apparues (**figure 5**). Les approches transcriptomiques appliquées à des cellules uniques permettent notamment d'identifier sans connaissance a priori les différents types de neurones d'une classe (Peng et al. 2019; Rheaume et al. 2018; Shekhar et al. 2016). Dans ces études, on séquence les ARNm présents dans des cellules uniques issues de plusieurs rétines. Les cellules sont ensuite catégorisées grâce à des algorithmes de clusterisation pour rassembler les neurones partageant des patrons d'expression génique les plus proches (**figure 5 C à E**).

La connectomique constitue également un outil très puissant et potentiellement exhaustif. Dans ce genre d'étude, de petits volumes de rétine sont reconstruits grâce à la microscopie électronique en série. Les cellules sont ensuite segmentées en 3D. La forte résolution des images en 3D obtenues permet d'identifier toutes les synapses présentes dans le volume imagé. Les cellules peuvent ensuite être clusterisées en fonction de leurs caractéristiques morphologiques et de leur connectivité. Une étude basée sur cette approche a ainsi permis de retrouver tous les types connus de BC et même d'en définir un nouveau chez la souris (Helmstaedter et al. 2013).

La physiologie à l'aide de l'imagerie en temps réel, enfin, constitue également une méthode permettant de cataloguer de manière exhaustive les différents types rétiens (**figure 5 A & B**). Cette technique utilise par exemple des indicateurs calciques chimiques ou codés génétiquement pour enregistrer en parallèle les réponses individuelles d'un grand nombre de neurone rétiens. Les cellules sont ensuite catégorisées en fonction de leur réponse aux différents stimuli (Baden et al. 2016; Franke et al. 2017). C'est peut-être la méthode de typification la plus pertinente étant donné que le rôle des divers types de neurones rétiens réside avant tout dans le traitement de différentes modalités de l'information visuelle. Les différences entre types ont donc un rôle éminemment physiologique et il est très intéressant de constater que ces particularités sont reflétées dans le connectome et le transcriptome. Les méthodes actuelles utilisées pour cataloguer les types neuronaux, en mettant en avant leur fonction, premier paramètre de définition des types, sont revues dans (Vlasits et al. 2019).

Le croisement de ces données permet de créer des ensembles potentiellement exhaustifs de tous les types d'une classe. Des auteurs ont ainsi croisé les données physiologiques avec les données obtenues en microscopie électronique sériée pour créer une galerie des différents types de RGC chez la souris (Bae et al. 2018).

On peut voir qu'avec les approches les plus anciennes comme les plus récentes, deux paramètres sont importants pour cataloguer les types neuronaux de manière la plus exhaustive possible. D'une part, la puissance de l'approche repose sur le nombre de neurones étudiés : si la taille de l'échantillon est trop petite, les types les plus rares ne seront pas observés. D'autre part, la résolution de l'approche est également capitale : plus le nombre de paramètres est grand (niveaux d'expression de gènes, réponses à des stimuli etc.) plus les catégories obtenues après clusterisation seront précises. Si la résolution est trop faible, certains types seront mélangés à tort dans des catégories uniques. Ainsi, de nombreux marqueurs immunohistochimiques révèlent en fait des sous-populations de neurones constituées de quelques types et non des types uniques.

I.2.5) Organisation tangentielle des différents types de neurones rétiniens

Les photorécepteurs (PR)

Il existe deux grandes classes de photorécepteurs, les cônes et les bâtonnets. Ces deux classes peuvent être subdivisées en un certain nombre de types selon les espèces. Chez l'homme, par exemple, il existe un type de bâtonnet et trois types de cônes (S pour le bleu, M pour le vert et L pour le rouge). Chez le poulet, on retrouve un type de bâtonnet et six types de cônes : violet, bleu, vert, rouge, deux cônes doubles (Bowmaker & Knowles 1976; Jiao et al. 2014; Kram et al. 2010; Wai et al. 2006). Les cônes du poulet sont organisés selon six mosaïques régulières (Kram et al. 2010), elles-mêmes organisées entre elles selon un désordre hyperuniforme (Jiao et al. 2014). Les cellules photoréceptrices ne sont de plus pas réparties de façon homogène à la surface de la rétine des vertébrés (voir partie I.2.6)). Cette distribution asymétrique des PR est variable entre les espèces, en lien avec leur habitat et leur comportement, par exemple chez différentes espèce d'oiseaux marins et terrestres (Hart 2001).

Les cellules horizontales (HC)

Il existe un à trois types de cellules horizontales selon les espèces, définis par leur morphologie : ils présentent différents types d'arborisation dendritique, et certaines HC possèdent un axone tandis que d'autres non (Boije et al. 2016). Chez la souris, l'unique type d'HC forme une mosaïque régulière sur toute la surface de la rétine (Rockhill et al. 2000), tandis qu'il existe trois types d'HC chez le poulet (Boije et al. 2016; Rompani & Cepko 2008).

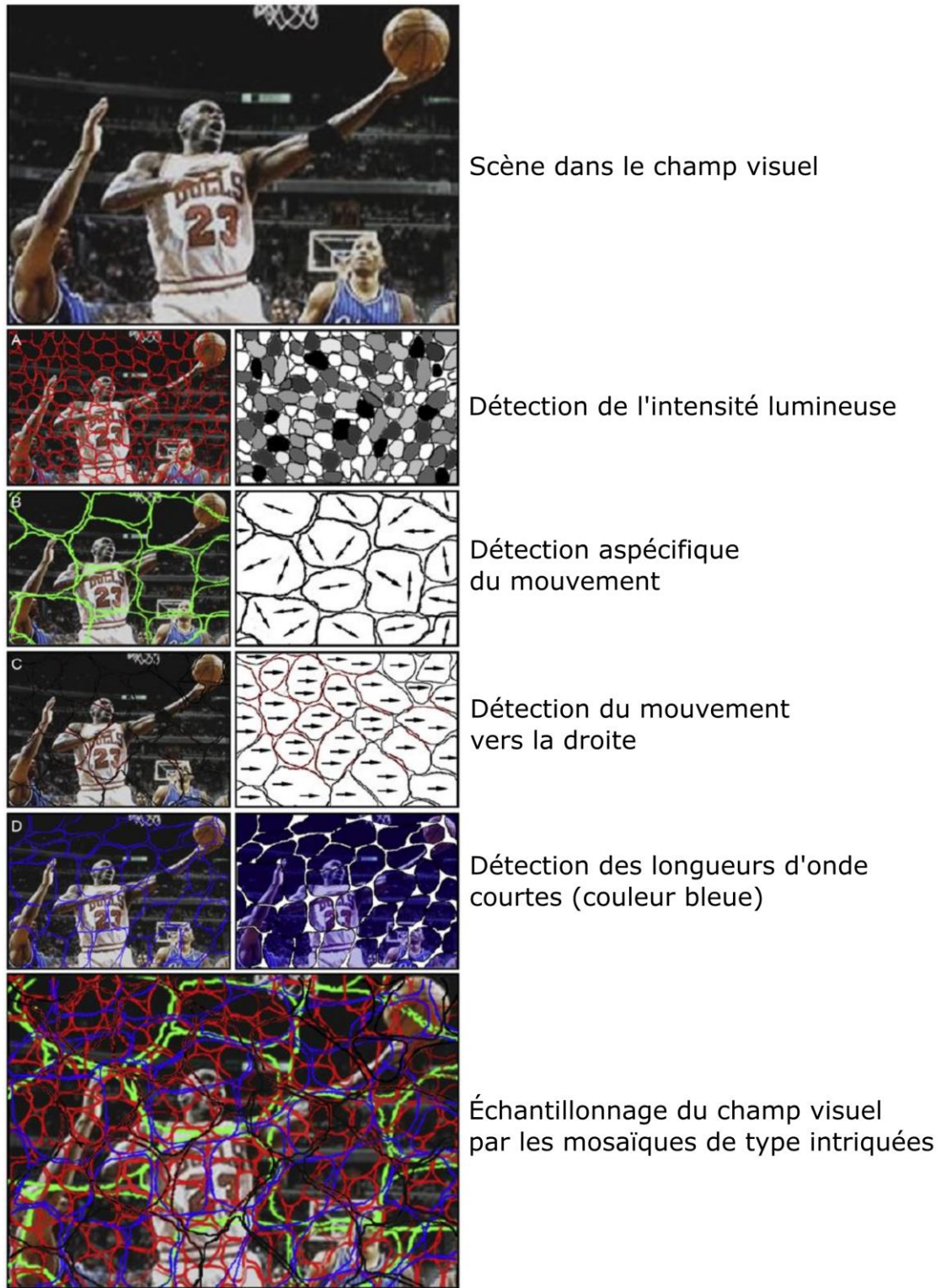


Figure 6 – Échantillonnage du champ visuel par la rétine

Les mosaïques intriquées des différents types de neurones rétiniens échantillonnent le champ visuel (figure adaptée de (Masland 2012)). Les schémas représentent différentes modalités de l'information visuelle extraites par différents types de RGC. L'image du haut donne un exemple de scène perçue. Les rangées 2 à 5 montrent l'extraction de quatre modalités de l'information visuelle. Noter la taille variable des champs réceptifs des RGC en fonction de l'information extraite. Différentes modalités requièrent différents niveaux de résolution pour échantillonner la scène de façon informative. L'image du bas montre comment la couverture homogène de la rétine par les mosaïques intriquées permet d'extraire ces modalités d'information visuelle de façon optimale sur toute la surface du tissu.

Les cellules bipolaires (BC)

Il existe au moins 13 types de cellules bipolaires différents identifiés chez la souris, passés en revue dans (Euler et al. 2014; Masland 2012). Cette identification a été confirmée par le croisement de données connectomiques, physiologiques et transcriptomiques qui portent le nombre de types de BC murines à 15 (Franke et al. 2017; Helmstaedter et al. 2013; Shekhar et al. 2016). Il est intéressant de noter que ces différents niveaux d'observation sont cohérents dans leur description des différents types.

Les cellules amacrines (AC)

La classe des AC est celle qui présente la plus grande diversité de neurones dans la rétine. Les dernières estimations placent le nombre de types d'AC entre 30 et plus de 60 (Masland 2012). Ce nombre est basé sur la morphologie des cellules, la position de leur corps cellulaire et de leur arborisation dendritique ainsi que leur identification par des approches immunohistochimiques et transgéniques. Il s'agit probablement encore d'une sous-estimation, à raffiner à l'aide d'outils physiologiques et transcriptomiques. Comme pour les RGC, la diversité de la morphologie des arborisations dendritiques des AC est liée à leur fonction. Les cellules amacrines sont organisées en mosaïques régulières, chevauchantes au niveau de leurs dendrites ou non selon les types. Les AC cholinergiques, par exemple, se chevauchent, tandis que les AC dopaminergiques présentent des domaines dendritiques quasiment exclusifs. Certaines cellules amacrines sont présentes de l'autre côté de l'IPL, dans la RGL. Elles sont nommées cellules amacrines déplacées (dAC).

Les cellules ganglionnaires rétiniennes (RGC)

Les différents types de RGC sont revus dans (Dhande et al. 2015; Sanes & Masland 2014). La classe des RGC serait la deuxième plus diverse après les AC. Plus de 30 types différents de cellules ganglionnaires ont été identifiés dans la rétine de souris sur la base de leurs réponses à différents stimuli (Baden et al. 2016). Plus récemment, une étude transcriptomique pousse même ce nombre à 40 chez la souris (Rheume et al. 2018). Les RGC sont également le seul type de neurones rétiniens à projeter en dehors de la rétine. La spécificité des cibles dans le cerveau peut ainsi être ajoutée comme paramètre de définition des différents types de RGC. Le nombre de types peut ainsi être porté à plus de 50 chez le poisson zèbre quand on croise les données physiologiques avec le patron de projection des RGC dans le cerveau (Kunst et al. 2019). Certaines cellules ganglionnaires sont présentes dans l'INL, au niveau des AC, elles sont nommées cellules ganglionnaires déplacées (dRGC). Cajal et ses contemporains les

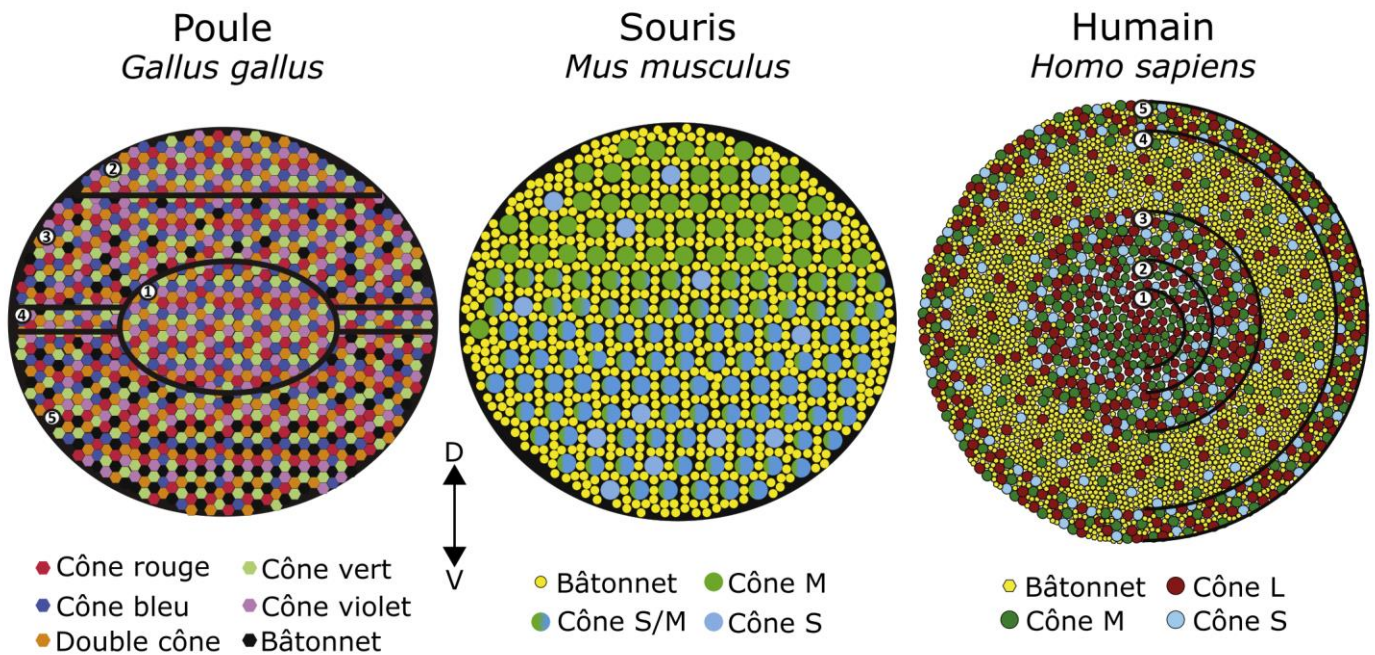


Figure 7 – Répartition hétérogène des photorécepteurs dans les rétines de trois vertébrés

Les différents types de photorécepteurs sont répartis de façon hétérogène à la surface de la rétine et de façon différente entre les espèces de vertébrés (figure adaptée de (Viets et al. 2016)). Chez le poulet (*Gallus gallus*) il existe une zone de forte acuité visuelle ou *area centralis* dépourvue de bâtonnets (1). Les bâtonnets sont également répartis selon un gradient dorso-ventral, d'une densité nulle (2) vers une densité forte (5). Chez la souris (*Mus musculus*), ce sont les cônes qui sont répartis selon un gradient dorso-ventral. La région dorsale est plus riche en cônes M tandis que la région ventrale est plus riche en cônes S. Chez l'homme (*Homo sapiens*), il existe également une zone de forte acuité visuelle, la fovéa (1 à 3). Cette région est dépourvue de bâtonnets au profit d'un enrichissement en cônes par rapport au reste de la rétine (zone 4 riche en bâtonnets). La périphérie de la rétine humaine est également enrichie en cônes (5).

avaient déjà observées chez différentes espèces (Cajal 1893). Des dRGC sont ainsi présentes chez le poulet. Elles ont été observées sur la base de leur morphologie et leur position en marquant des progéniteurs rétiniens dispersés avec des virus (Prada et al. 1992).

Échantillonnage du champ visuel par les neurones rétiniens

Les différents types de neurones rétiniens établissent souvent des mosaïques régulières. Ces mosaïques ont des pas plus ou moins grands en fonction des types (**figure 6**). Les neurones extrayant des informations nécessitant une forte résolution comme le contraste forment ainsi des mosaïques très denses couvrant avec précision le champ visuel. Les circuits nécessitant moins de résolution comme la discrimination des couleurs forment des mosaïques moins denses. Et les types extrayant des modalités moins résolues encore, tel que l'alternance du cycle circadien, possèdent les mosaïques les plus larges et les densités les plus faibles à la surface de la rétine. Les mosaïques des différents types de neurones rétiniens peuvent ainsi échantillonner le champ visuel avec une résolution optimisée pour la modalité de l'information visuelle extraite (**figure 6**).

On peut légitimement se demander si ces mosaïques présentent un niveau d'organisation supérieur dans leur agencement les unes par rapport aux autres. Cette question est d'un grand intérêt pour les types de neurones fonctionnellement connectés, dont on peut se demander s'ils pourraient être positionnés de manière corrélée. Dans le but d'apporter une réponse à cette question, Rockhill et al. ont étudié 8 paires de mosaïques choisies parmi 6 types. Il apparaît que les mosaïques étudiées ne sont pas corrélées, même entre types connectés, mais disposées aléatoirement les unes par rapport aux autres (Rockhill et al. 2000). Ces considérations sont importantes pour le développement. En effet, il semble plutôt simple de produire un grand nombre de mosaïques régulières si elles sont indépendantes les unes des autres. Au contraire, si certaines mosaïques sont corrélées ou anti-corrélées entre elles, il faut envisager des mécanismes supplémentaires pour mettre en place ces caractéristiques supplémentaires.

Néanmoins, de nouvelles données encore non publiées (G. Field, communication orale, 2018) suggèrent une organisation méta-mosaïque pour quatre types spécifiques de dsRGC. Ces dsRGC ont été identifiées en enregistrant simultanément les réponses d'un grand nombre de RGC à différents stimuli à l'aide d'une puce à microélectrodes (micro-electrodes array ou MEA) (Ravi et al. 2018).

I.2.6) Répartition hétérogène de certains types réiniens

L'organisation en couche des classes et en mosaïque des types de neurones réiniens permet théoriquement de définir des unités de surface réinienne capables de traiter localement toutes les modalités de l'information visuelle (**figure 6**). Bien que ce soit vrai pour la majorité des neurones réiniens, dans les faits, certaines zones de la rétine sont spécialisées, et certains neurones sont organisés suivant un gradient à la surface du tissu.

La fovéa, présente chez certains mammifères et oiseaux, est ainsi une zone de la rétine neurale de forte acuité visuelle (**figure 7**). Dans cette zone, les proportions des différentes classes et types de cellules réiniennes divergent de la périphérie. Chez le poulet, par exemple, il existe une pseudo-fovéa ou *area centralis* dans laquelle les bâtonnets sont absents au profit d'une concentration maximale des cônes (Viets et al. 2016). Chez certains oiseaux, on retrouve également de véritables fovéas, certains rapaces en possèdent même deux (Bringmann 2019). Une étude de transcriptomique a été conduite sur des cellules uniques extraites de la fovéa et de la périphérie des rétines de macaques. Elle démontre que, bien que la majorité des types cellulaires identifiés soient présents dans les deux zones, ils le sont avec des proportions différentes (Peng et al. 2019).

Certains types de neurones peuvent également présenter une répartition liée à la fonction et au comportement. Ainsi chez la souris, les PR S, responsables de la perception des longueurs d'onde courtes (bleu) sont présents sur la face ventrale de la rétine (**figure 7**). A l'opposé, les PR M, responsables de la perception des longueurs d'onde moyennes à longues (rouge-vert) sont présents sur la face dorsale de la rétine. Si on rappelle que le haut et le bas de l'image sont inversés à leur entrée dans l'œil, la souris verrait donc particulièrement bien le bleu au-dessus d'elle (vers le ciel) tandis qu'elle distinguerait mieux les nuances de rouge-vert au-dessous d'elle (vers le sol). Les souris pourraient ainsi voir se détacher une tache plus sombre sur le ciel correspondant potentiellement à un prédateur fondant sur elle (Viets et al. 2016). Un autre exemple de répartition anisotrope est rencontré chez le poulet, qui présente un gradient dorso-ventral de répartition des bâtonnets, par ailleurs absents de l'*area centralis* (Viets et al. 2016).

I.2.7) Transduction et traitement de l'information visuelle dans la rétine

De façon parfois insoupçonnée, la rétine est capable de réaliser un nombre important de transformations de l'information visuelle avant que celle-ci n'arrive dans le cerveau. La rétine

neurale est bien plus qu'une simple caméra transmettant des valeurs de pixels. Elle dissèque l'information visuelle en plusieurs modalités via les différents types spécifiques de neurones issus des six classes de cellules rétiniennes et leurs interconnexions.

Dans cette partie de l'introduction, on considérera le cas de la rétine des mammifères sensibles à deux longueurs d'onde (souris et lapin essentiellement), dont la physiologie est la mieux documentée. Les différents types de photorécepteurs (PR) offrent un premier niveau de découpage des modalités visuelles. Les cônes sont sensibles à différentes longueurs d'ondes tandis que les bâtonnets n'ont pas de préférence spectrale marquée, mais sont extrêmement sensibles et peuvent théoriquement être activé par la réception d'un seul photon. Il existe typiquement deux types de cônes : les S pour « short », nécessaires pour la vision des longueurs d'onde courtes correspondant au bleu ; les M pour « middle », percevant les longueurs d'onde moyennes correspondant au rouge et au vert. Les bâtonnets, eux, sont requis pour la vision nocturne et en faibles conditions de luminosité. La réponse des PR est plus ou moins intense en fonction du nombre de photons reçus. La phototransduction a pour effet d'hyperpolariser les cellules photoréceptrices. Quand elles sont stimulées par des photons, elles ne libèrent ainsi plus de glutamate au niveau de leur synapse dans l'OPL.

Les cellules bipolaires (BC) constituent le niveau suivant de transmission et de transformation de l'information visuelle (**figure 8**). Mis à part un type de BC connecté spécifiquement aux bâtonnets et un type de BC spécifique des cônes bleus, la majorité des BC forment des contacts synaptiques avec tous les cônes présents dans le rayon de leur arborisation dendritique dans l'OPL. Les réponses des cellules bipolaires peuvent être classées en fonction de deux paramètres : leur spécificité ON ou OFF et leur durée transitoire ou prolongée. Les cellules ON sont dépolarisées quand les PR qui les contactent reçoivent des photons. Les cellules OFF, elles, sont dépolarisées quand les PR qui les contactent cessent de recevoir des photons. Les caractéristiques (type et longueur) de la réponse induite dans les BC dépendent des canaux et récepteurs à protéine G qu'elles expriment (Euler et al. 2014; Masland 2012).

Avant de poursuivre la description de la transmission de l'information visuelle par les cellules bipolaires, il faut mentionner une autre classe de neurones rétiniens qui joue un rôle important au niveau de l'OPL : les cellules horizontales (HC). Ces cellules sont une des deux classes d'interneurones de la rétine et ont un rôle d'inhibition locale du circuit entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires. Quand un PR est fortement hyperpolarisé par un important afflux de photons, elles inhibent les cellules dans le champ de leur arborisation dendritique. Elles maintiennent ainsi les différentes régions de rétine dans un intervalle fonctionnel de réponse en permettant d'adapter localement la sensibilité à des objets très

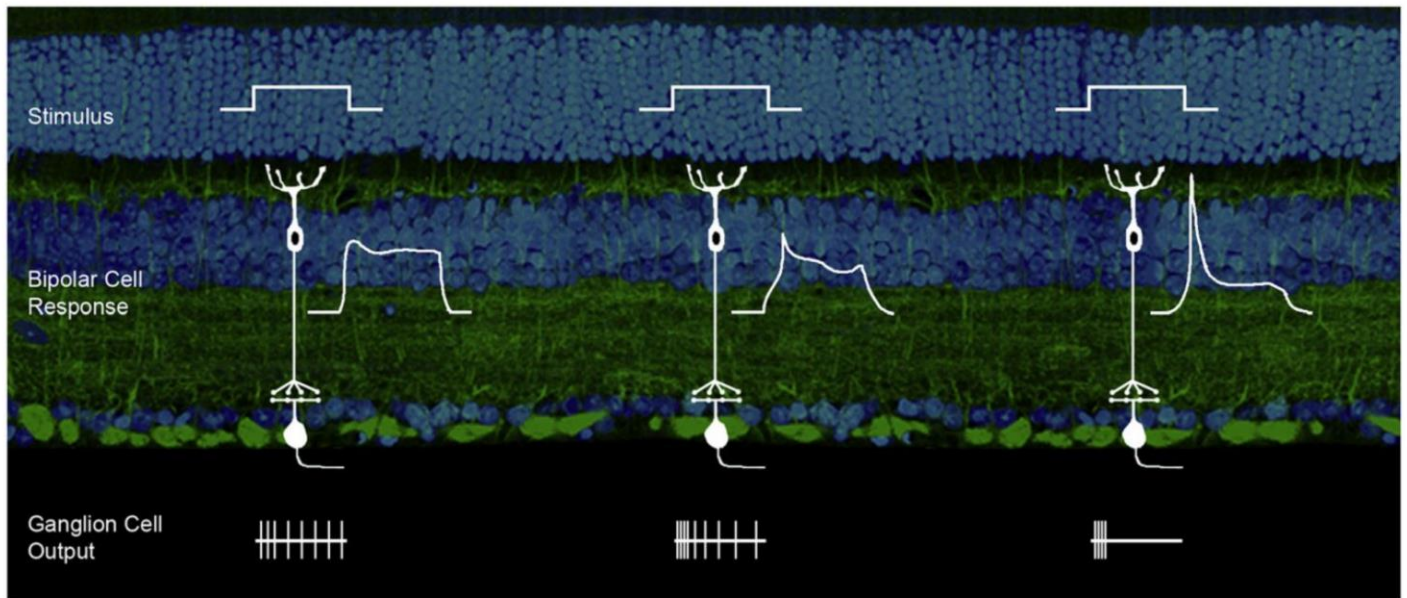


Figure 8 – Circuit physiologique des neurones excitateurs de la rétine

Présentation de la transformation du signal des photorécepteurs aux cellules ganglionnaires en passant par trois types distincts de cellules bipolaires (Masland 2012). Pour un stimulus de même longueur et de même intensité, les photorécepteurs d'un même type sont hyperpolarisés de la même façon (première rangée de tracés). Les BC vont présenter différentes réponses en fonction de leur type (deuxième ligne de tracés). Ces réponses peuvent être ON ou OFF et prolongée (BC de gauche) ou transitoire (BC de droite). Les RGC connectées aux différents types de BC vont ainsi envoyer différentes réponses au cerveau à travers le nerf optique (dernière ligne de tracés).

brillants par rapport au reste du champ visuel. On peut ainsi voir avec précision les différents éléments d'une scène sans être ébloui, même s'ils produisent des niveaux variables de luminosité, contrairement à une caméra numérique standard qui ajuste au même niveau de sensibilité l'ensemble de son capteur (Masland 2012).

L'IPL est organisée en cinq sous-couches nommées *laminae*, numérotées de l'extérieur vers l'intérieur. Les deux *laminae* les plus externes sont le lieu des connexions entre neurones OFF tandis que les trois *laminae* les plus internes sont celui des neurones ON. L'arborisation dendritique des différents types de BC projette ainsi spécifiquement dans l'une de ces *laminae* en fonction de la nature du neurone. Les bâtonnets possèdent leur propre circuit jusque dans l'IPL où le signal des cellules bipolaires qui leurs sont spécifiquement connectées (RBC) est réinjecté dans le circuit général. La protéine ELFN1 est requise pour la connexion spécifique entre bâtonnets et RBC. L'inactivation de ce gène chez la souris abolit la transmission primaire d'information des bâtonnets, ce qui résulte en une perte de la vision en faible luminosité (Cao et al. 2015).

Les cellules ganglionnaires (RGC) se connectent aux BC dans l'IPL. Elles constituent le dernier relai de l'information visuelle dans la rétine, dont elles assurent la transmission au cerveau. Comme pour les BC, on peut classer les réponses des RGC selon les paramètres ON ou OFF et transitoire ou prolongé. Il existe néanmoins une plus grande diversité de cellules ganglionnaires que de BC. Les RGC peuvent notamment être ON, OFF ou les deux. Dans ce dernier cas, leur arborisation dendritique est bi- ou multi-stratifiée dans plusieurs *laminae* de l'IPL. Les différents types de RGC déterminent les différentes modalités de l'information transmise au cerveau : niveau de luminosité, couleur, sens du mouvement, contraste, etc. Ces différentes modalités sont extraites grâce aux propriétés intrinsèques des RGC ainsi qu'à leurs connexions spécifiques dans l'IPL avec différents types de BC et AC (Masland 2012; Sanes & Masland 2014). Il existe également au moins un type de RGC intrinsèquement photosensibles qui expriment la mélanopsine : les ipRGC. Des expériences réalisées chez le poulet en enregistrant les réponses des RGC sur un MEA en ayant préalablement bloqué l'activité des PR permettent d'enregistrer uniquement ces RGC. Les résultats suggèrent qu'il pourrait exister plusieurs types d'ipRGC chez le poulet (Neumann et al. 2008). Les ipRGC sont importantes pour la régulation du cycle circadien.

Dans l'IPL, une troisième classe de neurones réalise des connexions synaptiques avec les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires. Il s'agit des cellules amacrines (AC), le second type d'interneurones rétinien. Les AC sont plus diverses en types et ont plus de rôles physiologiques que les HC. Leurs rôles ne sont d'ailleurs pas encore tous identifiés, les types

d'AC n'ayant pas encore pu être catalogués exhaustivement. On peut leur prêter au moins trois propriétés partagées par de nombreux types. Tout d'abord, de nombreuses AC participent à l'intégration latérale de l'information visuelle dans l'IPL, de manière similaire aux BC et aux HC avec les cônes dans l'OPL. C'est par exemple grâce à un type d'AC qu'un objet en mouvement sur un fond également mouvant peut être détecté (Masland 2012). Il a aussi été montré que la signalisation GABAergique des AC améliore la corrélation locale entre RGC voisines dans la rétine de poulet (Liu et al. 2007). De nombreuses AC réalisent également une forme d'intégration verticale. C'est par exemple le cas des cellules amacrine AII qui reconnectent le circuit des bâtonnets sur le circuit général de la rétine. Il existe également des AC capables d'"inverser" la polarité d'une réponse ON ou OFF avant de la transmettre à des types spécifiques de RGC. Enfin, la majorité des AC jouent un rôle dans la spécificité de réponse d'un ou quelques types de RGC (Euler et al. 2014; Masland 2012). Le grand nombre de types d'AC et la diversité de leurs réponses expliquent la difficulté de toutes les décrire. Les différents types d'AC possèdent aussi des propriétés différentes d'une espèce à une autre. Les AC de type *Starburst* (SAC) de la souris, par exemple, possèdent une connectivité légèrement différente de celle du lapin. Cette différence permettrait la détection d'objets mouvant avec une vitesse angulaire similaire en adaptant la détection de la vitesse à la taille de l'œil (Ding et al. 2016).

Les différents types de neurones réiniens sont connectés ensemble pour traiter une modalité spécifique de l'information. Le travail de (Rosa et al. 2016) expose ainsi les connexions spécifiques entre les voies des différents cônes et des bâtonnets chez la souris pour le circuit responsable de la détection du mouvement.

Les propriétés des différents types de neurones et les différentes modalités d'information visuelle qu'ils isolent sont également conservées au-delà de la rétine. Les projections des dsRGC présentant une direction préférentielle de stimulus similaire convergent ainsi vers les mêmes neurones du colliculus supérieur de la souris, ce qui confirme que la spécificité de la direction est codée en amont dans la rétine (Shi et al. 2017).

Signalons enfin quelques particularités de la perception et du traitement de l'information visuelle chez les oiseaux. Les oiseaux diurnes, dont le poulet, ont une rétine majoritairement composée de cônes, contrairement aux rongeurs et aux primates dont la rétine comprend surtout des bâtonnets. De plus, ils peuvent percevoir quatre couleurs primaires et possèdent en conséquence des types de cônes supplémentaires par rapport aux autres vertébrés. Ils

possèdent des cônes simples responsables de la vision des différentes couleurs ainsi que des cônes doubles dont le rôle est moins bien défini. Ces derniers pourraient être utiles pour la détection du mouvement. Certains auteurs proposent également que les oiseaux migrateurs pourraient directement percevoir les champs magnétiques grâce à un type particulier de cellules photoréceptrices. Chez le poulet, en plus de RGC spécifiques de la couleur, le nombre plus élevé de couleurs perçues serait également codé par la spécificité temporelle de la réponse de certaines cellules ganglionnaires (Zhou et al. 2005). Plus d'un tiers des RGC du poulet produisent des doubles pics en réponse à un flash lumineux, de façon inédite par rapport aux mammifères (Zhou et al. 2007). Ces exemples démontrent que la rétine du poulet, bien que partageant une organisation commune avec celle des autres vertébrés, a également des propriétés qui lui sont propres.

II] Développement du système visuel

Comme démontré dans la première partie de l'introduction, la rétine possède une organisation complexe et hiérarchisée. Nous allons maintenant nous intéresser à son développement. Nous commencerons par un aperçu de la mise en place du système visuel chez les invertébrés et les vertébrés. Le développement de la rétine neurale des vertébrés sera ensuite présenté plus en détail. En particulier, les modèles ainsi que les débats encore ouverts sur la spécification des différentes classes et types de cellules rétinienne, qui sont le sujet de ce travail de thèse, seront résumés.

II.1) Développement du système visuel d'un invertébré : *D. melanogaster*

Dans un premier temps, on décrira le développement du système visuel d'un invertébré : celui de *Drosophila melanogaster*, la drosophile du vinaigre. Il offre à la fois une référence et un éclairage intéressants pour l'étude du développement du système visuel chez les vertébrés (Perry et al. 2017).

L'œil de la drosophile est un œil composé constitué par la répétition d'une structure stéréotypée : l'ommatidie. *D. melanogaster* possède ainsi environ 800 ommatidies qui constituent ses deux rétines (région rouge, **figure 9 A**). Chaque ommatidie est constituée de 8 photorécepteurs, chacun d'un type différent (R1 à R8) et de cellules accessoires. Par rapport à la rétine des vertébrés, celle des invertébrés est ainsi beaucoup plus analogue à un capteur de caméra dont chaque pixel correspondrait à une ommatidie. Les photorécepteurs transmettent ensuite l'information visuelle vers des structures spécialisées pour son traitement : la lamina, la medulla et les lobules optiques (lobula et plaque de la lobula). Les photorécepteurs R1 à R6 projettent dans la lamina et sont liés à la détection du mouvement. Les photorécepteurs R7 et R8 projettent dans la medulla et ont un rôle dans la détection des couleurs. Chaque ommatidie projette dans une unité spécifique de la lamina qui lui est associée, contenant cinq neurones de types fixes (L1 à L5). La lamina contient également sept autres types de neurones aux fonctions complémentaires et d'origine développementale différente. La medulla constitue la partie la plus complexe du système visuel de la drosophile (**figure 9 A**), elle contient plus de 40000 neurones appartenant à plus de 70 types différents (Takemura 2015). Cette structure est impliquée dans l'extraction de différentes modalités de l'information visuelle, de façon similaire aux neurones de l'INL et la RGL chez les vertébrés. Les lobules optiques sont quant à eux impliqués dans le traitement de la détection du mouvement en intégrant les informations transmises par les structures précédentes.

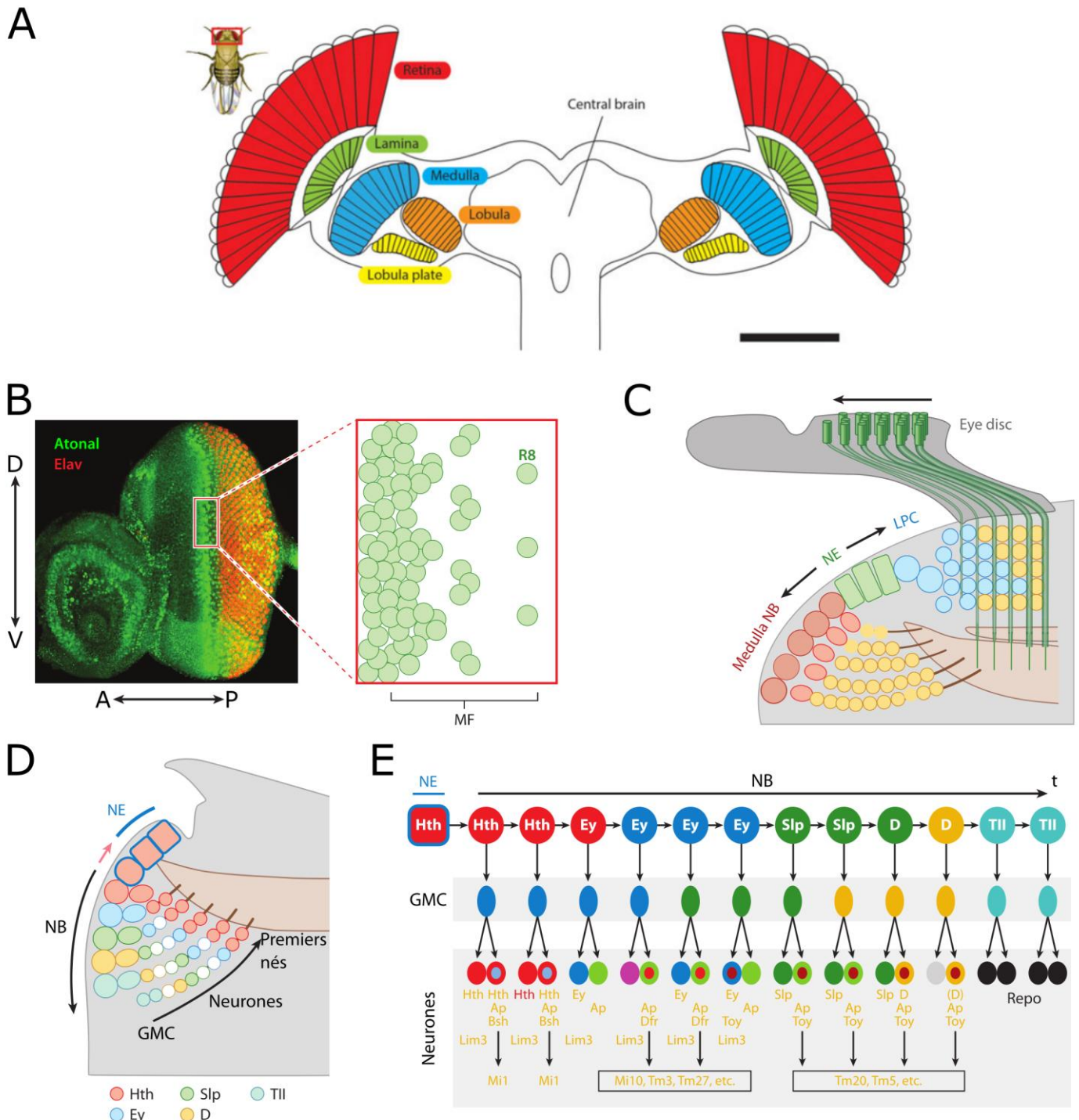


Figure 9 – Développement du système visuel de la drosophile

A – Schéma du système visuel de *D. melanogaster* (figure adaptée de (Takemura 2015)). La rétine est composée d'ommatidies dont les différents types de récepteurs sont connectés à la lamina ou à la médulla. Des connections spécifiques sont établies entre ces aires, la lobula et la plaque de la lobula et permettent d'extraire certaines modalités de l'information visuelle telle que la détection du mouvement. B, C, D & E – Présentation de différents aspects du développement du système visuel chez la drosophile (figure adaptée de (Perry et al. 2017)). B – Les photorécepteurs R8 sont les premières cellules constituant les ommatidies à se différencier selon un gradient antéro-postérieur. L'inhibition latérale de contact permet de les espacer régulièrement. Les photorécepteurs R8 induisent ensuite la formation des autres types cellulaires constituant chaque ommatidie. C – Les axones des photorécepteurs fraîchement nés issus de la rétine induisent la formation de cellules progénitrices de la lamina (LPC) à partir du neuroépithélium (NE) qui produit également les neurones de la médulla. Les photorécepteurs induisent également la différenciation des LPC pour générer les différents types de neurones de la lamina. D – Le développement de la médulla présente des parallèles intéressants avec le développement de la rétine des vertébrés. Les cellules neuroépithéliales (NE) produisent des neuroblastes (NB) qui vont eux même générer des cellules mères ganglionnaires (GMC), lesquelles réalisent une division terminale pour générer deux neurones selon une séquence déterminée. Les patrons de divisions suivent à la fois un gradient temporel et spatial. E – Schéma présentant la séquence de génération des neurones de la médulla pour laquelle le nombre précis de divisions des NB et des GMC, les types de neurones générés et les facteurs impliqués sont bien documentés. (Barre d'échelle : 100 μ m)

Les photorécepteurs et les cellules accessoires de l'ommatidie se développent selon une séquence déterminée. Une vague de différenciation progresse dans le disque imaginal de l'œil de la larve (**figure 9 B**). Les photorécepteurs R8 sont spécifiés en premier grâce aux voies Hh (Hedgehog), Dpp (Decapentaplegic) et EGF (Epidermal Growth Factor). La spécification des neurones R8 repose également sur l'inhibition latérale par la voie Notch/Delta (Perry et al. 2017). Les récepteurs R8 induisent ensuite la formation des autres photorécepteurs dans un ordre spécifique : 2/5, 3/4, 1/6 puis 7. Les cellules accessoires sont spécifiées à leur tour par les photorécepteurs.

Les neurones primaires de la lamina, nommées cellules monopolaires laminaires (LMC), sont générés à partir du centre de prolifération externe (OPC) (**figure 9 C**). Le développement de la lamina a lieu en parallèle de celui de la rétine. Alors que les axones des premiers photorécepteurs générés arrivent dans la future lamina, ils induisent la division des progéniteurs de la lamina (LPC) issus de l'OPC. Ils spécifient également la différenciation des différents types de LMC (L1 à L5) (Perry et al. 2017).

Les zones dont le développement sont les plus pertinents à comparer avec les vertébrés sont la medulla et les lobules optiques. Ces zones se développent aussi à partir de l'OPC, un neuroépithélium. Les cellules neuroépithéliales se divisent pour donner des neuroblastes (NB), progéniteurs qui vont indirectement générer tout au long du développement du système visuel les différents types de neurones de la medulla et des lobules optiques (**figure 9 D**). Pour ce faire, les neuroblastes réalisent des divisions asymétriques pour générer un NB et une cellule mère ganglionnaire (GMC). Ces GMC réalisent ensuite à leur tour une division terminale symétrique pour générer deux neurones de types déterminés. Le type des neurones générés est défini par des facteurs de transcription exprimés dans les NB et les GMC. La séquence d'expression des facteurs de transcription et les types neuronaux générés sont bien documentés chez la drosophile (**figure 9 E**) (Perry et al. 2017).

T4 et T5 sont par exemple deux types de neurones de la plaque de la lobula générés selon un mécanisme basé sur la signalisation Notch. Les neuroblastes *ato*⁺ génèrent deux GMC qui vont chacune générer un neurone T4 et un neurone T5. Le gène atonal (*ato*) de la drosophile possède des homologues chez les vertébrés : ces gènes sont nommés *Atoh* suivi d'un numéro (pour atonal homologue). Le type de neurones T4 ou T5 généré est également régulé par inhibition latérale avec la voie Notch/Delta (Pinto-Teixeira et al. 2018).

Les mécanismes d'interaction entre molécules de contact ont aussi des similitudes entre vertébrés et invertébrés. Chez la drosophile, la famille de récepteurs DIP - Dpr est, par

exemple, impliquée dans l'établissement des connexions entre types de neurones spécifiques dans le système visuel (Aksu & Seiradake 2018). Les homodimères DIP/DIP ont été caractérisés au niveau moléculaire (Cosmanescu et al. 2018). Les interactions homophiliques DIP-DIP et hétérophiliques DIP-Dpr permettent la connexion spécifique entre les neurones L3 de la lamina et les neurones Dm4 de la medulla. Cette connexion a lieu dans une couche spécifique de la medulla et la famille DIP-Dpr est également importante pour la stratification correcte des neurones dans cette structure (Xu et al. 2018).

II.2) Aperçu général du développement du système visuel des vertébrés

II.2.1) Morphogenèse de l'œil

Les aspects précoces du développement de l'œil ont été revus en détail par (Adler & Canto-Soler 2007; Chow & Lang 2001; Fuhrmann 2010; Lachke & Maas 2010; Mey & Thanos 2000; Zhang et al. 2002). Les grandes lignes sont données ici pour comprendre quels sont les premiers facteurs de transcription exprimés et comment l'œil prend sa forme pseudo-sphérique à partir de la paroi du tube neural (**figure 10**).

Le territoire présomptif de la rétine (PRE) est spécifié dans la plaque neurale en fin de gastrulation par un cocktail de facteurs de transcriptions. L'expression de *Six3*, *Foxg1*, *Otx2*, *Rx*, *Pax6*, *Sox2*, *Hes1* et *Lhx2* est primordiale pour la spécification du PRE. Ce territoire en position antérieure ventrale de la plaque neurale, d'abord unique, se sépare ensuite en deux sous l'action du morphogène *Sonic Hedgehog* (*Shh*) produit par le tissu pré-chordal au niveau de la ligne médiane. Une fois le tube neural refermé, une première phase de remaniement mécanique d'évagination du PRE conduit à la formation de la vésicule optique (**figure 10**). La mise en contact de la vésicule optique avec l'ectoderme va induire ce dernier, qui devient la placode du cristallin. Cette placode s'épaissit. La vésicule optique subit ensuite une deuxième phase de remaniement mécanique : elle s'invagine et se replie sur elle-même, formant la cupule optique (**figure 10**). La partie externe du neuroépithélium va donner le RPE, tandis que la partie interne va donner la rétine neurale. Le cristallin en développement est entraîné par cette invagination. L'ectoderme autour de la cupule optique se referme alors par-dessus. Cet ectoderme, au contact du cristallin en développement, est spécifié à donner la cornée. La cupule optique ainsi formée continue à croître pour former l'œil. Les parties suivantes détailleront le développement de la rétine neurale. Les autres tissus de l'œil tels que la choroïde ou la sclère sont formés par de l'ectoderme avec une contribution des cellules du

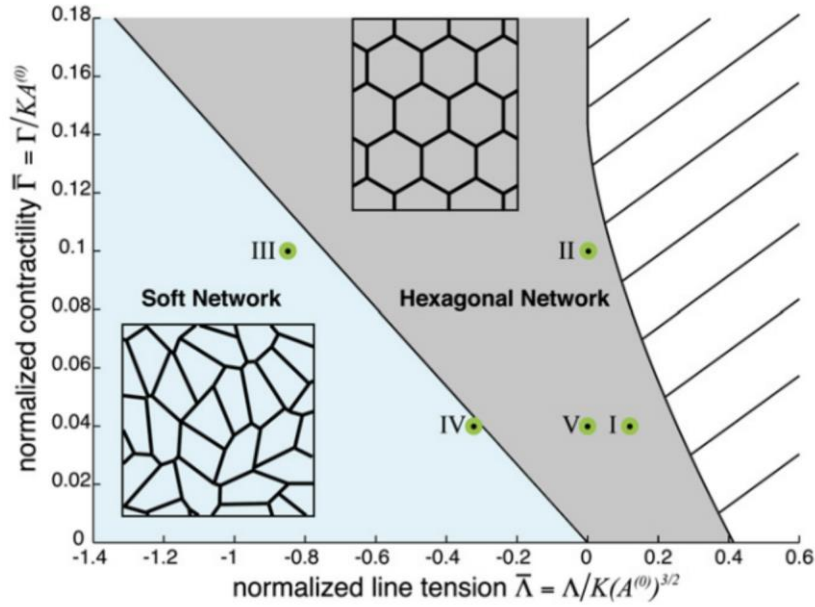


Figure 11 – Modélisation des propriétés mécaniques des épithelia

Diagramme du modèle de vertex issu de (Farhadifar et al. 2007). Les auteurs ont défini une fonction d'énergie $E(R_i)$ caractérisant le réseau formé par des cellules en fonction de trois paramètres (voir box 1 de l'article pour plus de détails). 1 – L'élasticité de l'aire des cellules, par exemple au niveau apical. 2 – La tension en ligne au niveau des jonctions cellulaires entre les cellules. Ce paramètre diminue quand les jonctions serrées sont plus fortes ou quand la contractilité des cellules diminue (donc quand les cellules tendent à moins se déplacer dans le tissu). 3 – La capacité contractile du périmètre de la cellule, qui représente les caractéristiques mécaniques des cellules individuelles (liées par exemple au réseau d'acto-myosine cortical). Le diagramme présente les différentes valeurs possibles pour $E(R_i)$ en normalisant les paramètres 2 et 3 par l'aire pour pouvoir représenter le graphe en deux dimensions. On voit trois zones possibles correspondant à trois états possibles du réseau en fonction de la valeur de $E(R_i)$. La zone bleue correspond à des réseaux fluides, dans lesquels des dispersions sont possibles et où la forme des cellules à la surface apicale est peu contrainte. La zone grise correspond à des réseaux hexagonaux, cristallins, dans lesquels les dispersions de cellules sont difficiles et où leur forme à la surface apicale est fortement contrainte. La zone hachurée présente des valeurs pour lesquelles le modèle échoue à représenter les cellules par des vertex.

mésenchyme. Les crêtes neurales ont également un rôle majeur dans la formation des structures oculaires et péri-oculaires (Creuzet et al. 2005).

II.2.2) Forces mécaniques

Comme décrit dans la partie précédente, le tube neural subit d'intenses transformations mécaniques pour former la base du futur œil. Le contrôle mécanique est primordial pour obtenir une forme correcte. Si l'œil n'est pas correctement formé et refermé, cela aboutit à des défauts de vision, voire une cécité, même si la rétine est fonctionnelle au niveau cellulaire.

D'autres tissus tels que la moelle épinière subissent des transformations bien moins importantes. La moelle épinière correspond, en simplifiant, à une expansion du tube neural. La forme générale du tissu initial, un tube, est ainsi conservée, et les différents types de neurones spinaux y sont disposés dans des domaines spécifiques. A l'inverse, dans la rétine, les types neuronaux forment des mosaïques couvrant de manière homogène le tissu rétinien. Bien que le lien entre organisation des types et développement mécanique du tissu soit encore peu étudié, il semble pertinent pour comprendre les différences de développement entre zones du SNC à partir d'un neuroépithélium très similaire.

Un modèle basé sur des vertex en deux dimensions permet de modéliser le développement des épithélia (Farhadifar et al. 2007). Ce modèle prend en compte trois paramètres : la tendance d'une cellule à maintenir son aire constante à la surface apicale, la tension entre les cellules et la tension contractile interne de la cellule (**figure 11**). Il existe alors deux comportements possibles : un réseau hexagonal rigide ou un réseau fluide. Cette classification rappelle les concepts de comportement de la matière *glassy* (comme les cristaux) ou *jamming* (comme la fumée) utilisés en biophysique. Les jonctions cellulaires et le réseau associé d'actine/myosine sont à la base du comportement des cellules arrangées en épithélium (Guillot & Lecuit 2013). Selon les tissus, les variations dans ces réseaux conduisent à différents patrons de division et de déformation mécanique. Par exemple, durant la gastrulation du poulet, les divisions sont un moteur du réarrangement cellulaire grâce à une faible concentration en actine corticale qui rend possible les réarrangements des jonctions entre cellules voisines (Firmino et al. 2016). Dans ce cas, on est plus proche d'un réseau mou. Dans le développement de l'œil, différentes théories coexistent pour expliquer la formation mécanique de la cupule optique (Hosseini & Taber 2018). Plusieurs de ces théories pourraient être valides, décrivant autant de mécanismes redondants assurant l'homéostasie du développement oculaire. Les caractéristiques de la matrice extracellulaire ainsi que la contraction corticale dans les cellules neuroépithéliales en

Définitions – Cellules souches, progéniteurs et précurseurs

Une cellule souche est une cellule totipotente ou pluripotente capable de générer tous les types cellulaires d'un tissu voire du corps entier. Le nombre de division des cellules souches est virtuellement infini. On en retrouve dans certains tissus adultes où elles sont dans un état de quiescence et peuvent participer à la régénération du tissu.

Les progéniteurs sont des cellules pluripotentes présentes au cours du développement. Ils sont capables de générer toutes les cellules d'un tissu, mais leur nombre de division est fini. Ils effectuent une dernière division symétrique terminale donnant deux cellules post-mitotiques et ne sont plus présents dans le tissu mature.

Les précurseurs sont des cellules post-mitotiques qui vont se différencier pour donner un type cellulaire mature, par exemple un photorécepteur d'un type donné.

division permettraient d'expliquer l'invagination à l'origine de la formation de la cupule optique (Hosseini & Taber 2018). Le taux de différenciation neuronale est également susceptible d'affecter les paramètres mécaniques au cours du développement précoce du tube neural. Il existe un lien entre les remaniements mécaniques, la croissance du tissu et la formation de patrons dans l'espace par les migrations (ou absence de migrations) des cellules de ce tissu. Ces mécanismes entrent par exemple en jeu dans la répartition anisotrope des différents types de neurones dans le tube neural (Guerrero et al. 2019).

En conclusion, des éléments s'accumulent pour mieux comprendre les patrons de dispersion cellulaire dans différents épithélia au cours du développement. Il en ressort que les tissus subissant des transformations mécaniques complexes, tels que l'embryon de poulet en gastrulation, présentent des contraintes mécaniques relativement faibles. Dans ce contexte permissif, les seules divisions cellulaires sont un important moteur de dispersion. À l'inverse, un tissu subissant des transformations mécaniques moins marquées, tel que le tube neural au niveau de la future moelle épinière, est le siège de contraintes mécaniques plus importantes. Dans ce contexte plus « cristallin », les divisions cellulaires ont des effets plus subtils voire nuls sur l'organisation du tissu. Il est tentant d'extrapoler ces aspects à la rétine en développement pour voir si un lien pourrait exister entre tension mécanique et dispersion des progéniteurs rétiniens en divisions prolifératives.

II.2.3) Développement des projections des RGC vers le cerveau

Le principal centre visuel vers lequel les RGC projettent leur axone est le tectum optique chez le poulet. L'établissement des projections des RGC vers le tectum optique du poulet a été revu par (Mey & Thanos 2000; Nakamura & O'Leary 1989; Thanos & Mey 2001). Pour résumer brièvement, une fois différenciées, les RGC produisent un axone qui croît vers la fissure choroïde le long de gradients de molécules de guidage à la surface de la rétine. Les axones des RGC se rassemblent alors et forment le nerf optique. Au niveau du chiasma, après la sortie de l'œil et avant l'arrivée dans le cerveau, la majorité des axones poursuivent leur route vers le tectum optique contra-latéral. Selon les espèces, une portion variable des axones peuvent également contacter les mêmes cibles du côté ipsi-latéral. Ces projections ipsi-latérales sont présentes chez les vertébrés dotés de vision binoculaire, en proportion corrélée à la qualité de cette dernière. Les différents types de RGC ont des cibles différentes dans les différents centres visuels primaires et secondaires. Comme on l'a vu dans la partie I.2.5), les patrons de projection de leurs axones dans le cerveau peuvent être utilisés comme un critère de

discrimination des types de RGC (Kunst et al. 2019). Une étude a par exemple été réalisée sur quatre types de RGC identifiées dans des lignées transgéniques de souris (Osterhout et al. 2014). Cette étude conclut que les types de RGC nés les plus précocement projettent initialement vers plusieurs cibles dans le cerveau de façon aspécifique, et que leurs projections sont raffinées a posteriori. À l'inverse, les RGC nées tardivement projettent directement avec précision vers leur cible. Une autre étude s'est intéressée à la topographie des projections de RGC dans le colliculus supérieur de la souris (Owens et al. 2015).

II.3) Développement de la rétine neurale

II.3.1) Premières études du lignage des RPC

Le développement de la rétine neurale, ou rétino-génèse, a lieu en plusieurs phases à partir des cellules neuroépithéliales localisées dans le territoire présomptif de la rétine. Dans une première phase dite proliférative, les cellules progénitrices rétinienne (progéniteurs ou RPC) se divisent de manière symétrique, générant deux nouvelles RPC. Cette phase a pour effet d'augmenter la population initiale de progéniteurs. Au cours d'une deuxième phase dite neurogénique, les RPC se divisent de manière asymétrique, donnant une RPC et une cellule post-mitotique qui se différencie en neurone rétinien ou en glie de Müller, ou bien réalisent une division symétrique terminale donnant naissance à deux cellules post-mitotiques.

Composition et organisation des clones de cellules générés par les RPC

Diverses approches de suivi du lignage ont été utilisées initialement pour étudier les clones de cellules générés par des RPC. On peut citer l'injection de l'enzyme HRP ou de Texas Red Dextran chez l'embryon de xénope (Holt et al. 1988), l'injection de rétrovirus chez la souris et le poulet (Fekete et al. 1994; Fields-Berry et al. 1992; Turner et al. 1990), l'emploi de souris chimères (Goldowitz et al. 1996; Williams & Goldowitz 1992) ou encore l'étude de souris portant une copie du gène rapporteur LacZ sur le chromosome X (Reese & Tan 1998).

Les rétines de souris chimères sont obtenues à partir d'embryons générés en mélangeant les blastomères de deux souches de souris, *Mus musculus* et *Mus caroli*. Les cellules issues des blastomères de *Mus musculus* sont révélées par hybridation *in situ* contre une séquence d'ADN génomique spécifique. Cette approche est analogue à celle des chimères caille-poulet. On peut ainsi observer de grands clones issus de blastomères. Ces clones forment des « patchs » à la surface de la rétine. Les cellules générées sont retrouvées dans toutes les couches de la rétine et forment des colonnes de cellules cohésives en vue radiale. Les clones

générés par des progéniteurs précoces forment ainsi des « unités développementales » ou « blocs élémentaires » qui constituent la rétine (Goldowitz et al. 1996; Williams & Goldowitz 1992). Des observations similaires ont été réalisées pour la rétine de xénope en injectant un marqueur dans les blastomères ou les RPC à des stades très précoces (Holt et al. 1988).

L'utilisation de rétrovirus permet de réaliser des injections à différents stades pour cibler des RPC plus ou moins précoces. Des clones composés de plusieurs colonnes de cellules cohésives ont ainsi pu être observés chez le poulet. Plus le stade d'injection est tardif, plus la taille des clones diminue. L'organisation des clones ainsi obtenus suggère une forte dispersion tangentielle accompagnée d'un mélange des RPC précoces (Fekete et al. 1994).

Dans d'autres études de lignage, un marquage mosaïque des RPC a été réalisé chez des souris femelles portant une copie du gène rapporteur LacZ sur un de leurs chromosomes X. Un des deux chromosomes X étant « silencé » aléatoirement au cours du développement, on obtient un individu mosaïque dont 50 % des cellules sont marquées. Les analyses réalisées avec cette stratégie donnent des résultats qui convergent avec les approches chimériques pour confirmer que les RPC génèrent toutes les classes de cellules rétinienne chez la souris. Cette approche révèle aussi la présence de cellules marquées isolées, ayant migré tangentiellement après la dernière division post-mitotique (Reese & Tan 1998). On peut conclure de ces expériences que les cellules post-mitotiques migrent tangentiellement plus ou moins loin en fonction de la classe considérée, mais que cette dispersion tangentielle reste globalement faible (Reese et al. 1995, 1999).

Chez les vertébrés, les RPC précoces marquées pendant la phase de division symétrique proliférative sont ainsi pluripotentes. Elles ont la capacité de générer toutes les classes de neurones de la rétine ainsi que la glie de Müller (Centanin & Wittbrodt 2014).

Génération ordonnée des classes de neurones rétinien

Deux études nous renseignent sur l'ordre de naissance des différentes classes de cellules dans la rétine de l'embryon de poulet (**figure 12 A**). Une première étude a utilisé la thymidine tritiée pour marquer les cellules nées à différents stades. Les différents neurones et la glie de Müller ont ensuite été identifiés en fonction de leur position et leur morphologie dans la rétine intacte ou dissociée (Prada et al. 1991). Une deuxième étude est venue compléter la première près de 20 ans après. Dans cet article, les auteurs ont électroporé un plasmide épisomal à E4.5 pour identifier les cellules générées par des RPC pendant la neurogenèse. Ces dernières ont été identifiées par leur position et leur morphologie, ainsi que des marqueurs immunohistochimiques donnant une information plus précise sur leur identité (Doh et al.

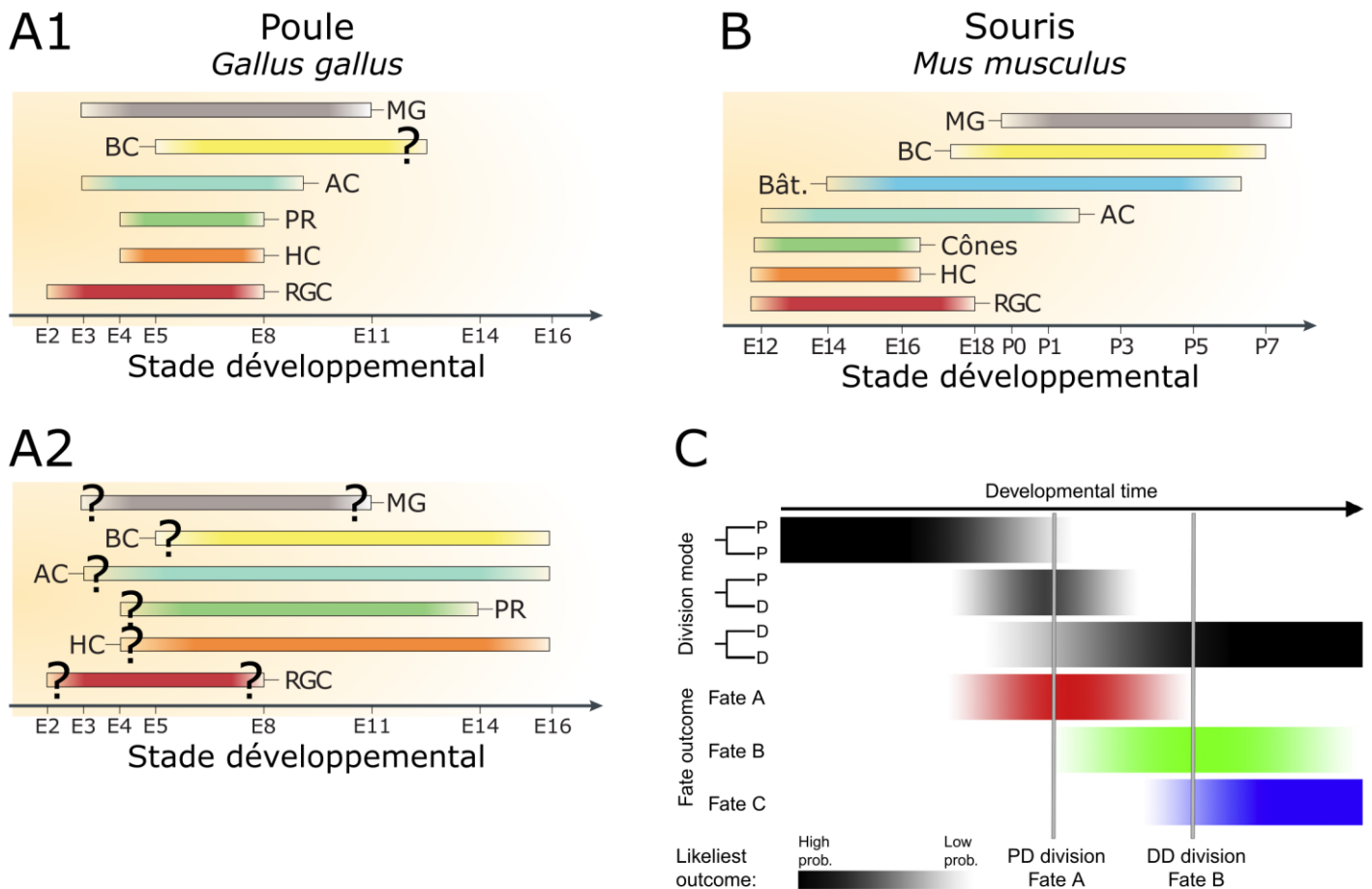


Figure 12 – Ordre de naissance des différentes classes de cellules rétinienne

A – Ordre de naissance des cellules rétinienne chez le poulet (*Gallus gallus*) (schéma modifié à partir de (Cepko 2014)). Les points d'interrogation indiquent des stades indéterminés. A1 – Ordre de naissance des différentes classe d'après (Prada et al. 1991). Dans cette étude, la détermination des classes est basée sur la position et la morphologie des cellules tandis que le stade de naissance est déterminé par injection de thymidine tritiée. Cette étude apparaît comme la plus fiable concernant la détermination du temps de naissance des cellules –notons cependant que celles-ci n'étaient pas forcément matures au moment de l'analyse. A2 – Ordre de naissance des différentes classes d'après (Doh et al. 2010). Dans ce deuxième article, la détermination des classes est basée sur la position, la morphologie et quelques marqueurs immunohistochimiques des classes de cellules. Le stade de naissance est déterminé par électroporation de $p^{CX}CAG::EGFP$ à E4.5. Cette étude ne prend donc pas en compte les stades de naissance de plusieurs classes de cellules. Elle est potentiellement plus précise sur l'identification des neurones bien que les marqueurs utilisés ne soient pas toujours valables pour des classes entières. B - Ordre de naissance des cellules rétinienne chez la souris (*Mus musculus*) (schéma adapté de (Cepko 2014)). C – Schéma de la séquence développementale des RPC chez les vertébrés (figure adaptée de (Boije et al. 2014)). Les frises noires représentent les RPC réalisant des divisions symétriques prolifératives (P-P), celles réalisant des divisions asymétriques neurogéniques (P-D) et celles réalisant des divisions terminales neurogéniques (D-D). Noter la coexistence de ces différentes catégories de RPC à certains stades du développement. Les lignes de couleur présentent la transition progressive de compétence des RPC (voir figure 15 et partie II.3.3 de l'introduction).

2010). Il en ressort que les différentes classes de cellules rétinienne naissent dans l'ordre suivant : RGC, cônes, HC, AC, bâtonnets, BC, MG. Les périodes de naissance de plusieurs de ces classes se chevauchent au cours du développement (**figure 12**). L'ordre observé dans ces études chez le poulet est le même que pour les autres vertébrés chez lesquels il a été étudié (Centanin & Wittbrodt 2014).

II.3.2) Régulation de la balance entre prolifération et différenciation

À la suite de ces premières découvertes sur les potentialités des RPC et le patron des clones qu'elles génèrent, des études avec des marqueurs immunohistochimiques ont permis de progressivement caractériser les RPC en prolifération et en neurogenèse.

Les RPC qui effectuent des divisions symétriques prolifératives expriment *Notch1* (Jadhav et al. 2006). La voie Notch est importante pour le maintien des progéniteurs dans un état de prolifération et de pluripotence. Une étude chez le poisson zèbre a démontré que l'exposition plus ou moins forte des cellules neuroépithéliales à la signalisation Notch est régulée par la migration interkinétique. Ce phénomène correspondant au mouvement des noyaux de ces cellules le long de l'axe apico-basal en lien au cours du déroulement de leur cycle de division. Lorsqu'elles se situent du côté apical du tissu (future face externe de la rétine) où elles se divisent, les RPC sont fortement exposées à Notch qui promeut leur prolifération. À l'inverse, leur séjour du côté basal tend au contraire à induire leur différenciation. Une mutation ralentissant le retour vers la face apicale de la rétine conduit ainsi à la sortie prématurée des RPC du cycle cellulaire (Del Bene et al. 2008). Chez le poisson zèbre à nouveau, *Notch1* a été confirmé comme un marqueur des RPC prolifératives. Il est également important pour la spécification de la MG en fin de lignage (Rulands et al. 2018). Ceci est à rapprocher du fait que les cellules gliales de Müller ont un pouvoir régénératif en se différenciant en RPC prolifératives dans la rétine mature endommagée. Or, de manière intéressante, l'activation de la voie Notch dans la MG de rétines murines active la régénération en poussant ces cellules à se différencier en RPC prolifératives et pluripotentes (Jadhav et al. 2009).

Les RPC expriment d'autre part les marqueurs *Pax6* et *Sox2*. *Pax6* est un des premiers facteurs de transcription activés dans le territoire présomptif de la rétine. *Sox2* est quant à lui régulé positivement par *Pax6* et par lui-même, et contribue au maintien des RPC en phase de prolifération (Inoue et al. 2007).

Ikaros, homologue murin d'*Hunchback* (*Hb*), est un marqueur des RPC précoces qui vont produire des RPC *Ikaros*⁺. Ces dernières sont des RPC neurogéniques produisant les premiers

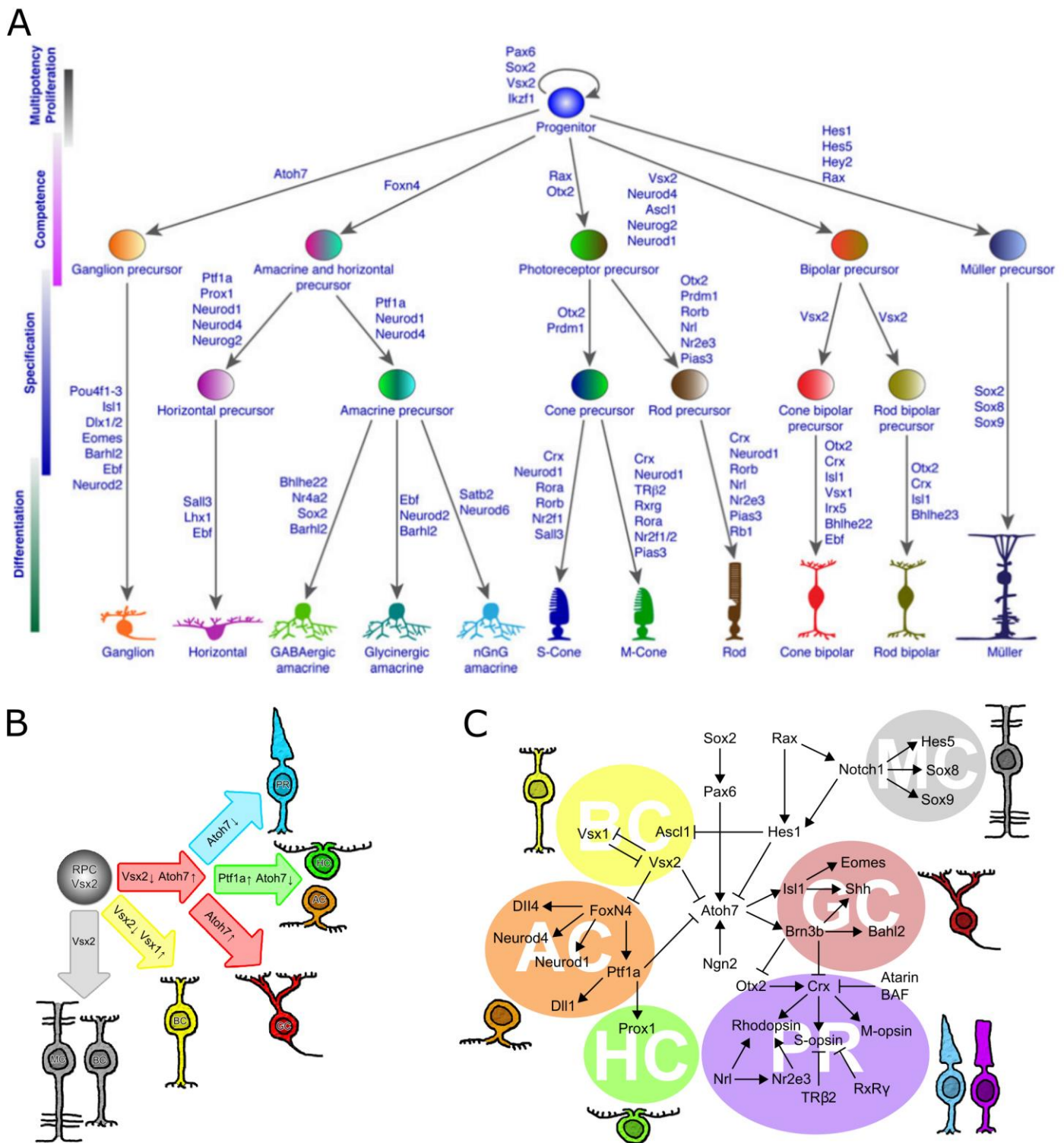


Figure 13 – Réseaux de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des différentes classes de cellules rétinienne

Schémas présentant divers facteurs de transcription impliqués dans la spécification des classes de cellules rétinienne. A – Schéma adapté de (Xiang 2013) basé principalement sur le développement rétinien chez la souris. Les voies de spécification des cônes M et S ainsi que de certains types d'AC sont représentées. B & C Schémas de spécification adaptés de (Boije et al. 2014) basés principalement sur le développement de la rétine chez le poisson zèbre. B – Les gènes *Vsx2*, *Atoh7*, *Ptf1a* et *Vsx1* sont responsables du maintien des RPC prolifératives et de la génération, successivement, des RGC, des PR, des HC, des AC, des BC et enfin de la MG par des RPC spécifiques. C – Schéma plus détaillé de la spécification des classes de cellules rétinienne par différents facteurs de transcription.

neurones de la rétine. *Ikaros* a ainsi une fonction analogue à *Hb* chez la drosophile : chez cet invertébré, *Hb* est un marqueur des neuroblastes, qui ont un comportement analogue aux RPC prolifératives des vertébrés (Elliott et al. 2008). Une étude du lignage des RPC avec une lignée de souris *Ikaros-Cre* a permis de définir le lignage de ces RPC. Elle confirme que les RPC prolifératives expriment *Ikaros* avant la production des premières cellules post-mitotiques. *Ikaros* serait ainsi exprimé dans les RPC prolifératives et non dans les RPC neurogéniques comme celles exprimant *Atoh7* car on retrouve toutes les classes de cellules dans les clones générés (Tarchini et al. 2012).

Enfin, *Vsx2* est un autre marqueur des RPC prolifératives chez le poisson zèbre. L'expression de ce répresseur doit s'arrêter pour permettre l'expression des facteurs de transcription permettant la différenciation des premières classes : *Atoh7* pour les RGC et cônes, *Foxn4* pour les interneurons, *Vsx1* pour une partie des BC. Les RPC *Vsx2*⁺ tardives finissent par générer une autre partie des BC ainsi que la MG (Vitorino et al. 2009).

Comme on a pu le voir ci-dessus, le cycle cellulaire a un rôle critique dans le choix entre division symétrique et asymétrique des RPC. La répartition des déterminants moléculaires dans les deux cellules filles après division a également un rôle clé dans la différenciation de la cellule post-mitotique. Le rôle particulier du cycle cellulaire dans la bascule entre divisions prolifératives et neurogéniques, retrouvé dans l'ensemble du SNC, a été revu dans (Hardwick & Philpott 2014).

II.3.3) Génération et spécification des différentes classes de neurones rétinien

À partir d'un certain stade, les cellules neuroépithéliales en prolifération vont produire des RPC capables de réaliser des divisions neurogéniques asymétriques ou symétriques. Le choix du type de division et la spécification des cellules générées reposent sur plusieurs facteurs de transcription présentés ci-dessous (**figure 13**).

Facteurs de transcription impliqués dans la spécification des classes

Le facteur de transcription *Atoh7* (aussi connu sous les noms *Math5* et *Ath5*) est requis pour le développement des RGC et l'expression de *Brn3b*, un facteur de transcription marquant une fraction importante des RGC (Wang et al. 2001). Le lignage des RPC *Atoh7*⁺ a tout d'abord été étudié dans une lignée transgénique de poisson zèbre *Atoh7::GFP*. Les RPC ainsi marquées produisent une RGC et une autre cellule au cours d'une division asymétrique

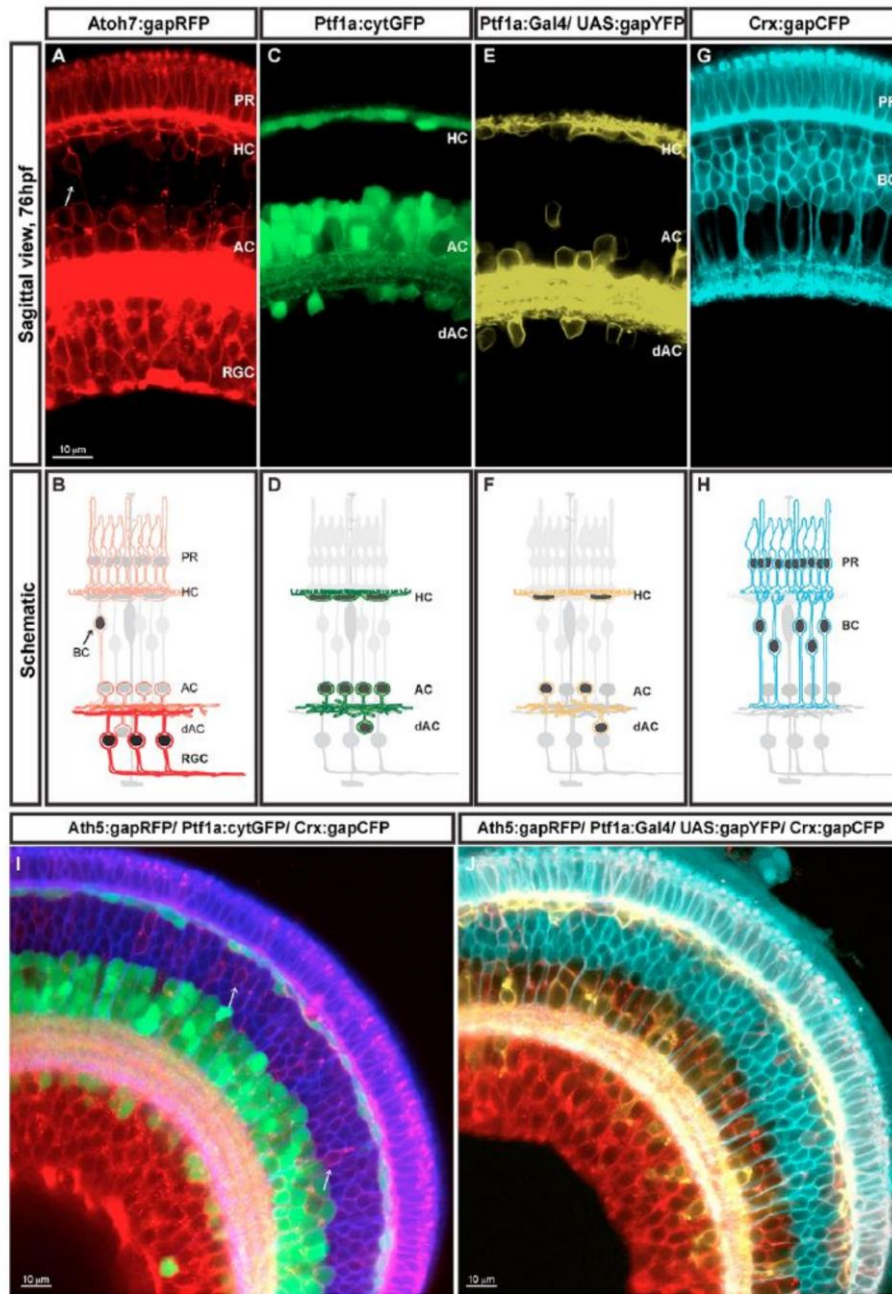


Figure 14 – Identification des différentes classes de neurones rétiniens dans les lignées de poissons zèbres SoFa

Il existe deux lignées SoFa, issues du croisement entre trois poissons zèbres transgéniques (figure issue de (Almeida et al. 2014)). A & B – Vue radiale et schéma d’une rétine de la lignée *Atoh7::gapRFP*. Dans cette lignée, les RGC sont fortement marquées tandis que les PR, HC et AC le sont plus faiblement. C & D – Vue radiale et schéma d’une rétine de la lignée *Ptf1a::cytGFP* dans laquelle les HC et les AC sont marquées. E & F – Vue radiale et schéma d’une rétine de poisson zèbre de la lignée double transgénique *Ptf1a::Gal4/UAS::gapYFP*. Dans cette lignée, les HC et une partie des AC sont marquées. G & H – Vue radiale et schéma d’une rétine de la lignée *Crx::gapCFP* dans laquelle les PR et les BC sont marquées. I – Vue radiale d’une rétine de la lignée SoFa1, issue du croisement entre les lignées exprimant la RFP, la GFP et la CFP. J – Idem pour la lignée SoFa2, issue du croisement entre les lignées exprimant la RFP, la YFP et la CFP. Le marquage combinatoire permet d’identifier chaque classe de neurones rétiniens. (Barres d’échelle : 10 µm)

observée en vidéomicroscopie. De façon intéressante, des progéniteurs *Atoh7::GFP* injectés dans un mutant *lakritz* (*Atoh7*^{-/-}) ne possédant pas de RGC réalisent souvent une division terminale générant deux RGC. Ceci suggère un rôle de l'environnement dans la régulation des potentialités des RPC, en plus du programme intrinsèque de différenciation contrôlé par *Atoh7* (Poggi et al. 2005). Le rôle d'*Atoh7* a aussi été confirmé chez le poulet, chez lequel il contrôle la spécification des RGC via les facteurs *Ngn2* et *Hes1* (Hernandez et al. 2007). *Ngn2* a le même rôle dans la spécification des premiers neurones rétiniens générées chez la souris (Kowalchuk et al. 2018). Toujours dans cette espèce, *Atoh7* est requis pour la production de RGC, cônes, HC, AC et bâtonnets. La génération de ces différentes classes par les RPC *Atoh7*⁺ a pu être étudiée avec une lignée knock-in (KI) *Atoh7*^{GFP}. Les RPC *Atoh7*⁺ génèrent seulement une partie des types de cellules amacrines. Le KO *Atoh7*^{-/-} produit plus d'AC et HC que la normale, les RPC *Atoh7*^{GFP} produisant alors également quelques BC et MG, ce qui n'est pas observé en temps normal (Feng et al. 2010). *Atoh7* est requis pour le recrutement de Hes5.3 (voie Notch) dans l'avant-dernière division des RPC aviaires neurogéniques : il induit un ralentissement du cycle cellulaire qui va favoriser la formation d'une RGC (Chiodini et al. 2013). *Atoh7* semble ainsi constituer un facteur de transcription primordial et emblématique de la première vague de RPC neurogéniques qui produisent les RGC, les bâtonnets, les HC et une partie des AC.

De nombreux autres facteurs de transcription jouent un rôle important dans le lignage des RPC. Le facteur *Ascl1* est requis pour l'expression de *Delta-like* (*Dll*) et une signalisation normale de la voie Notch. En l'absence d'*Ascl1*, la neurogenèse est diminuée au profit de la gliogenèse (Nelson et al. 2009). Ce facteur est donc requis pour une neurogenèse normale. Le facteur *Ptf1a* détermine quant à lui la production d'HC et d'AC dans les lignages des RPC *Atoh7*⁺ (première vague de différenciation) et *Vsx1/2*⁺ (deuxième vague) (Jusuf et al. 2011). Les facteurs à homéodomaine *LIM* sont également impliqués dans le développement de différentes classes et types de neurones rétiniens (Balasubramanian et al. 2014). *Isl1*, un facteur à homéodomaine LIM, a ainsi un rôle dans le développement des HC et de certaines RGC et AC (Bejarano-Escobar et al. 2015). *Olig2* est quant à lui exprimé par des RPC neurogéniques produisant essentiellement des bâtonnets, des AC, des BC et de la MG (Ha et al. 2012). Les RPC *Olig2*⁺ constituent ainsi le complémentaire des RPC *Atoh7*⁺ qui produisent les classes de neurones rétiniens apparaissant en premier. Une autre étude s'est concentrée sur les RPC *Thrb1*⁺, formant une sous-population aux potentialités neurogéniques restreintes chez le poulet et la souris. Des approches transcriptomiques ont notamment permis de déterminer

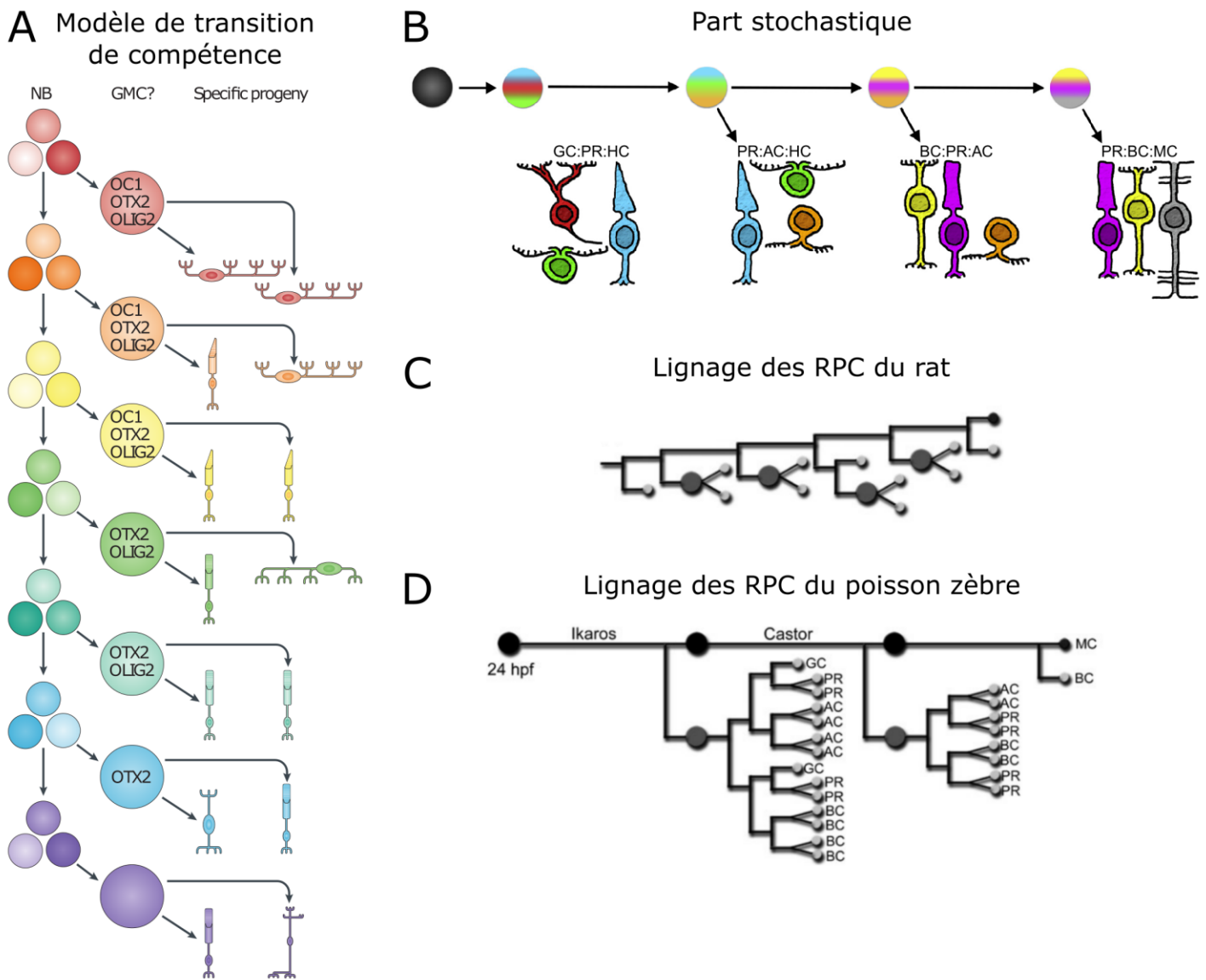


Figure 15 – Modèles du lignage des RPC et de la génération des différentes classes de cellules rétiniennes

A – Modèle de transition de compétence issu de (Cepko 2014). Dans ce modèle inspiré du développement de la medulla chez la drosophile, une population de RPC analogues aux NB se maintient à travers des divisions symétriques prolifératives et asymétriques. Elles génèrent des RPC neurogéniques qui se comportent comme les GMC et produisent des cellules postmitotiques à travers une division symétrique terminale. L'identité des cellules générées par les RPC neurogéniques dépendent des facteurs exprimés dans les RPC « neuroblastiques ». Ces facteurs changent au cours du temps. B – Chez les vertébrés, contrairement à la drosophile, le choix du type de division réalisée et de la classe de cellule produites n'est pas fixé et se fait de manière stochastique (figure de (Boije et al. 2014)). Les facteurs de transcription ne définissent pas précisément le patron de division et les cellules générés. Ils limitent plutôt les destins possibles à différents stades de la rétino-génèse (voir aussi figure 13 C). C & D – Détail du lignage spécifique de deux espèces de vertébrés issu de (Rulands et al. 2018). C – Lignage des RPC du rat d'après les travaux de (Gomes et al. 2011). D – Lignage des RPC du poisson zèbre d'après les travaux présentés dans ce même article ainsi que dans (He et al. 2012). Certaines RPC « neuroblastiques » pourraient éventuellement produire des cellules postmitotiques plutôt que des RPC neurogéniques à travers certaines divisions. Ce serait le cas pour une partie des RGC, des AC et des BC. La MG serait une classe directement issue des RPC « neuroblastiques » en fin de rétino-génèse. Chez le poisson zèbre, les RPC neurogéniques se diviseraient aussi de manière asymétrique pour générer plus de deux cellules post-mitotiques.

que ces RPC produisent préférentiellement des cônes et des HC, et n'expriment pas les marqueurs de RPC prolifératives et pluripotentes comme *Vsx2*, *Lhx2* ou *Pax6* (Buenaventura et al. 2018).

La lignée de poisson zèbre SoFa permet d'étudier et d'illustrer le développement des différentes classes de neurones rétiniens. Dans cette lignée, trois protéines fluorescentes sont sous le contrôle de promoteurs de trois facteurs de transcription exprimés de manière différentielle par les classes de cellules rétiniennes (**figure 14**). Les promoteurs utilisés sont ceux des gènes *Atoh7* pour marquer les RGC, les PR, les HC et les AC ; *Ptf1a* pour marquer les HC et les AC ; et *Crx* pour les PR et les BC (Almeida et al. 2014). Quelques BC issues de RPC *Atoh7*⁺ sont observées de façon inattendue. Le croisement des patrons de marquage avec la position des cellules permet de révéler les différentes classes de neurones dans la rétine mature ou en développement. La même équipe a également développé une lignée pour suivre simultanément le lignage des RPC exprimant *Atoh7*, *Ptf1a*, *Vsx1* ou *Atoh7* et *Ptf1a* chez le poisson zèbre (Boije et al. 2015).

Modèle de transition de compétence

Les travaux sur le lignage des RPC et les facteurs qui le contrôlent ont abouti à un modèle dit de « transition de compétence », proposé par C. Cepko. Ce modèle affirme qu'une transition progressive des potentialités des RPC a lieu pendant la rétino-genèse (Cepko 2014; Livesey & Cepko 2001). Selon ce modèle, les RPC en prolifération génèrent des RPC neurogéniques dont les potentialités diffèrent au cours du développement (**figure 15 A**). Ces RPC neurogéniques peuvent générer un nombre limité de cellules d'une ou quelques classes différentes seulement. Ce modèle est analogue au développement du système visuel de la drosophile. Les RPC en divisions prolifératives jouent alors un rôle similaire aux neuroblastes de l'insecte, tandis que les RPC neurogéniques se comportent comme des cellules mères ganglionnaires.

Modèle stochastique de spécification

Les travaux des équipes de W. Harris et M. Cayouette ont apporté une lumière intéressante sur le modèle de transition de compétence. Les patrons de divisions aboutissant à la génération des neurones des différentes classes ont d'abord été étudiés via des expériences *in vitro*. Des RPC de rat ont été cultivées à une densité clonale, c'est à dire sans contact entre les cellules, pour étudier leur lignage en l'absence d'influences extrinsèques. Les RPC ne se comportent jamais de manière stéréotypée en produisant un nombre constant de cellules des

différentes classes avec un nombre constant de division du même type. Au contraire, le nombre de divisions symétriques et asymétriques et l'identité des cellules générées apparaissent déterminés de manière stochastique. Ces choix correspondraient donc à un mécanisme intrinsèque aux RPC (Gomes et al. 2011).

L'équipe de W. Harris a reproduit des résultats similaires *in vivo* chez le poisson zèbre. Pour ce faire, deux approches disponibles chez le poisson zèbre ont été combinées. Tout d'abord, un choc de température permet d'activer l'expression de *Kaede* dans quelques RPC de manière mosaïque à l'aide des lignées MAZe et UAS-Kaede. La lignée MAZe possède un gène *Gal4* inversé par défaut et ne pouvant donc pas s'exprimer. Une recombinaise *Cre* floxée contrôlée par le promoteur *Hsp70* est également présente dans cette lignée. L'expression de cette *Cre* est induite par un choc thermique (voie des protéines Heat-shock ou Hsp). La *Cre* excise alors son propre gène et réoriente le gène *Gal4*, qui peut alors s'exprimer sous contrôle du promoteur ubiquitaire *EF1a*. La durée et l'intensité du choc thermique permettent de contrôler le nombre de cellules dans lesquelles la recombinaison a lieu et d'obtenir une expression mosaïque (Collins et al. 2010). Cette stratégie est utilisée pour induire l'expression de Kaede via le système UAS/Gal4). Kaede est une protéine photoconvertible, se comportant par défaut comme une protéine fluorescente verte. Après irradiation dans l'UV, sa structure change définitivement et elle se comporte alors comme une protéine fluorescente rouge. Une cellule est ainsi sélectionnée en vidéomicroscopie dans un clone vert de RPC. Le marquage Kaede de cette cellule est alors photoconverti par une impulsion laser pour suivre sa descendance. Le lignage d'un grand nombre de RPC marquées à différents stades a été suivi par cette approche pendant un à plusieurs jours. Les résultats obtenus montrent qu'il existe une courte phase durant laquelle RPC prolifératives et neurogéniques coexistent. Cette phase de coexistence pourrait être plus longue chez la souris ou le poulet chez lesquels la rétino-génèse dure plus longtemps. Les dernières divisions des RPC suivent un modèle stochastique à l'échelle individuelle au niveau du type de division réalisée et de la classe des cellules produites, comme observé *in vitro* avec les RPC de rat. Il existe également un enrichissement en clones constitués de deux cellules de même classe pour les PR, HC BC et AC. Les RGC, au contraire, sont plus fréquemment issues d'une division asymétrique (He et al. 2012).

La lignée de poisson zèbre SoFa (Almeida et al. 2014), présentée plus haut, permet aussi de confirmer ces résultats. Pour ce faire, on peut analyser le lignage de RPC SoFa individuelles injectées dans une rétine de poisson zèbre WT. L'analyse des résultats est facilitée par les couleurs qui indiquent directement la classe des cellules produites. La même équipe a reproduit une analyse similaire pour suivre simultanément le lignage des RPC exprimant

Atoh7, *Ptf1a*, *Vsx1* ou *Atoh7* et *Ptf1a* chez le poisson zèbre (Boije et al. 2015). L'expression de ces facteurs constituerait le moteur intrinsèque des décisions stochastiques décrites dans l'article précédent (**figure 13 B**).

Le modèle de divisions stochastiques de Harris vient ainsi compléter le modèle de transition de compétence défini par Cepko (**figure 15 B**). Comme chez *D. melanogaster*, il existe chez les vertébrés une séquence de spécification des RPC. Celles-ci vont produire progressivement les différentes classes de neurones rétinien en fonction des facteurs qu'elles expriment. Mais contrairement à la drosophile, la décision finale du type de division ou de la classe des neurones produits ne serait pas complètement déterminée. Il existerait plusieurs événements possibles parmi un ensemble restreint défini par le modèle de transition de compétence et dont la probabilité ne serait pas strictement égale à 0 ou 1 comme chez la drosophile (**figure 12 C**). Le lignage des RPC présenterait également des différences entre différentes espèces de vertébrés (**figure 15 C & D**).

Les modèles de transition de compétence et stochastiques sont revus par (Amini et al. 2018; Bassett & Wallace 2012; Boije et al. 2014; Centanin & Wittbrodt 2014; Cepko 2014; Chen et al. 2012; Xiang 2013).

Transcriptome des RPC

Une première étude du transcriptome des RPC a été réalisée chez la souris avec des puces à ADN spécifiques de gènes exprimés dans les progéniteurs au cours de la rétino-génèse. Le patron d'expression des gènes identifiés a été déterminé par hybridation *in situ*. Une grande variété de FT sont ainsi coexprimés dans différentes RPC à un même moment du développement. Leur répartition varie également en fonction du cycle cellulaire (Trimarchi et al. 2008). Un article récent a utilisé une approche de transcriptomique plus poussée. Des cellules rétinien ont été isolées et les ARNm qu'elles contenaient séquencés à différents stades de la rétino-génèse (Clark et al. 2019). L'analyse des résultats a permis de catégoriser les 6 classes rétinien et de suivre leur développement. Les auteurs ont retrouvé les facteurs de transcription spécifiant certaines classes comme *Atoh7* ou *Otx2*. Ils ont également décrit une nouvelle famille de facteurs de transcription importants pour la spécification des dernières classes de neurones générées : les NFI. De façon intéressante, les auteurs distinguent également deux populations différentes de RPC prolifératives. Les premières, précoces, correspondent à celles qui produisent les premières classes : RGC, HC, cônes et premiers

types d'AC. Les secondes, tardives, sont les RPC prolifératives qui produisent indirectement (ou non) les dernières classes : les autres types d'AC, les bâtonnets, les BC et la MG.

En conclusion, des RPC prolifératives et neurogéniques sont présentes simultanément à plusieurs stades de la rétinogénèse. Deux vagues de différenciation correspondant à deux populations de RPC prolifératives distinctes se suivent dans la rétine. Bien que les RPC tardives soit issues des précoces, on observe un changement sensible dans les déterminants moléculaires qu'elles expriment. L'ordre de naissance des différentes classes de neurones rétiniens est directement lié à la séquence d'expression des facteurs de transcription par les RPC. *Atoh7* est exprimé au début de la neurogenèse et induit la production des RGC puis des cônes. Ensuite, l'expression de *Ptf1a*, partiellement chevauchante, induit la génération des HC et d'une partie des AC. Puis *Otx2*, *Vsx1*, *Vsx2* et d'autres facteurs permettent la génération du reste des AC, des bâtonnets et des BC. Le cas de la MG est un peu particulier, on voit en effet que l'expression de marqueurs des RPC prolifératives, et non neurogéniques, est requis pour sa spécification (facteurs *Notch1* et *Vsx2*).

Le développement de la CMZ

Chez la majorité des vertébrés mais à l'exception des mammifères, la zone bordant la rétine appelée zone marginale ciliaire (CMZ), contient des progéniteurs qui persistent chez l'adulte. La CMZ joue un rôle important dans la régénération. Chez les poissons, qui croissent toute leur vie, elle est le lieu de la rétinogénèse continue observée chez l'adulte. L'origine clonale de la CMZ au cours du développement du poisson zèbre a été étudiée par (Tang et al. 2017). Chez le poisson medaka, la signalisation Notch et le facteur *Atoh7* constituent un axe capital pour le maintien de la CMZ ainsi que pour le ratio de neurones rétiniens des différentes classes qu'elle produit (Pérez Saturnino et al. 2018).

II.3.4) Spécification des types de neurones rétiniens

Il existerait une centaine de types différents de neurones rétiniens. Ces derniers sont spécifiés en parallèle de leur classe au cours de la rétinogénèse.

Ordre de naissance des types rétiniens

On peut d'abord noter que comme les classes, les différents types de neurones rétiniens naissent dans un ordre particulier. C'est notamment le cas des sept types de photorécepteurs du poulet dont le développement a été observé en microscopie électronique à balayage à

différents stades embryonnaires (Wai et al. 2006). Comme cela a déjà été mentionné, les AC sont générées en deux temps à la fin et au début des première et deuxième vagues de différenciation dans la rétine. L'ordre de naissance de certains types de cellules amacrines a été étudié chez la souris (Voinescu et al. 2009). Pour ce faire, des souris gestantes et des nouveaux nés ont été injectées avec du BrdU à différents stades de la rétino-génèse. Les cellules amacrines générées ont ensuite été caractérisées via leur localisation, leur morphologie et des marqueurs révélés par IHC. Il en résulte que les types étudiés sont produits dans l'ordre suivant : AC cholinergiques (anticorps anti-ChAT), à neuropeptide Y, dopaminergiques (TH), gabaergiques (Gad65/67), glutamatergiques (Vglut3), glycinergiques (GlyT1) et exprimant le facteur *Ebf1*. Il faut cependant noter que plusieurs de ces marqueurs révèlent des sous-populations constituées de plusieurs types d'AC plutôt que des types à part entière.

Facteurs de transcription spécifiant les types neuronaux rétinien

La compréhension des voies de spécification des différents types rétinien est essentielle pour certaines approches thérapeutiques. L'induction de la régénération pourrait ainsi être accompagnée d'un cocktail de facteurs permettant d'équilibrer les types neuronaux régénérés. De façon similaire pour la thérapie cellulaire, des ratios spécifiques de types cellulaires pourraient être produits à partir de cellules iPS en utilisant les déterminants moléculaires adéquats.

Les facteurs de la famille *Brn3* : *a*, *b* et *c* (aussi connus sous les noms *POU4F1*, 2 et 3) sont impliqués dans la spécification de sous-populations de RGC chez la souris (Badea et al. 2009). Certaines RGC expriment ces facteurs au cours du développement mais pas dans la rétine mature (Shi et al. 2013). Une autre voie a été mise en évidence dans la spécification d'un autre type de RGC : les α RGC, activées par un objet s'approchant et devenant par conséquent plus grand (et inversement). Elles seraient donc importantes pour la perception de la distance. La régénération de l'axone de ces cellules ganglionnaires après lésion est promue préférentiellement par l'inhibition de la voie *PTEN*, qui aboutit à l'activation de la voie *mTOR* (Duan et al. 2015). Ce résultat sur la régénération pourrait ainsi indiquer une voie valable pendant le développement.

Le mode de spécification des types de photorécepteurs est relativement bien connu par rapport aux autres classes. Une RPC neurogénique est d'abord spécifiée à donner des photorécepteurs par des facteurs comme *Otx2* et *Crx*. Le choix se porte ensuite sur la production de bâtonnets ou de cônes et enfin sur le type de cône s'il y a lieu (opsine exprimée). L'hormone

thyroïdienne et l'acide rétinoïque sont impliqués dans la spécification des types. Des gradients d'acide rétinoïque sont établis par la localisation spécifique d'enzymes produisant ou dégradant cette molécule. Un tel gradient est responsable par exemple de la répartition hétérogène des bâtonnets chez le poulet (Viets et al. 2016). Les gènes *gdf6a*, *thrβ* et *tbx2b* ont un rôle importants dans la spécification des différents types de cônes chez le poisson zèbre (Duval & Allison 2018), et des progéniteurs neurogéniques de PR exprimant *trbeta2* produisent deux cônes L chez le poisson zèbre (Suzuki et al. 2013). Enfin l'hormone thyroïdienne permet de spécifier la génération de cônes S, M et L dans des organoïdes de rétine humains (Eldred et al. 2018).

Concernant les interneurons rétiniens, Prdm13 spécifie la génération de certains types d'AC en aval de Ptf1a (Watanabe et al. 2015). Pour les HC, des patrons spécifiques de lignage ont été observés pour la génération des différents types. Le facteur *Foxn4* ainsi que les facteurs à homéodomaine LIM *Lhx1* et *Isl1* ont un rôle dans la spécification de ces différents types (Boije et al. 2016).

Raffinement post-natal de l'identité neuronale

Certaines études indiquent que la différenciation des types se poursuit après la fin de la rétinogénèse. Les types sont en bonne partie spécifiés au cours du développement mais un raffinement de leur identité semble également avoir lieu après la naissance. Même chez le poussin qui peut voir dès son éclosion, certains raffinements ont lieu durant les premiers jours d'activité de la rétine. La Calrétinine et la Calbindine sont ainsi exprimées dans différentes populations cellulaires rétiniennes au cours du développement. Des changements dans les patrons d'expression de ces deux protéines se poursuivent dans les premiers jours post-éclosion, suggérant que la définition complète des types est parachevée dans les premiers jours de vie du poussin (Ellis et al. 1991). Une étude plus récente chez le poulet va dans le même sens et confirme le rôle important de ces deux protéines liant le Ca^{2+} dans la plasticité neuronale après éclosion, en particulier pour la Calbindine (Fosser et al. 2013).

Transcriptomique des cellules post-mitotiques en différenciation

Le transcriptome de RGC nouvellement nées a été étudié sur des cellules uniques. Cette étude met en évidence des voies de spécification et différenciation de la classe des RGC et de différents types. Elle met aussi en évidence les premières molécules de guidage exprimées par les RGC, importantes dans les dendrites pour la stratification et la connexion correcte des types et jouant également un rôle dans la formation des projection axonales vers le cerveau

(Giudice et al. 2018). L'analyse du transcriptome de cellules uniques de la rétine du macaque a déjà été présentée dans la partie I.2.4) (Peng et al. 2019). Cette étude conclut que les différents facteurs de transcription connus sont utilisés de façon similaire entre souris et macaque pour la spécification des types d'interneurones. Mais cela est moins vrai pour les RGC, les cellules ganglionnaires du macaque présentant des spécificités particulières à cette espèce.

II.3.4) Mise en place de l'organisation mosaïque des types neuronaux rétiens

Comme indiqué précédemment (cf. I.2.5)), les différents types de neurones rétiens sont distribués de façon particulière dans le tissu mature. Les cellules ganglionnaires, amacrines et horizontales forment des mosaïques régulières tangentielles à la rétine. La formation de ces mosaïques au cours du développement reste aujourd'hui vivement débattue alors que tous les types neuronaux rétiens n'ont pas encore été catalogués et leur éventuelle organisation mosaïque caractérisée. Certains types sont par ailleurs répartis de manière hétérogène dans la rétine. La formation de ces patrons spécifiques sera également revue.

Novelli *et al.* ont fait un premier inventaire des mécanismes de formation des mosaïques rétiennes (Novelli et al. 2005). Il faut souligner que les mosaïques se forment au cours du développement, avant même que la rétine soit mature et fonctionnelle. Cette revue identifie deux mécanismes principaux qui pourraient être les moteurs de l'établissement de mosaïques régulières d'après les connaissances de l'époque : la mort cellulaire programmée et la migration tangentielle des neurones au cours du développement et/ou dans les premiers jours après la naissance (**figure 16**).

Un troisième type de mécanisme sera exploré à la fin de cette partie. Il s'agit des biais au niveau des RPC neurogéniques voire prolifératives dans la génération de types spécifiques. Le rôle du lignage dans la formation des types neuronaux reste sous-exploré à ce jour malgré quelques résultats intéressants rapportés dans la littérature appuyant cette hypothèse. En comparaison, de nombreuses études ont été menées sur les voies responsables de l'établissement des mosaïques au niveau de populations de cellules post-mitotiques.

Raffinement des mosaïques par mort cellulaire programmée

Des travaux revus par (Valenciano et al. 2009) se sont intéressés aux vagues d'apoptose survenant au cours du développement de la rétine neurale. Certains auteurs proposent que ces

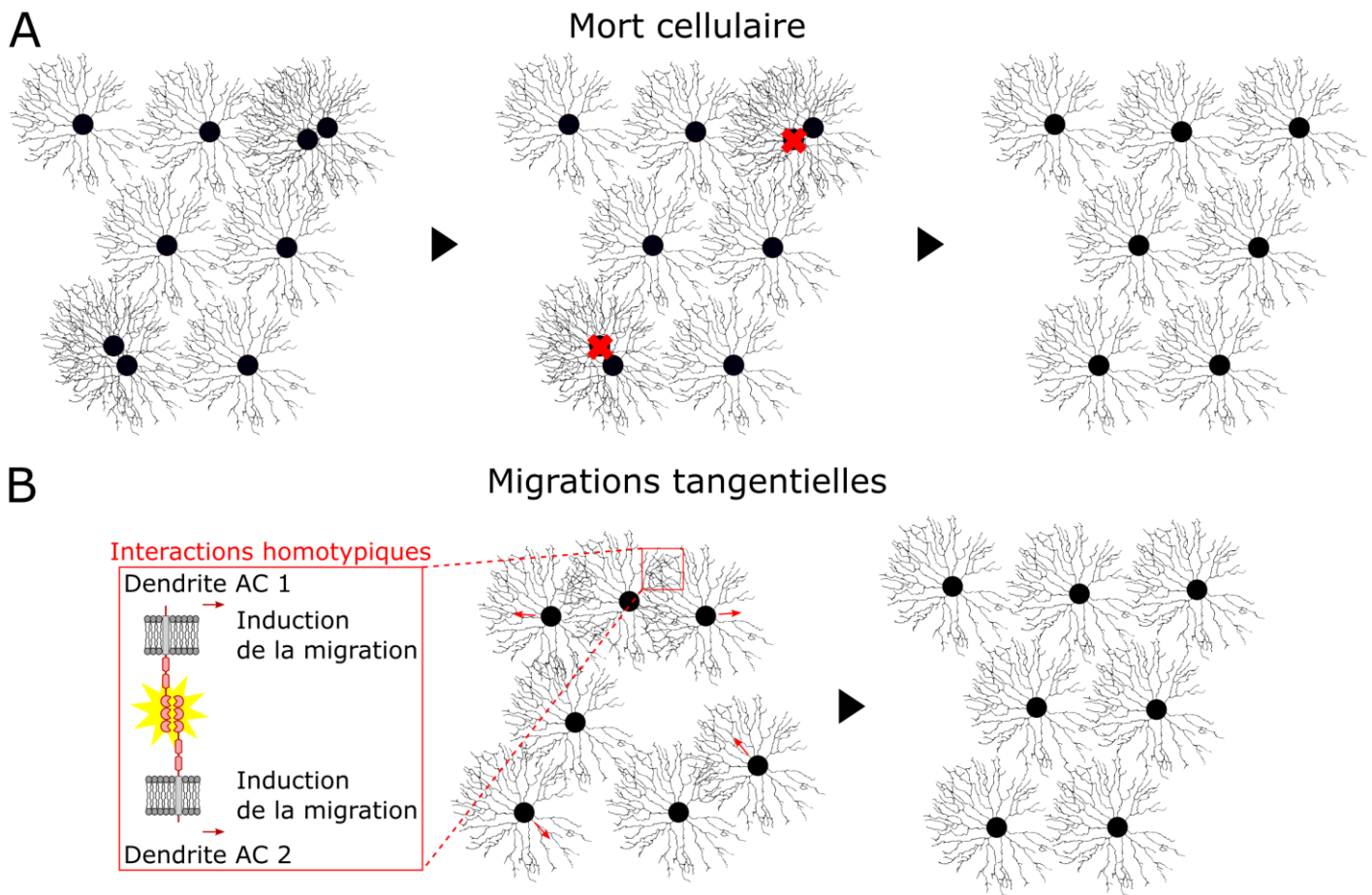


Figure 16 – Modèles d'établissement de la mosaïque des neurones rétiniens

Présentation des deux modèles prédominants expliquant l'établissement des mosaïques régulières formées par de nombreux types de neurones rétiniens. A – La mort cellulaire permet de retirer spécifiquement des cellules surnuméraires accolées appartenant à un même type. Cet effet est cependant limité pour la mise en place de certaines mosaïques régulières. B – Les migrations tangentielles sont aujourd'hui le principal mécanisme expliquant l'établissement de mosaïques régulières dans la rétine. Ces migrations tangentielles sont contrôlées par des interactions homo- (et hétéro-) typiques, par exemple grâce aux molécules de la famille des cadhérines.

vagues seraient un moteur de l'organisation des mosaïques de types en soustrayant les cellules surnuméraires à des positions spécifiques (**figure 16 A**). Cependant, chez le rat, la mort cellulaire programmée ne semble avoir aucun effet sur le raffinement des mosaïques des *Starburst* AC (SAC) cholinergiques. La mort de ces cellules semble aléatoire et indépendante de leur position (Galli-Resta & Novelli 2000). Chez la souris, la mise en place de la mosaïque des AC dopaminergiques semble, en revanche, être liée à la mort cellulaire programmée (Raven et al. 2003). Les auteurs proposent que les migrations tangentielles et le lignage de ces cellules n'auraient pas d'effet. Ils tirent cette conclusion de l'observation des AC dopaminergiques dans la lignée de souris *Bcl2*^{-/-} qui présente une forte diminution de la mort programmée au cours de la rétino-génèse. Observant dans ce mutant une mosaïque des AC dopaminergiques plus dense que la normale avec des cellules anormalement collées, ils concluent qu'il n'y a de correction de leur organisation ni par inhibition dans la production de certains types par les RPC ni par migration tangentielle. Or les populations de tous les types neuronaux sont *a priori* augmentées de façon aspécifique dans cette lignée de souris, et la mutation pourrait aussi affecter l'expansion des RPC. Dès lors, il est possible que le phénotype observé au niveau des AC dopaminergiques soit lié à un effet d'encombrement. La mort cellulaire pourrait ainsi agir de manière complètement aspécifique sur l'organisation mosaïque des types rétiniens, que le lignage préétablirait et que la migration tangentielle raffinerait. *Dscam* aurait néanmoins un rôle avéré dans la mort sélective de certaines cellules accolées pour raffiner les mosaïques (Li et al. 2015).

En conclusion, la mort cellulaire programmée ne semble pas être un mécanisme déterminant dans la répartition régulière des types rétiniens dans la rétine. Elle agirait essentiellement de manière aspécifique, ou bien en raffinant ou corrigeant certaines mosaïques en faisant disparaître certaines cellules anormalement accolées.

Raffinement de mosaïques par inhibition latérale

La voie Notch/Delta a un effet d'inhibition de contact. Des RPC en prolifération induisent les RPC voisines à devenir neurogéniques et inversement. Cet effet a été modélisé et permet d'obtenir des mosaïques régulières. Il a été proposé que le contrôle du choix d'identité des sous types rétiniens par ce mécanisme pourrait expliquer partiellement la formation d'une mosaïque régulière en conjonction avec d'autres mécanismes comme l'apoptose et la migration (Eglen & Willshaw 2002). Cependant, il semble complexe voire impossible d'établir plusieurs dizaines de mosaïques régulières avec seulement un couple de molécules.

Raffinement de mosaïques par migration tangentielle

La formation de mosaïques grâce à des migrations tangentielles induites par des interactions dendritiques a été modélisée par l'équipe de B. Reese (**figure 16 B**). Si un nombre suffisant de molécules d'interaction (par exemple de contact) distinctes existent et si les mosaïques sont indépendantes entre elles, la migration tangentielle pourrait être un moteur suffisant pour l'établissement de mosaïques régulières (Eglen et al. 2000). L'équipe de B. Reese travaille depuis longtemps sur l'établissement des mosaïques rétiniennes. Ils considèrent que si le lignage jouait un rôle dans leur développement, le mécanisme mis en jeu ne pourrait prendre place qu'au niveau des RPC neurogéniques. En effet, la vision classique de la biologie du développement définit les types comme un raffinement des classes de neurones rétiens (ancienne nomenclature des types et sous-types). Dans ce cas, la cellule produite par des progéniteurs biaisés, par exemple par inhibition de contact, n'aurait pas besoin de se déplacer tangentiellement car elle serait générée à la bonne position. Or, cette équipe a observé des migrations tangentielles de certaines classes de cellules (HC, RGC et dans une moindre mesure AC) issues de clones marqués par un rapporteur *LacZ* sujet à l'inactivation du chromosome X (Reese & Tan 1998; Reese et al. 1995). Pour B. Reese, si ces migrations se produisent, c'est que le lignage n'a pas d'effet. Tout serait alors dû essentiellement aux migrations tangentielles (Reese & Galli-Resta 2002). On va voir que cette hypothèse est pertinente avec les modèles d'interactions homotypiques développés par la suite. Cependant il faut noter que les migrations tangentielles observées sont limitées à quelques dizaines de micromètres au maximum : si elles sont importantes relativement à la taille des clones de cellules, elles restent très limitées à l'échelle de la rétine.

Un rôle clair de la migration tangentielle a été établi par l'étude de souris mutantes montrant que deux protéines transmembranaires, *Megf10* et *Megf11*, sont requises pour la formation des mosaïques de types spécifiques d'HC et d'AC (Kay et al. 2012). Les interactions homotypiques entre protéines *Megf* induisent l'établissement de mosaïques régulières par migration latérale des cellules (Reese 2012). Le rôle de *Dscam* a également été établi dans la mise en place des mosaïques et des arborisations dendritiques de certains types. Des interactions entre molécules de contact régulent donc les migrations aboutissant à la formation de mosaïques régulières (Reese & Keeley 2014). Un autre article met en évidence l'importance de la dose de *Megf10* pour la mise en place de la mosaïque des SAC. Une lignée de souris mutantes *Cpeb3*^{-/-} montre une surexpression de *Megf10* dans les SAC ON présentes

dans la RGL, aboutissant à une désorganisation de leur agencement mosaïque. Les SAC OFF de l'INL ne sont par contre pas affectées (Chen et al. 2016).

Le développement des classe et les migrations tangentielles des types ont été revus par (Amini et al. 2018). Cette revue introduit un travail sur les migrations des HC au cours de la rétino-génèse (Amini et al. 2019).

Comment les mosaïques des différents types rétinien s'agencent-elles entre elles ? Les mosaïques de huit paires de types parfois connectées spécifiquement ont été comparées entre elles. Ces paires ont été réalisées entre les types suivants : les RBC, les AC AII, les HC, constituant un type unique chez la souris, les SAC, les dSAC et les AC à indolamine. L'autocorrélation des types entre eux ne révèlent pas de méta-niveau d'organisation (Rockhill et al. 2000). Des outils géométriques plus récents pourraient éventuellement dévoiler de nouvelles propriétés. Les auteurs proposent en tout cas que le placement des mosaïques entre elles est aléatoire et indépendant d'un type à un autre. Dans ce cas, les seules migrations tangentielles dues à des interactions homotypiques pourraient suffire à établir les mosaïques. Une nouvelle étude chez le rat encore non publiée présente cependant quatre nouvelles mosaïques de RGC organisées entre elles (G. Field, communication orale, 2018). Certaines mosaïques sont alignées et d'autres anti-alignées entre elles. Il y aurait donc en fait un méta-niveau d'organisation entre certains types physiologiquement liés. Dans ce cas, les seules migrations tangentielles dues à des interactions entre molécule de contact ne suffiraient plus. Il semble en effet extrêmement complexe de mettre en place les nombreuses interactions homotypiques requises pour satisfaire ce niveau d'organisation supplémentaire avec de nombreuses combinaisons de mosaïques possibles.

En conclusion de cette première évaluation des mécanismes impliqués dans le développement des mosaïques rétinien, la mort cellulaire programmée semble avoir un rôle faible, restreint essentiellement au raffinement des mosaïques (**figure 16 A**). L'inhibition latérale constitue une forme de biais au niveau des progéniteurs neurogéniques ou des cellules post-mitotiques. Ce mécanisme a un rôle clé pour le maintien de l'équilibre entre les populations de RPC prolifératives et neurogéniques mais n'a pour l'instant pas de rôle direct démontré dans l'établissement des mosaïques des types. La migration tangentielle régulée par des molécules de contact a, elle, clairement un rôle important dans la formation de mosaïques régulières (**figure 16 B**). Comme décrit plus loin (II.3.5)), les différents types neuronaux expriment chacun un ensemble particulier de molécules d'adhésion impliqué dans la

formation de leur arborisation dendritique et de leurs connexions spécifiques. Il semble donc possible que ces molécules soient également impliquées dans la formation des mosaïques. Les modèles montrent que ces interactions et la migration tangentielle suffisent à établir des mosaïques régulières si elles sont indépendantes entre elles. Quels seraient les mécanismes supplémentaires si un niveau d'organisation méta-mosaïque existe ? De plus, les migrations tangentielles des cellules post-mitotiques couvrent une courte distance à l'échelle de la rétine et n'expliquent donc pas comment les différents types rétinien sont préalablement répartis de manière quasi uniforme à la surface de la rétine. En d'autres termes, comment la mosaïque rétinienne est-elle préétablie au cours de la rétino-génèse ?

Régénération imparfaite des mosaïques rétinien

Chez le poisson zèbre, la reformation de mosaïques dans des portions de rétines régénérées est sujette à des erreurs. La distance minimale entre les cellules diminue et certaines cellules se retrouvent accolées (Cameron & Carney 2000). Ces résultats pourraient indiquer que les migrations tangentielles sont incomplètes dans le tissu mature, ou bien que des phénomènes propres au développement conditionnent l'établissement de mosaïques régulières. Les mosaïques pourraient par exemple être préétablies par la dispersion tangentielle des RPC prolifératives. La mosaïque serait ensuite raffinée par une migration tangentielle limitée des neurones post-mitotiques. Ces deux mécanismes se complèteraient pour former une mosaïque régulière. Et dans le cas de la régénération, seules les migrations tangentielles seraient possibles alors que les RPC auraient une position fixe, d'où les erreurs dans la mosaïque régénérée.

Chez le cyprin doré (poisson rouge), la régénération des cônes et des interneurones de l'INL aboutit également à une mosaïque incorrecte. Cette régénération est différente entre le centre et la périphérie de la rétine. La régénération de la rétine centrale pourrait être médiée par la MG tandis que la CMZ serait responsable de la régénération en périphérie (Stenkamp et al. 2001). Toujours chez le poisson rouge, il a été suggéré que l'établissement de l'organisation mosaïque pourrait être contrôlé par une inhibition des spécifications identiques entre RPC voisines. Cette caractéristique serait présente dans les RPC régénératives mais moins précise qu'au cours du développement, ce qui expliquerait la régénération imparfaite des mosaïques (Tyler & Cameron 2007; Tyler et al. 2005).

Formation de mosaïques dans une population diminuée

Dans les lignées de souris mutantes *Brn3b*^{-/-} et *Atoh7*^{-/-}, 80 % et 95 %, respectivement, des RGC ne sont pas générées ou sont éliminées. Les cellules ganglionnaires survivantes continuent néanmoins à former une mosaïque partielle à la surface de la rétine. Ces mosaïques ne couvrent cependant plus toute la rétine et les cellules sont anormalement éloignées les unes des autres. Les RGC survivantes conservent également une arborisation dendritique correcte (Lin et al. 2004). La migration tangentielle et les interactions homotypiques entre cellules pourraient expliquer ce patron si ce mécanisme s'adaptait au nombre de cellules présentes. Néanmoins, les cellules sont si peu nombreuses qu'elles ne se touchent plus. On peut alors se demander quel signal autre que les interactions homotypiques permettrait d'induire la migration à des positions correctes. Si le préétablissement des mosaïques repose sur une dispersion et un mélange homogène des RPC, ce dernier mécanisme pourrait alors expliquer la formation de mosaïques dispersées dans ce contexte.

Préétablissement des mosaïques par des biais de lignage au cours du développement

On voit donc à travers les différentes possibilités examinées dans cette partie que le mécanisme d'établissement des mosaïques de types neuronaux rétiniens n'est pas complètement résolu. Une hypothèse alternative est que cette organisation serait déterminée non pas tardivement au niveau des neurones post-mitotiques, mais dès les stades précoces du développement rétinien. D'une part, la dispersion tangentielle des RPC précoces pourrait répartir uniformément les types neuronaux à la surface de la rétine tandis que les migrations tangentielles des cellules post-mitotiques permettraient d'établir la mosaïque rétinienne finale. D'autre part, des biais précoces dans les potentialités des progéniteurs à générer différents types neuronaux pourraient permettre de préparer la formation d'un niveau méta-mosaïque.

Il peut être intéressant ici de comparer le développement de la rétine à celui de la moelle épinière. Dans la moelle épinière, les différents types de neurones sont organisés selon l'axe dorso-ventral, les neurones moteurs se trouvant dans la partie ventrale tandis que les neurones sensitifs se trouvent dans la partie dorsale. Au contraire, les différents types de neurones rétiniens sont répartis de façon homogène sur toute la surface de la rétine.

À l'appui de notre hypothèse, un biais a été observé dans la distribution des cellules amacrines générées par différents blastomères chez le xénope (Huang & Moody 1995, 1997). Dans ces études, les blastomères du xénope contribuant à la future rétine ont été injectés individuellement avec du Texas Red Dextran, un traceur fluorescent. Les types de cellules générées ont ensuite été identifiés dans la rétine avec des marqueurs immunohistochimiques.

Il a ainsi été observé que les AC dopaminergiques, les AC à neuropeptide Y et trois types morphologiquement distincts d'AC sérotoninergiques sont issues préférentiellement de blastomères spécifiques, qui diffèrent en fonction des types considérés. La même équipe a reproduit ces expériences avec des marqueurs supplémentaires (Moody et al. 2000). Il en ressort que certains blastomères du xénope sont biaisés à produire des types particuliers de cellules amacrines tandis que d'autres blastomères sont multipotents.

Une autre étude a porté sur le lignage des 3 types d'HC du poulet. La rétine embryonnaire a été injectée avec deux rétrovirus fluorescents (un rouge, un vert) entre E1.5 et E5. La composition des clones de cellules générés a ensuite été analysée à E18. Les résultats obtenus montrent que les RPC génèrent des paires d'HC de même type par une division symétrique terminale pour les types H1 et H3. Dans cette étude, on observe donc un biais avec les RPC neurogéniques mais pas avec les RPC prolifératives, les RPC injectées à E1.5 produisant des combinaisons variées des trois types d'HC (Rompani & Cepko 2008).

Plus récemment, un biais dans le développement d'un type spécifique de RGC a été observé chez la souris (De la Huerta et al. 2012). Dans cet article, il a été démontré que les RPC *Cadherin6*⁺ produisait préférentiellement des RGC elles-mêmes *Cadherin6*⁺. Ces cellules ganglionnaires correspondent à un type précis de dsRGC.

En conclusion, pour des classes de neurones peu diverses comme les HC et les PR, il semblerait que le choix du type produit se fasse de façon indépendante et biaisée dans les RPC neurogéniques. Cependant, rien ne permet aujourd'hui de conclure fermement sur la détermination éventuellement biaisée ou purement terminale et indépendante des différents types d'AC, de RGC et de BC. Les expériences réalisées par l'équipe de S. Moody n'ont pas été reproduites dans d'autres vertébrés.

Dans une étude portant sur les cellules horizontales, l'organisation de la mosaïque de ces neurones a été comparée entre quatre lignées de souris différentes (pour rappel, les HC de la souris constituent un type unique). Le nombre d'HC varie du simple au double entre les différents fonds génétiques. L'indice de régularité des mosaïques d'HC de ces souris est inversement corrélé à leur densité, plutôt que constant comme attendu s'il était spécifié intrinsèquement. De même, la distance minimale est plus fortement anti-corrélée avec la densité qu'attendu. Ceci suggère qu'il n'y a pas une forte pression génétique pour la conservation des caractéristiques de la mosaïque des HC, seulement une règle d'exclusion entre ces cellules (Raven et al. 2005). Notons que les différences de nombre d'HC entre lignées de souris sont dues au moins partiellement à un polymorphisme du gène *Islet1*

(Whitney et al. 2011). Les différences entre une trentaine de lignées de souris ont été étudiées au niveau des types de neurones réiniens produits. Les variations observées pour chaque type sont largement indépendantes, même entre types physiologiquement connectés. Les variations de taille des populations des différents types sont tamponnées par des variations dans la morphologie de leurs arborisations dendritiques, en particulier dans l'OPL (Keeley et al. 2014). Ce résultat pose la question de la part de détermination génétique et de celle des effets liés à la plasticité neuronale dans le développement d'une rétine fonctionnelle. On pourrait imaginer qu'une diversité suffisante de types permettrait de tamponner les effets des variations alléliques sur le fonctionnement réinien.

Formation de régions spécialisées dans la rétine

Comme mentionné dans la partie I.2.6), certains types réiniens ne sont pas répartis de façon homogène dans la rétine. Chez le poulet, un gradient dorso-ventral d'acide rétinoïque (de fort à faible) est associé à la répartition hétérogène des bâtonnets. La présence d'acide rétinoïque (RA) est favorable à la spécification des bâtonnets (Viets et al. 2016). Chez la souris, des gradients de SHH et de RA ainsi que d'hormone T3 et de BMP sont associés à la répartition des cônes S et M selon un axe dorso-ventral. De plus, le gradient de RA change après la naissance : l'arrêt de l'expression d'une enzyme produisant du RA et d'une autre le dégradant aboutissent à une inversion du gradient (Viets et al. 2016).

Certains vertébrés possèdent également une zone de forte acuité telle que la fovéa chez les primates ou l'*area centralis* chez le poulet. Une dégradation locale de l'acide rétinoïque entraîne une expression de Fgf8 dans la rétine du poulet qui induit la formation de l'*area centralis*. Une injection d'acide rétinoïque dans l'œil de l'embryon abolit la formation de cette zone spécifique. Comme indiqué ci-dessus, l'acide rétinoïque est requis pour la spécification des bâtonnets chez le poulet. Or, l'*area centralis* est justement une zone dépourvue de ce type de photorécepteurs au profit des cônes (da Silva & Cepko 2017). L'acide rétinoïque aurait un rôle similaire dans la formation de la fovéa chez l'être humain.

II.3.5) Formation de l'arborisation dendritique et des connexions des neurones rétiniens

La formation des arborisations dendritiques et des connexions spécifiques entre neurones rétiniens est directement liée à l'établissement des mosaïques. En effet, cette étape de la différenciation des neurones repose également sur des interactions entre molécules de contact spécifiques au sein des et entre les types.

L'importance des molécules de contact a été démontrée dans l'espacement régulier entre les dendrites d'un même neurone pour certains types d'AC et de RGC dans l'IPL (Kise & Schmucker 2013). Le raffinement de la connectivité entre les différents types de neurones rétiniens a quant à lui été revu par (D'Orazi et al. 2014). Le raffinement de la connectivité de deux types de BC est par exemple dû à l'expression de cadhérines spécifiques de type II (*cdh8* et *cdh9*) (Duan et al. 2014). Des interactions homophiliques entre différents types de neurones basées sur les protocadhérines ont également été démontrées (Thu et al. 2014). Certains types de neurones peuvent ainsi être identifiés par les types spécifiques de protocadhérines qu'ils expriment. Un ensemble de neurones rétiniens expriment une cadhérine particulière, *celsr3*. Ces cellules correspondent aux cellules variqueuses chez le poisson zèbre (Lewis et al. 2015). *Pcdh22*, dans les SAC (un type de neurones rétiniens dont les arborisations dendritiques se chevauchent beaucoup), promeut à la fois l'auto-répulsion entre dendrites d'un même neurone et la jonction entre les cellules du même type (Kostadinov & Sanes 2015).

D'autres molécules de contact ont également des rôles similaires. *Dscam* a ainsi un rôle dans la stratification des AC dans des *laminae* spécifiques de l'IPL. Cette molécule contrôle aussi les connexions/répulsions spécifiques des types d'AC qui l'exprime (Li et al. 2015). *Sdk2* est exprimé dans les W3B-RGC et les VG3-AC, deux types de neurones rétiniens spécifiquement connectés impliqués dans la détection d'objets en mouvement (Krishnaswamy et al. 2015). On peut noter que les VG3-AC sont un des rares types d'amacrine excitatrices à glutamate. *Unc5c* et *FLRT2* sont exprimés par les SAC et les oodsRGC (cellules ganglionnaires ON-OFF spécifiques de la direction du mouvement). Ces molécules de contact permettent la connexion et la lamination spécifique de ces deux types spécialisés dans l'extraction d'information sur la direction du mouvement. D'autres molécules spécifiques d'autres types ont été identifiées dans les familles *Unc* et *FLRT* pour d'autres types neuronaux (Visser et al. 2015). Ces mêmes oodsRGC ont une arborisation dendritique à deux niveaux de stratification (cf. I.2.5)) occupant à la fois une *lamina* ON et une *lamina* OFF. Dans ces cellules, *Satb1* est requis pour la formation de la strate ON par des interactions homophiliques grâce à la Contactin 5 (*Cntn5*)

entre les RGC et les AC qui arborisent dans cette *lamina* spécifique. En absence de *Cntn5*, les oodsRGC arborisent toujours correctement dans la strate OFF (Peng et al. 2017).

Enfin, une étude a comparé l'importance de mécanismes intrinsèques correspondant à l'expression de déterminants moléculaires spécifique à celle des raffinements dus à l'activité physiologique. Il en ressort que la connexion entre BC et RGC est à la fois dépendante de l'activité de manière autonome cellulaire et indépendante de l'activité de façon non-autonome cellulaire. Des effets physiologiques non autonomes n'ont pas été observés (Okawa et al. 2014).

Supplément – Évolution et développement de la rétine

Les cnidaires sont des organismes contenant des structures simples spécialisées dans la perception de la lumière nommées rhopalia. Le développement de ces structures a été étudié chez le cubozoaire, une espèce de cnidaire. La spécification des rhopalia est associée à l'expression de *PaxB*, un homologue du gène *Pax6* des vertébrés (Piatigorsky & Kozmik 2004) qui est l'un des premiers facteurs de transcription activé dans la vésicule optique. Ce facteur reste exprimé tout au long de la rétino-génèse dans les progéniteurs et est indispensable à son bon déroulement.

L'ordre de naissance des classes de neurones rétinien reproduit partiellement l'apparition de ces cellules au cours de l'évolution. Les organismes possédant une forme rudimentaire de sensibilité à la lumière possèdent uniquement des cellules photosensibles accumulant des opsines. Or les cônes sont une des premières classes produites au cours de la rétino-génèse. Les organismes dotés de structures spécialisées dans la réception de la lumière possèdent des neurones relais qui transmettent l'information des cellules photosensibles vers d'autres neurones. Les RGC qui jouent un rôle analogue sont la première classe de cellules produites pendant la rétino-génèse. Les interneurones que sont les AC et les HC ont probablement une même origine évolutive régulant la transmission de l'information entre cellules photosensibles et neurones relais. Les BC constituent un relais entre les PR et les RGC et seraient apparues en conséquence plus tard dans l'évolution. Les bâtonnets constituent également un cas intéressant. Ils sont dérivés des cônes mais sont apparus tardivement. Ils expriment la rhodopsine et sont suffisamment divergents des cônes pour ne pas se connecter aux mêmes BC, mais à leur propre type de BC. Le signal qu'ils transmettent est réinjecté uniquement au niveau de l'IPL par les cellules amacrine AII. L'évolution aurait ainsi trouvé une solution simple pour ajouter un nouveau circuit sans induire une réorganisation des connexions entre de nombreux types neuronaux (Arendt 2003; Arendt et al. 2016; Nilsson 2013).

Certains auteurs proposent également que le développement du pallium dériverait d'une base commune avec celui plus ancien des systèmes sensitifs.

III] Approches de suivi du lignage des RPC

Le sujet de cette thèse porte sur le lignage des RPC. Une revue des différentes approches de suivi du lignage cellulaire utilisées dans la rétine à ce jour est présentée dans cette dernière partie de l'introduction. La stratégie de lignage *MAGIC markers* sera ensuite introduite en mettant en avant ses avantages.

III.1) Approches monocolores

Les approches d'analyse clonale classiques utilisées dans les articles présentés dans cette partie de l'introduction sont basées sur un marquage mono- ou éventuellement bicolore. Différentes approches ont ainsi été développées pour tracer le lignage des cellules progénitrices au cours du développement. Elles présentent différents avantages et inconvénients qu'il est important de considérer pour choisir le protocole le plus adapté à la question biologique posée.

Approches in vitro

La culture *in vitro* de RPC dissociées permet de suivre le destin d'un grand nombre de RPC individuelles à partir d'un faible nombre de rétines (Gomes et al. 2011). L'avantage de cette technique est de permettre de suivre le lignage des RPC au cours du temps ; son désavantage est qu'elle ne donne pas d'information sur le contexte *in vivo*. Il existe de fait un risque que le programme des cellules soit affecté par l'absence de signaux de l'environnement ou de cellules voisines.

Approches de transgénèse somatique

Chez le xénope, les blastomères peuvent être directement injectés avec une enzyme ou un traceur fluorescent. Cette approche fonctionne très bien chez le xénope pour étudier les grands clones générés par les blastomères (Holt et al. 1988; Huang & Moody 1995). Cependant, elle ne permet pas d'étudier les clones générés par des progéniteurs plus tardifs qui ont un volume plus petit et sont ainsi plus difficiles à injecter. De plus, cette approche ne peut pas être exportée chez le poulet ou la souris dont les blastomères sont difficilement accessibles sans interrompre définitivement le développement.

L'infection avec des virus capables de s'intégrer au génome est une technique ancienne mais toujours en vigueur aujourd'hui du fait de ses avantages. Les rétrovirus rétro-transcrivent l'ARN qu'ils contiennent avant de l'intégrer au génome de la cellule hôte et induisent ainsi un

marquage permanent (aux effets d'extinction de gène près). Le titre viral peut être adapté pour cibler de grandes populations de progéniteurs ou au contraire des progéniteurs individuels. Dans ce deuxième cas cependant, seules des rétines avec une densité de marquage monocolore très limitée peuvent être étudiées. Il est alors impossible de comparer des clones intriqués et d'étudier leurs interactions (Turner et al. 1990). C. Cepko a trouvé une solution partielle en injectant deux virus codant des rapporteurs fluorescents de couleurs différentes pour analyser plus de clones distincts dans une même rétine (Rompani & Cepko 2008).

Les RPC peuvent également être transfectées avec un transgène plasmidique introduit par électroporation. Cependant, ce genre de transfection affecte une population de RPC trop grande pour analyser le destin de RPC uniques avec une seule couleur. De plus, si le transgène utilisé n'est pas intégrable au génome, les plasmides transfectés sont perdus au cours des divisions (Doh et al. 2010).

Approches basées sur des lignées transgéniques

Des RPC marquées issues d'une lignée exprimant une protéine fluorescente (FP) peuvent être injectées dans un embryon WT. Cette approche offre une grande flexibilité. Une cellule unique exprimant une protéine fluorescente peut par exemple être injectée pour étudier le lignage de progéniteurs individuels. Cette cellule peut également porter une mutation pour observer son comportement dans un environnement WT. L'inverse peut également être réalisé, comme l'injection de cellules *Atoh7::GFP* dans le mutant *lakritz* (Poggi et al. 2005). Des protéines fluorescentes sous contrôle de promoteurs spécifiques peuvent également être utilisées, comme dans la lignée SoFa décrite dans la partie II) (Almeida et al. 2014). L'utilisation de cette technique sur une base clonale demande cependant l'étude de nombreux animaux dans la mesure où une ou, au mieux, quelques cellules sont injectées et analysées dans chaque rétine.

D'autres approches basées sur une recombinaison partielle par la Cre peuvent être utilisées pour diminuer la densité du marquage dans une lignée transgénique. Pour ce faire, on peut utiliser une CreER activée avec une faible dose de tamoxifène. On peut également utiliser une Cre activée par un promoteur inductible de type *heat shock* (Collins et al. 2010). Pour diminuer encore la densité de RPC marquées dans une telle lignée, l'équipe de W. Harris a utilisé cette stratégie pour induire l'expression d'une protéine photoactivable, Kaede. Cette protéine peut ensuite être activée dans un petit nombre de RPC qui sont suivies par vidéomicroscopie (He et al. 2012). Ce suivi du lignage de RPC individuelles *in vivo* n'est possible que sur un temps court à moins de photoactiver régulièrement les protéines

nouvellement produites dans les cellules. Une fois de plus, la densité de marquage permise par cette technique est limitée, et il est impossible de comparer des clones contigus et d'étudier leurs interactions.

En conclusion, les approches les plus couramment employées pour le suivi du lignage dans les tissus intacts ont en commun de reposer sur un transgène rapporteur. L'intégration de ce transgène au génome des cellules peut être obtenue par la génération de lignées transgéniques ainsi que par l'utilisation de vecteurs rétroviraux ou de transposons. Cette intégration est critique pour créer un marquage permanent, transmis à la descendance des cellules marquées. En raréfiant ce type de marquage, il est possible de tracer le lignage de RPC individuelles et de réaliser une analyse clonale rétrospective. Cependant, avec un marqueur monochrome, il est nécessaire d'avoir un marquage très éparé pour résoudre des clones sans ambiguïté (Cepko et al. 2000; Petit et al. 2005). Dans ce cas, une grande quantité d'échantillons biologiques sera nécessaire pour obtenir un pouvoir statistique suffisant pour les analyses (Pounds & Dyer 2008). De plus, la comparaison de clones intriqués et l'étude de leurs interactions sont impossibles.

III.2) Approches multicolores

De nouvelles approches de marquage multicolore ont émergé au cours de la dernière décennie avec la publication de la stratégie de marquage Brainbow (Lichtman et al. 2008; Livet et al. 2007). Le but de cette stratégie est d'augmenter considérablement la palette de couleurs exprimée dans les cellules marquées en exprimant de manière aléatoire et combinatoire plusieurs couleurs de marqueurs fluorescents. Des clones issus de progéniteurs uniques peuvent ainsi être identifiés même dans des régions densément marquées.

Des approches de marquage multicolores dérivées de la stratégie Brainbow sont utilisées de manière croissante pour distinguer la descendance de différents progéniteurs dans un même échantillon (Jefferis & Livet 2012; Roy et al. 2014; Weissman & Pan 2014). Ces approches ouvrent de nouvelles perspectives pour l'étude du développement (Dirian et al. 2014; Gupta & Poss 2012; Pan et al. 2013; Tabansky et al. 2013), de l'homéostasie (Ghigo et al. 2013; Rios et al. 2014; Roy et al. 2016; Snippert et al. 2010), de la régénération des tissus (Rinkevich et al. 2011), et de la tumorigenèse (Schepers et al. 2012). L'équipe a mis au point sa propre version avancée de marquage multicolore pour suivre le lignage dans le SNC : les *MAGIC Markers* (Loulier et al. 2014). Cette approche a permis de caractériser le lignage des

progéniteurs neuraux dans différentes zones du système nerveux central (Clavreul et al., *en révision* ; Ortiz-Álvarez et al., 2019 ; Tozer et al., 2017).

La stratégie Brainbow a aussi été transposée à la drosophile (Boulina et al. 2013; Nern et al. 2015) et au poisson zèbre (Nguyen & Currie 2018; Pan et al. 2011). Chez la souris et le poulet, les *MAGIC markers* fonctionnent également sans problème (Loulier et al. 2014). Une autre version de Brainbow a été développée chez la souris, utilisant trois protéines fluorescentes issues de différents organismes marins. Le signal de ces FP peut ainsi être augmenté par immunohistochimie sans réactivité croisée avec des fluorophores chimiques de longueur d'onde d'émission distincte (Cai et al. 2013). Dans un but similaire, une autre approche multicolore utilise des tags (CLIP etc.) révélés par immunohistochimie, et tire parti du système Tet-On pour amplifier l'expression des marqueurs fluorescents (Sakaguchi et al. 2018). On peut aussi citer une autre approche utilisant des transgènes Brainbow pour créer des mosaïques de déterminants moléculaires chez la souris (Pontes-Quero et al. 2017).

Une comparaison de différentes approches de traçage du lignage est revue dans (Blanpain & Simons 2013; Buckingham & Meilhac 2011; Livet et al. 2007). L'analyse quantitative des résultats de différentes approches de lignage est également revue par (Rulands & Simons 2016). Certaines revues sur le lignage portent spécifiquement sur la stratégie Brainbow (Richier & Salecker 2015; Roy et al. 2014; Weissman et al. 2011). Des approches multicolores concurrentes ont aussi été développées et seront comparées plus en détails dans la discussion.

Principe des MAGIC Markers

Les *MAGIC Markers* (Loulier et al. 2014) permettent de marquer individuellement des cellules progénitrices neurales avec des combinaisons de marqueurs fluorescents distincts et de suivre ainsi simultanément le lignage de plusieurs de ces cellules (Résultats, **figure 17**). On parle alors d'analyse clonale multiplexée. Cette stratégie combine la transposition d'ADN dans le génome des cellules progénitrices étudiées (Sato et al. 2007) avec la technique de marquage stochastique multicolore Brainbow (Livet et al. 2007). La première approche permet de marquer un ensemble de progéniteurs avec des transgènes transmis au cours des divisions cellulaires. La seconde permet à chaque cellule de se voir attribuer aléatoirement différentes couleurs ou combinaisons de couleurs basées sur des protéines fluorescentes, éventuellement adressées à différents compartiments cellulaires.

Les transgènes développés par (Loulier et al. 2014) pour générer un marquage clonal combinatoire utilisent les systèmes de transposition Tol2 (Kawakami 2007; Kawakami et al.

2004a,b; Sato et al. 2007; Yoshida et al. 2010) et PiggyBac (Loulrier et al. 2014; Macdonald et al. 2012). Basés sur le patron *Brainbow-1.1* (Livet et al. 2007), ces transgènes expriment par défaut une protéine fluorescente bleue adressée au noyau (H2B-EBFP2 (Ai et al. 2007)) permettant de visualiser les cellules transfectées en absence de recombinaison. Les transgènes sont porteurs de trois couples de sites *lox* substrats de la recombinaise Cre (*loxP*, *lox2272* et *loxN*) dits hétérospécifiques, ce qui signifie qu'ils recombinent de manière indépendante (Lee & Saito 1998; Livet et al. 2007). Les trois types de *lox* alternent sur le transgène *Brainbow*, de telle sorte que l'action de la recombinaise Cre peut aléatoirement aboutir à trois nouvelles configurations, conduisant chacune à l'expression d'une protéine fluorescente de couleur différente. Celle-ci peut être rouge (mRFP1, tdTomato, ou mCherry (Shaner et al. 2004), dénotée RFP dans cette thèse par simplification), jaune (mEYFP (Zacharias et al. 2002), dénotée YFP) ou cyan (mCerulean (Rizzo et al. 2004) ou mTurquoise2 (Goedhart et al. 2012), dénotée CFP). Ces couleurs sont ensuite respectivement codées en rouge, vert et bleu pour occuper tout l'espace RGB et maximiser le nombre de combinaisons discernables possibles. L'incompatibilité des trois types de sites *lox* et l'excision d'un membre de chaque paire lors de cette réaction empêche toute recombinaison supplémentaire du transgène. Les protéines fluorescentes exprimées ont des spectres d'excitation et d'émission suffisamment exclusifs pour ne pas être confondues en imagerie à fluorescence. Il existe différentes versions des *MAGIC Markers* dont les protéines fluorescentes sont adressées à des compartiments cellulaires spécifiques : noyau, membrane, mitochondrie ; pour augmenter encore la palette de combinaisons possible.

L'activation du marquage Brainbow par la recombinaise Cre permet ainsi de marquer de manière permanente des progéniteurs. L'ensemble des cellules qu'ils génèrent, ou clones, seront marquées avec diverses combinaisons de marqueurs colorés éventuellement adressés à différents compartiments cellulaires.

Plusieurs lignées d'animaux transgéniques exprimant des transgènes de type Brainbow sous contrôle d'un promoteur ubiquitaire ont été développées. Ces lignées (Confetti, Rainbow, IgfMosaics...) ont ouvert la voie à l'utilisation de cette approche pour suivre le lignage de cellules progénitrices durant le développement et le renouvellement de différents tissus. Un avantage de la stratégie Brainbow est de permettre de comparer les destinées de plusieurs cellules progénitrices dans un même animal. Un nombre élevé de clones peuvent être analysés facilement dans une quantité restreinte d'échantillons biologiques. Cette stratégie d'analyse clonale multicolore est idéale pour étudier l'équivalence des cellules souches d'un tissu. Une

lignée de poisson zèbre Brainbow a par exemple été utilisée pour montrer l'existence de deux types de progéniteurs pendant le développement du muscle cardiaque (Gupta & Poss 2012). D'autres lignées ont été utilisées pour étudier le développement et le renouvellement de tissus ou d'organes variés tel que l'épithélium intestinal, celui de la langue ou l'extrémité des doigts (Roy et al. 2014, 2016).

III.3) Approches liant lignage et transcriptomique

De nouvelles approches utilisant le *barcoding* par séquences d'acides nucléiques et de nouvelles technologies d'hybridation *in situ* sont apparues ces dernières années. Ces nouvelles méthodes permettent d'obtenir à la fois des informations sur le lignage et sur l'état transcriptomique ou épigénétique d'une cellule. Les nouveaux protocoles publiés seront comparés aux *MAGIC markers* dans la discussion.

Objectifs de la thèse

Cette thèse a eu deux objectifs principaux :

En premier lieu, j'ai cherché à approfondir les connaissances sur le développement des classes de neurones rétiniens. Les potentialités des RPC prolifératives ont déjà été étudiées en détail. On sait qu'elles sont pluripotentes et peuvent donc générer l'ensemble des six classes de cellules rétiniennes. On connaît aussi l'ordre de naissance de ces cellules. Le modèle de transition de compétence et la nature stochastique du choix terminal de la classe décrivent quant à eux la génération des différentes classes par les RPC neurogéniques. Cependant, plusieurs questions restent encore peu explorées. Existe-t-il une unité neurogénique typique produite par un progéniteur réalisant ses premières divisions asymétriques ? Si oui, quelles sont sa taille et sa composition ? Par ailleurs, comment a lieu la transition entre RPC prolifératives et neurogéniques ? Pendant combien de temps ont lieu des divisions générant des RPC neurogéniques en même temps que des divisions générant des cellules post-mitotiques ? Quelles sont les parts de division symétrique proliférative, asymétrique et symétrique terminale dans les RPC « neuroblastiques » et neurogéniques aboutissant à la génération des différentes classes rétiniennes ? Comment les RPC se dispersent-elles dans la rétine en développement ?

D'autre part, j'ai exploré le développement des types de neurones rétiniens. Celui-ci a été moins exploré que la genèse des classes. En particulier la genèse des classes riches en types variés comme les RGC et les AC et la répartition de ces différents types dans la rétine représentent un défi important pour la neurobiologie développementale. Je me suis focalisé sur les questions suivantes : existe-t-il un biais au niveau des RPC prolifératives dans la génération des différents types de neurones ? Comment ce biais pourrait-il faciliter la mise en place de la mosaïque des types ? S'il existe, quel est l'origine de ce biais ? La dispersion des RPC peut-elle avoir un rôle dans le préétablissement des mosaïques ?

Enfin un des objectifs secondaires mais récurrent de cette thèse a été de mettre en place différentes approches permettant de répondre aux questions mentionnées ci-dessus.

Matériel et méthodes

Clonage

Les transgènes *Tol2CAG::ER^{T2}CreER^{T2}*, *^{PB}Tis21∞RFP*, *^{PB}Tis21∞Cre*, *^{PB}Btg2∞Cre*, *^{PB}Atoh7∞Cre*, *^{PB}Atoh7∞RFP* et *^{PB}Atoh7::GFP* ont été sous-clonés par ligation T4 classique. Le choix des plasmides parents et des enzymes de restriction à utiliser est réalisé à l'aide du logiciel Serial Cloner (SerialBasics). Les plasmides parents (2 µg par plasmide) sont digérés pendant 1 h à 37°C avec les enzymes de restriction choisies (NEB). Cette étape est suivie par la déphosphorylation des extrémités du fragment vecteur, pour éviter sa re-circularisation, à l'aide d'une phosphatase (rSAP, NEB) selon le protocole du fabricant. Les fragments d'intérêt sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8% en tampon TAE (80 V) et purifiés avec le kit Gel Prep de Macherey Nagel. La conversion des éventuelles extrémités cohésives des fragments d'ADN purifiés en extrémités franches est effectuée à l'aide du fragment de Klenow de l'ADN polymérase I (NEB) selon le protocole du fabricant. Les fragments d'ADN sont ensuite purifiés avec le kit PCR clean up de Macherey Nagel, élués dans 20 µL d'eau et quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop, ThermoFisher scientific). La ligation de l'insert avec le vecteur est ensuite réalisée avec 200 U de Ligase T4 (NEB) en utilisant 50 ng de vecteur et un ratio molaire vecteur:insert de 1:3. Une ligation contrôle sans insert est réalisée en parallèle. 2 µL des produits de ligation sont ensuite transformés par choc thermique (45 s à 37°C) dans 20 µL de bactéries thermocompétentes XL2 (Agilent) pour le clonage. Ces bactéries sont cultivées 1 h dans 200 µL de milieu complet (SOC, Sigma), avant étalement sur boîte de Pétri sur un milieu Luria Broth agarose supplémenté avec 100 µg.mL⁻¹ d'ampicilline (ou 50 µg.mL⁻¹ de kanamycine). Une douzaine de colonies résistantes sont ensuite sélectionnées aléatoirement et cultivées 16 h dans 2 mL de milieu Luria Broth liquide additionné d'ampicilline (ou de kanamycine) pour extraire l'ADN plasmidique avec un kit de miniprep (Macherey Nagel). Après quantification au Nanodrop, 500 ng de l'ADN obtenu est utilisé pour vérification par digestion avec des enzymes de restriction (NEB), puis électrophorèse sur gel d'agarose. Si un clone présente le profil de digestion attendu pour l'intégration de l'insert dans la bonne orientation, une amplification de ce plasmide est alors réalisée à l'aide d'un kit de maxiprep (Macherey Nagel). La maxiprep est lancée à partir du reste de culture de la miniprep, remis en culture dans 200 mL de milieu Luria Broth supplémenté avec 100 µg.mL⁻¹ d'Ampicilline. La concentration des plasmides ainsi obtenus est mesurée au Nanodrop. Ils sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Les transgènes *Tol2Tis21::Cre*, *Tol2Btg2::Cre* et *Tol2Btg2::tdTomato* ont été sous-clonés avec la technique d'assemblage de Gibson. Le choix des plasmides parents et le design du

clonage sont effectués avec le logiciel Serial Cloner et le site compagnon du NEBuilder (nebuilder.neb.com, NEB). Le fragment du vecteur receveur est préparé par digestion enzymatique du plasmide parent correspondant, comme pour la ligation ci-dessus. Le ou les fragments à insérer sont amplifiés par PCR à partir des plasmides parents. La polymérase à haute-fidélité CloneAmp (Takara) est utilisée selon le protocole du fabricant pour l'amplification avec un thermocycleur UNO96 Gradient (VWR). Après comparaison, la CloneAmp offre à la fois un meilleur rendement et une plus grande fidélité que la Q5, la polymérase haute-fidélité de NEB. Dans le cas du promoteur du gène *Btg2*, la séquence a directement été amplifiée à partir d'ADN génomique d'embryon de poulet extrait avec un kit (Macherey Nagel). Le vecteur et les fragments insérés (un ou deux) sont ensuite assemblés grâce au NEBuilder (NEB) en suivant le protocole du fabricant. Une fois assemblé, le vecteur obtenu est utilisé pour transformer des bactéries selon le même protocole que dans la méthode précédente. Le produit de l'assemblage de Gibson est dilué cinq fois avant d'être utilisé pour transformer les bactéries. En effet, cette technique est habituellement très efficace et si la solution est utilisée pure, il y a un risque élevé d'obtenir un tapis de bactéries transformées. Comme pour le clonage par ligation classique, une douzaine de colonies sont sélectionnées pour effectuer des minipreps. L'ADN obtenu est ensuite utilisé pour réaliser des vérifications par digestion enzymatique et par séquençage de Sanger sur les régions insérées. Les plasmides corrects sont ensuite amplifiés par maxiprep et stockés à -20°C pour les électroporations.

Embryons de poulet

Pour les électroporations comme pour l'obtention d'embryons sauvages, des œufs fécondés de poules JA57 (SARL Morizeau) sont mis à incuber sur le côté dans un incubateur à 38°C avec un taux d'humidité maintenu entre 40 et 60%. Le stade de développement des embryons est déterminé en suivant la nomenclature de Hamburger et Hamilton (Hamburger & Hamilton 1951). Les embryons sont sacrifiés à différents stades par décapitation entre E4.5 et E20.5, au plus tard dans les dernières heures précédant l'éclosion.

Électroporation *in ovo*

Pour les électroporations, les œufs sont mis à incuber sur le côté 34 à 36 h afin d'atteindre le stade E1.5. Le jour de l'expérience, un trou d'1 mm de diamètre est réalisé dans la coquille afin d'aspirer 3 à 5 mL d'albumen, avant de découper une fenêtre d'environ 2 cm de diamètre dans l'œuf à l'aide de ciseaux à lames courbées. L'embryon de poulet est aussitôt humecté

avec quelques gouttes de PBS supplémenté avec 100 U.mL^{-1} de pénicilline et 100 U.mL^{-1} de streptomycine pour éviter sa déshydratation et conserver des conditions d'asepsie. Des embryons entre les stades HH9 et HH10, soit environ E1.5, sont choisis pour l'électroporation. Les plasmides d'intérêt sont mélangés dans une solution aqueuse colorée avec du Fast Green à 0.005% (Sigma). La solution est injectée dans la future vésicule optique (territoire présomptif de la rétine) en utilisant un capillaire de 1 mm de diamètre étiré (Phymep). L'électroporation est réalisée en plaçant deux électrodes plaquées or (Harvard Apparatus) espacées de 3 mm parallèlement de part et d'autre de la tête de l'embryon. Deux impulsions carrées de 15 V longues de 50 ms et espacées de 100 ms sont appliquées à l'aide d'un électroporateur BTX ECM 830 (Harvard Apparatus). Elles permettent de faire entrer l'ADN dans les cellules progénitrices situées contre la lumière du tube neural. Quelques gouttes de PBS supplémenté de pénicilline et streptomycine sont à nouveau ajoutées pour réhydrater l'embryon et diluer d'éventuels radicaux libres produits par l'impulsion électrique. La fenêtre est refermée hermétiquement à l'aide d'un scotch transparent sans solvant. Les embryons sont ensuite incubés à 38°C jusqu'au sacrifice entre E4.5 et E20.5.

Induction de la recombinaison par le 4-hydroxytamoxifène

Certaines expériences présentées dans cette thèse utilisent une Cre dont l'activité est induite par du tamoxifène. Une solution stock de 4-hydroxytamoxifène à 100 mM est réalisée à partir de 38,7 mg de poudre (Sigma H7904) diluée dans 1 mL d'éthanol absolu puis aliquotée (20 μL par tube) et stockée à -20°C . Le jour de l'injection, un ou plusieurs aliquots sont dilués au $1/200^{\text{ème}}$ dans du PBS préalablement chauffé à 37°C . L'injection dans les œufs de 100 μL de la suspension hydro-alcoolique de 4-hydroxytamoxifène concentré à 500 nM est réalisée immédiatement à l'aide d'une seringue équipée d'une aiguille de 30G. La solution est appliquée sur l'embryon en passant à travers le scotch scellant la fenêtre découpée pour l'électroporation. L'injection est réalisée entre les stades E4.5 et E6.5 en fonction des expériences.

Préparation des rétines marquées

Les embryons sont sacrifiés par décapitation à différents stades en fonction des expériences (voir coin supérieur droit des figures des résultats). A partir du stade E8.5, les embryons sont directement énucléés dans du PBS froid. L'œil électroporé (droit) est immédiatement fixé, après ablation de la cornée, dans une solution de paraformaldéhyde à 4% (Antigenfix, Diapath) pendant 3 h à 4°C . Avant ce stade, la tête est directement fixée en entier avec les

yeux intact durant 18 h à 4°C. L'œil (ou la tête) est ensuite rincé quatre fois dans du PBS froid puis conservé à 4°C. L'œil est micro-disséqué sous stéréomicroscope. Les tissus de soutien (sclère et choroïde), les tissus musculaires (muscles oculaires et corps ciliés) ainsi que le nerf optique sont retirés. Quatre incisions radiales de profondeur variable en fonction du stade sont réalisées dans la rétine neurale ainsi dégagée et encore attachée à l'épithélium pigmentaire rétinien.

Protocole d'immunohistochimie

Les rétines ainsi préparées peuvent alors éventuellement subir un protocole d'immunohistochimie pour révéler certains marqueurs spécifiques des cellules rétiniennes. Dans ce cas, une à quatre rétines sont disposées dans les puits d'une plaque 12 puits (VWR). La perméabilisation et le blocage sont réalisées durant 24 h (**Table 1**). La solution de perméabilisation est ensuite remplacée par la solution contenant l'anticorps primaire avec une dilution adaptée (**Table 2**). Les rétines sont incubées 72 h dans cette solution avec le ou les anticorps primaires. Elles sont ensuite rincées quatre fois sur une durée totale de 24 h avec une solution de PBS 1X, Triton X-100 0,5 %. Les rétines sont ensuite incubées 48 h dans la solution (**Table 2**) contenant les anticorps secondaires dilués à 2.5 µg.mL⁻¹ associés aux fluorophores Alexa 488 ou Alexa 647 (Jackson ImmunoResearch). Les rétines sont finalement rincées quatre fois 20 min dans une solution de PBS 1X, Tween 20 0.1%.

Composant	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (pour 12 mL)
Eau bidistillée			10,2 mL
PBS	10X	1X	1,2 mL
Sérum normal d'âne		5% (v/v)	600 µL
Triton X-100		0,5% (v/v)	60 µL

Table 1 - Solution de perméabilisation et blocage

Composant	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (pour 12 mL)
Eau bidistillée			7,8 mL
DMSO		20%	2,4 mL
PBS	10X	1X	1,2 mL
Triton X-100		0.5%	60 µL
Azide de sodium	10%	0.01%	12 µL
Sérum normal d'âne		5%	600 µL

Table 2 - Solution d'incubation des anticorps primaires et secondaires

Transparisation et montage

Avant le montage, les rétines, après IHC ou non, sont systématiquement transparisées. Pour ce faire, on utilise une version modifiée du RIMS et de SeeDB2 (Ke et al. 2016; Yang et al. 2014). Le milieu est préparé en dissolvant 28,1 g d'iohexol dans 21,9 g de tampon spécifique (**Table 3**). On obtient ainsi une concentration finale de 56,2% (w/w) en iohexol, correspondant à un indice de réfraction de 1,4 identique à celui de l'huile de silicone. Les rétines sont tout d'abord incubées dans une version diluée à 50% du RIMS pendant 2 h. Elles sont ensuite incubées durant une nuit dans du RIMS pur.

La rétine est ensuite transférée sur lame de verre, RGL vers le haut et RPE vers le bas. Quatre incisions supplémentaires sont réalisées pour obtenir 8 « pétales » afin de supprimer un maximum de forces de tension qui pourraient déformer la rétine montée à plat. Elle est montée dans du RIMS frais à l'intérieur d'un cadre réalisé à l'aide de scotch de laboratoire. Cet "espaceur" d'une épaisseur d'environ 140 μm permet d'éviter une trop grande compression du tissu. Une lamelle en verre carrée de 22 ou 24 mm de côté est utilisée pour couvrir et protéger la rétine. La préparation est enfin scellée avec du vernis et conservée à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à l'imagerie.

Composant	Concentration initiale	Concentration finale	Masse (pour 25 g de tampon)
Eau bidistillée			22 g
Tampon phosphate	10X	1X	2,5 g
Thiomersal	10 g.L ⁻¹	0.1 g.L ⁻¹	0,5 g (500 μL)

Table 3 - Tampon du milieu de montage transparisant (RIMS)

Cartographie par microscopie à épifluorescence

Les rétines électroporées et montées sont d'abord reconstruites intégralement en 2D au microscope à épifluorescence afin de repérer les régions intéressantes à imager en 3D. Pour ce faire, on utilise un microscope inversé Zeiss Axio Observer contrôlé avec le logiciel ZEN. Les images sont acquises avec un objectif 5X à air (Zeiss, NA = 0.16). Les images prises en mosaïques sont ensuite montées avec le logiciel ZEN. La manipulation des canaux et les éventuelles conversions sont réalisées avec FIJI.

Imagerie tridimensionnelle par microscopie confocale multicanale

L'imagerie confocale est effectuée sur un microscope Olympus FV1200 (Olympus), équipé de lasers à 440, 515 et 560 nm permettant d'exciter mTurquoise, EYFP et tdTomato,

respectivement. Les signaux des trois fluorophores, séparés par des filtres, sont collectés avec 3 détecteurs. Dans le souci d'optimiser le ratio entre qualité des images et temps d'acquisition, j'ai essentiellement utilisé deux objectifs en fonction des expériences présentées dans cette thèse. D'une part un objectif 20X classique à immersion dans huile minérale (Olympus, NA = 0,85) et d'autre part un objectif 40X à immersion dans l'huile de silicone (Olympus, NA = 1,25). J'avais préalablement comparé deux objectifs Olympus 40X, l'un classique à immersion dans l'huile minérale et celui que j'ai finalement choisi. L'immersion dans l'huile de silicone offre à la fois une plus grande distance de travail et une meilleure luminosité en profondeur dans les échantillons épais grâce à l'indice de réfraction plus faible du silicone. Des acquisitions mosaïques ont été réalisées pour reconstruire de grandes régions des rétines marquées. Le logiciel FluoView (Olympus) permet de contrôler la platine motorisée pendant les acquisitions automatisées pouvant s'étaler sur plusieurs heures à plusieurs jours.

Analyse et présentation des résultats

Le logiciel FIJI (Rueden et al. 2017; Schindelin et al. 2012) a été utilisé pour la manipulation des images (avec les plugins ilastik pour la conversion des fichiers et MorpholibJ (Legland et al. 2016) pour la manipulation des masques binaires). Imaris (Bitplane) a été utilisé pour la visualisation des images en 3D. ilastik (Haubold et al. 2016; Sommer et al. 2011) a été utilisé pour la segmentation des images en 3D. Photoshop CS4 (Adobe) a été utilisé pour le traitement final des images avant réalisation des figures. R (R Development Core Team 2019) a été utilisé pour l'analyse statistique et la modélisation des résultats ainsi que la réalisation des graphes (avec les packages spatstat pour l'analyse spatiale (Baddeley et al. 2015); stat pour l'analyse statistique et la modélisation; ggplot2 pour la réalisation des graphes (Wickham 2009). Inkscape a été utilisé pour la réalisation des schémas et des figures. Word (Microsoft) a été utilisé pour la rédaction du texte et la mise en page du manuscrit

Les images présentées dans les figures ont été modifiées comme suit. Les niveaux de gris de chaque canal des images ont été corrigés en jouant sur les valeurs minimales et maximales de la luminosité. Le gamma a aussi été régulièrement corrigé pour les images d'illustration mais jamais avant quantification. Cette correction n'a été réalisée que sur les images finales avec Photoshop sur tous les canaux en même temps pour éviter de déséquilibrer les combinaisons de couleurs obtenues avec les MAGIC markers.

Résultats

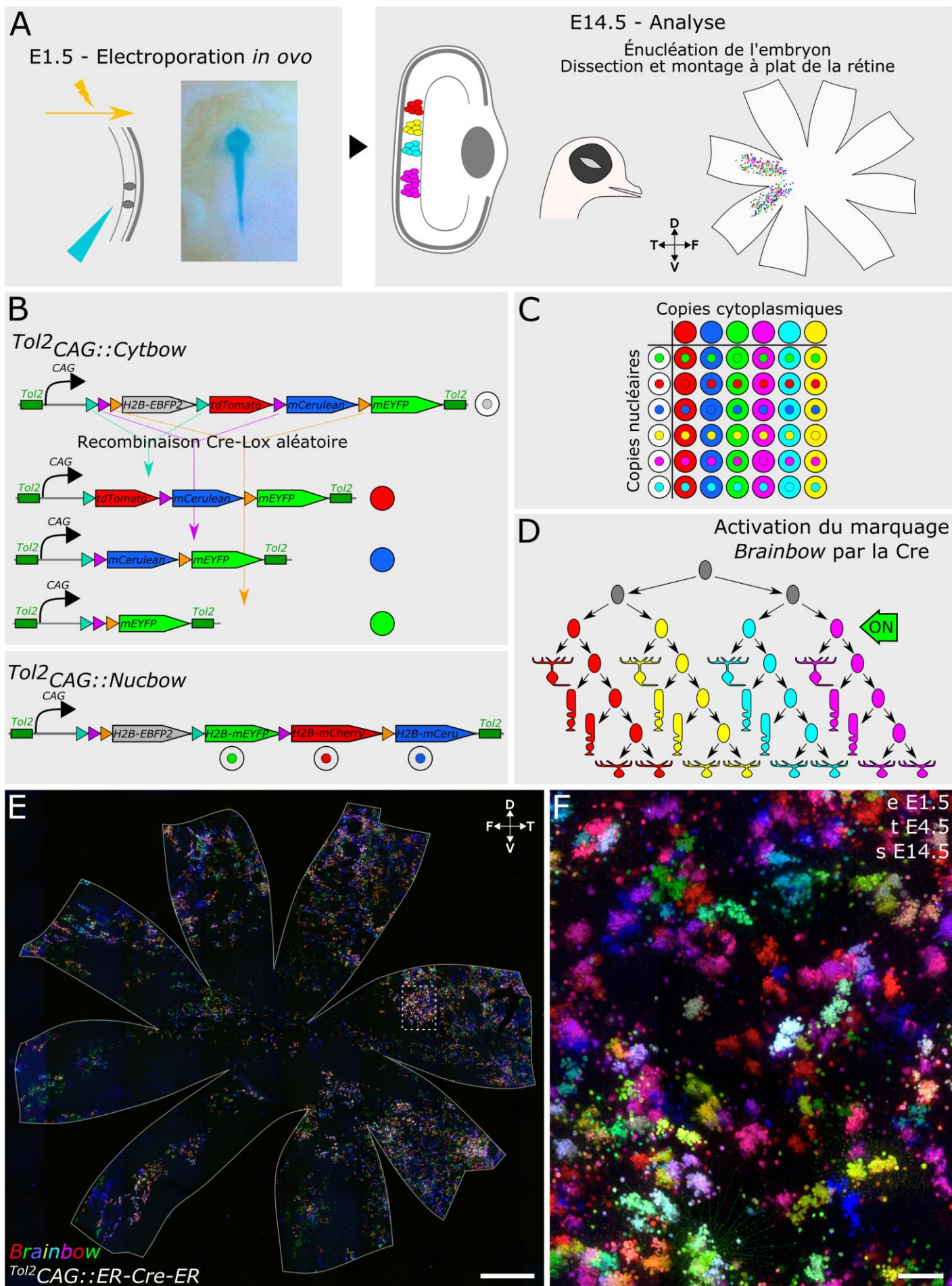


Figure 17 – Suivi du lignage cellulaire dans la rétine aviaire avec l'approche MAGIC Markers
(légende sur la page suivante)

I] Marquage de clones rétiniens chez l'embryon de poulet avec la stratégie *MAGIC Markers*

Pour étudier les liens potentiels entre lignage des RPC et génération des différentes classes et types neuronaux rétiniens, il est nécessaire de disposer d'une approche permettant d'identifier aisément des clones de neurones rétiniens issus de RPC individuelles marquées à des stades précoces. Les approches d'analyse clonale classiques utilisent une seule couleur de marqueur qu'il est nécessaire d'exprimer de manière très rare pour définir des clones (Cepko et al. 2000). Les approches de marquage multicolores dérivées de la stratégie Brainbow (Lichtman et al. 2008; Livet et al. 2007) permettent d'analyser la descendance de nombreux progéniteurs individuels même dans des régions densément marquées. Pour identifier des clones de neurones de manière aisée et fiable dans la rétine de poulet, j'ai mis en place une stratégie basée sur les transposons *MAGIC Markers* (Loulier et al. 2014) présentés dans la partie III.2) de l'introduction.

I.1) Principe de l'approche *MAGIC Markers* et application à la rétine aviaire embryonnaire

La stratégie *MAGIC Markers* (Loulier et al. 2014) permet de marquer individuellement des cellules progénitrices neurales avec des combinaisons de marqueurs fluorescents distincts et de suivre ainsi simultanément le lignage de plusieurs de ces cellules (analyse clonale multiplexée). Cette stratégie combine la transposition d'ADN dans le génome des cellules progénitrices étudiées (Sato et al. 2007) avec la technique de marquage stochastique

Figure 17 – Suivi du lignage cellulaire dans la rétine aviaire avec l'approche *MAGIC Markers*

A – Schéma expérimental mis en place, depuis l'électroporation jusqu'au sacrifice de l'embryon de poulet, pour étudier les clones générés par des RPC marquées avec des combinaisons de marqueurs fluorescents : les *MAGIC Markers*. B - Présentation des transgènes *Brainbow* intégrables au génome grâce au système de transposition *Tol2*, générant sous l'action de la recombinaise Cre un marquage multicolore stochastique cytoplasmique ($Tol2CAG::Cytbow$) ou nucléaire ($Tol2CAG::Nucbow$). C - Exemple non exhaustif de combinaisons de couleurs issues de la co-expression de 2 copies ou plus des transgènes *Cytbow* et *Nucbow*. D - Principe d'activation du marquage Brainbow avec la Cre à un point défini du lignage des RPC. E & F - Exemple d'une rétine au stade E14.5 co-électroporée à E1.5 avec les *MAGIC markers* ($Tol2CAG::Cytbow$ et $Tol2CAG::Nucbow$) ainsi que deux plasmides codant la transposase *Tol2* ($p^{CX}CAG::Tol2ase$) et une recombinaise Cre inducible ($Tol2CAG::ER^{T2}CreER^{T2}$). La recombinaison a été induite à E4.5 par ajout de 4-hydroxytamoxifène. E – Cartographie 2D des marqueurs multicolores sur une rétine entière au stade E14.5 par microscopie à épifluorescence. Les bords de la rétine sont soulignés en pointillés, la région agrandie en F est encadrée. F - Projection maximale sur toute l'épaisseur de la rétine d'une reconstruction 3D à haute résolution par microscopie confocale d'une région densément marquée. De nombreux groupes de cellules exprimant des combinaisons identiques de protéines fluorescentes sont visibles. (Barres d'échelle : E - 2 mm ; F - 100 μ m)

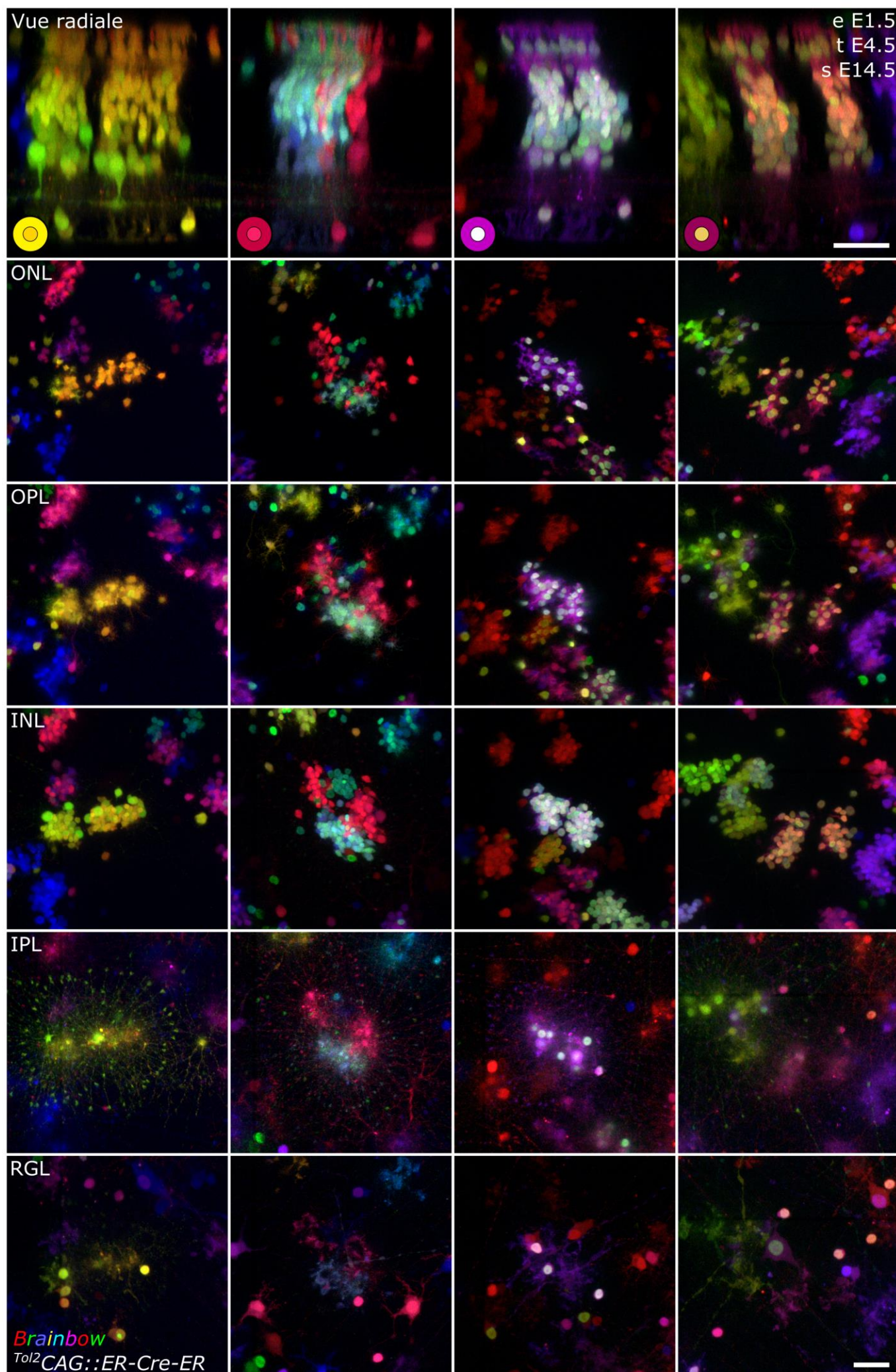


Figure 18 – Exemples de clones rétiniens identifiés par les *MAGIC markers* (légende sur la page suivante)

multicolore Brainbow (Livet et al. 2007). La première approche permet de marquer un ensemble de progéniteurs avec des transgènes transmis au cours des divisions cellulaires. La seconde permet à chaque cellule de se voir attribuer aléatoirement différentes couleurs ou combinaisons de couleurs basées sur des protéines fluorescentes, éventuellement adressées à différents compartiments cellulaires.

Les *MAGIC Markers* sont employés de la manière suivante pour le suivi des cellules générées par les RPC aviaires. À E1.5, pendant l'évagination de la vésicule optique, une solution de plasmides permettant de déclencher le marquage Brainbow dans les RPC est injectée dans la partie antérieure du tube neural de l'embryon (**figure 17 A**). Les plasmides sont ensuite électroporés dans le neuroépithélium au niveau du territoire présomptif de la rétine droite par une série de chocs électriques. À E14.5, afin d'étudier les clones générés par les RPC électroporées, les embryons sont sacrifiés par décapitation. L'œil est prélevé et fixé. La rétine peut ensuite être disséquée puis montée à plat avant d'imager les clones marqués avec un microscope à fluorescence.

Les transgènes développés par (Loulier et al. 2014) sont utilisés pour générer le marquage clonal combinatoire (**figure 17 B**). La version Tol2 des *MAGIC Markers* a été choisie pour les électroporations chez le poulet. Les transposons sont électroporés avec un plasmide codant la transposase du même nom, ou *Tol2ase*, qui permet une intégration stable des transgènes au génome (Kawakami 2007; Kawakami et al. 2004a,b; Sato et al. 2007). La RFP, la YFP et la CFP sont ensuite respectivement codées en rouge, vert et bleu pour occuper tout l'espace RGB et maximiser le nombre de combinaisons discernables possibles. Les protéines fluorescentes exprimées ont des spectres d'excitation et d'émission suffisamment exclusifs pour ne pas être confondues en imagerie à fluorescence. Les versions cytoplasmiques et nucléaires des *MAGIC Markers* (*Cytbow* et *Nucbow*) ont été utilisées dans ce travail pour augmenter la palette de combinaisons possibles (**figure 17 B & C**).

L'activation du marquage Brainbow par la recombinaison Cre permet ainsi de marquer de

Figure 18 – Exemples de clones rétiens identifiés par les *MAGIC markers*

Ces exemples de clones sont issus de la région E de la figure 1 (rétine prélevée au stade E14.5). La première rangée d'images montre des projections maximales des clones en vue radiale obtenues après rééchantillonnage des données confocales ; les rangées suivantes montrent des vues en face des différentes couches rétiennes, correspondant à des projections maximales d'épaisseur limitée. Les groupes de cellules exprimant une même combinaison de marqueurs cytoplasmiques et nucléaires (des exemples sont indiqués par des disques colorés) sont interprétés comme des clones issus d'une même RPC, constitués d'une ou quelques colonnes. NB : les variations de marquage apparentes entre cellules d'une même colonne peuvent être dues à la localisation des protéines fluorescentes (nucléaire ou cytoplasmique) et à des effets épigénétiques.

(Barres d'échelle : 25 µm)

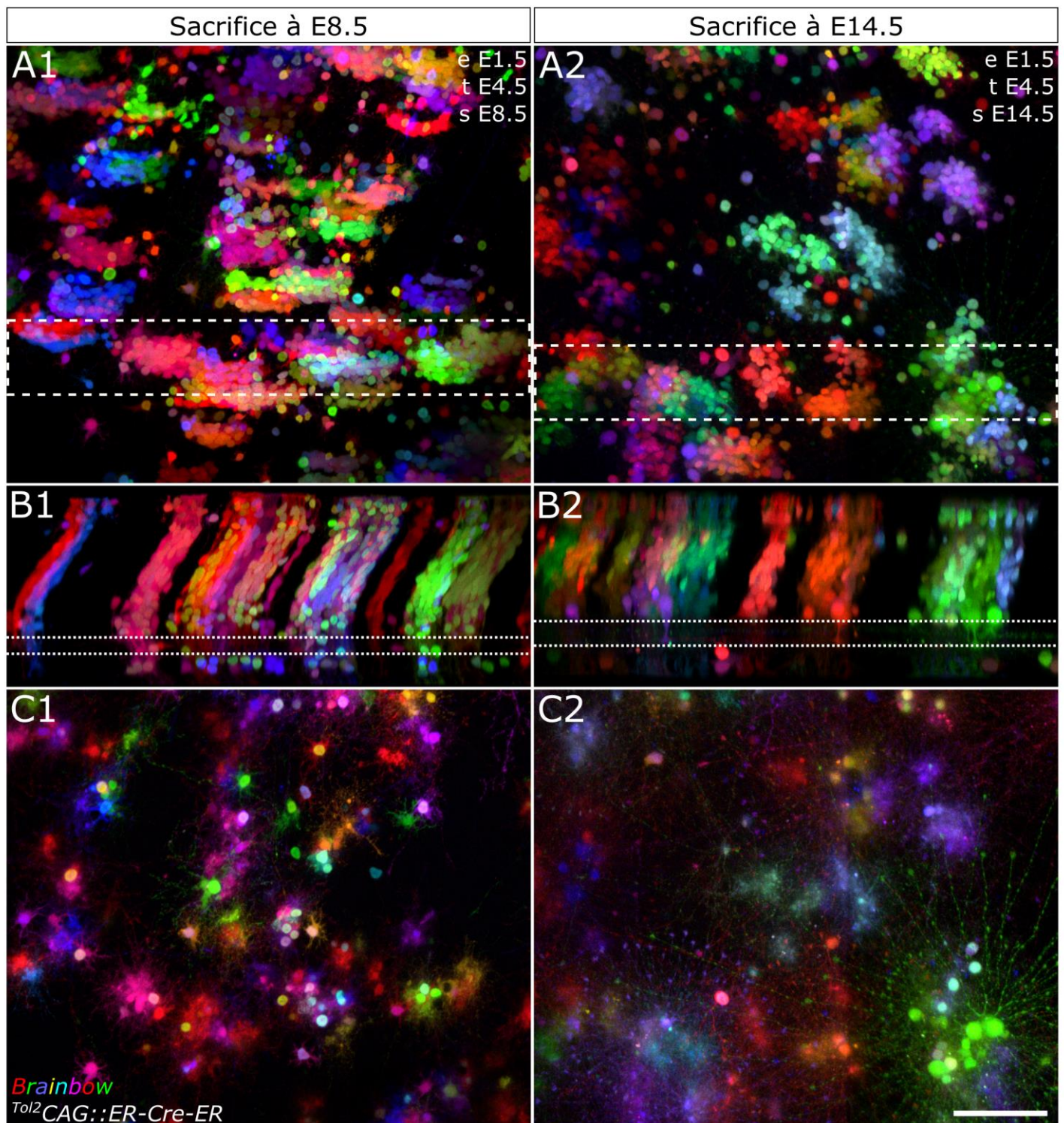


Figure 19 – Morphologie de la rétine aviaire à différents stades

A - Vues en face correspondant à une projection maximale couvrant toutes les couches de rétines à E8.5 (A1) et à E14.5 (A2). B - Vues radiales, obtenues par ré-échantillonnage et projection maximale des régions encadrées en A. C - Vues en face de l'IPL obtenues par projection maximale sur l'épaisseur délimitée par des pointillés en B. NB : la rétine au stade E8.5 est montée dans du Vectashield et a subi un rétrécissement de l'ordre de 20%, tandis que celle à E14.5, montée dans du RIMS, s'est agrandie.
(Barre d'échelle : 50 μ m)

manière permanente les RPC. Ainsi, l'ensemble des cellules qu'elles génèrent, ou clone, sera marquée avec une combinaison unique de marqueurs colorés cytoplasmiques et nucléaires (**figure 17 D**).

Les rétines électroporées sont reconstruites par microscopie à épifluorescence avec un faible grossissement (objectif 5X, NA = 0.16) pour localiser les régions intéressantes (**figure 17 E**). Ces régions sont ensuite reconstruites à forte résolution en 3D par microscopie confocale (**figure 17 F**).

Les clones marqués avec cette approche sont composés d'un nombre variable de colonnes de cellules espacées les unes des autres. On peut visualiser le territoire occupé par les clones à la surface rétinienne sur les vues tangentielles (x, y), et les colonnes en vue radiale (x, z). Le marquage Brainbow permet d'identifier les différentes couches de la rétine et révèle la morphologie des cellules (**figure 18**). On peut voir parfois des variations chromatiques limitées entre les cellules d'un même clone, en particulier ceux exprimant les combinaisons de marqueurs les plus complexes. Ces nuances peuvent être dues à des ratio volumiques cytoplasme/noyau différents dans un même clone. Elles peuvent également être liées à des effets épigénétiques modulant l'expression des transgènes, typiquement entre les classes comportant de nombreux types (RGC, AC) et les autres classes de cellules. Cet effet peut aussi être un artefact dû à une mauvaise détection de certaines protéines en profondeur, en particulier la CFP qui a la plus courte longueur d'onde d'émission. On verra plus loin que ce dernier problème peut être éliminé grâce à la transparisation. Malgré tout, la structure colonnaire très stéréotypée des clones rétiens facilite l'identification des cellules appartenant à un même clone.

I.2) Suivi du développement de la rétine aviaire avec les *MAGIC Markers* et choix des stades étudiés

Le but de ce projet étant d'étudier le développement des différentes classes et types de neurones dans la rétine aviaire, il est nécessaire d'atteindre un stade suffisamment mature pour identifier ces catégories. Cependant, plus le stade étudié est tardif, moins le taux de survie des embryons électroporés est élevé. Il faut donc trouver un bon compromis entre obtention d'échantillons biologiques et faisabilité des analyses.

Ainsi, les stades E6.5 et E8.5 (5 et 7 jours post-électroporation, respectivement) constituent des stades intéressants pour tester rapidement de nouveaux transgènes. On peut de plus

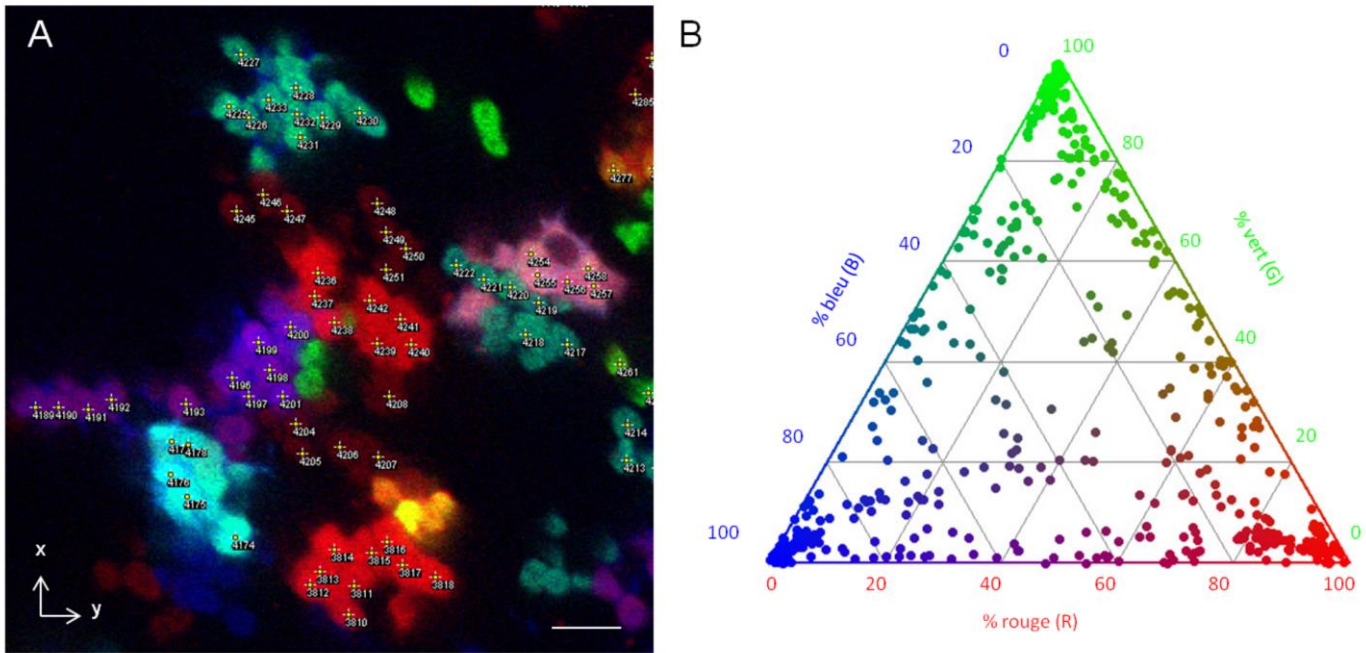


Figure 20 – Critères de définition des clones rétiens avec la stratégie MAGIC Markers

A - Coupe optique au niveau des BC d'une portion de rétine à E12.5 marquée avec les versions cytoplasmique et nucléaire des *MAGIC markers*. Les noyaux des cellules de plus de 500 clones de plus de 4 cellules ont été pointées manuellement pour mesurer les valeurs d'intensité des trois canaux RGB. B - Diagramme ternaire présentant les proportions moyennes des trois canaux mesurés pour chaque clone. En prenant comme critère de discrimination une séparation de 3% dans les 3 canaux RGB (sur le modèle de (Loulrier *et al.*, 2014)), la probabilité de confondre deux clones de couleur complexe (c'est à dire issue de la co-expression d'au moins 3 protéines fluorescentes) est d'environ 1/100. En considérant que localement un clone a au plus 6 voisins marqués, la probabilité de confondre un clone de couleur complexe avec un de ses voisins est de $1/100 \cdot 6 = 6/100$. Cette probabilité décroît fortement dans des conditions de marquage plus éparées et en combinant les transgènes *Cytbow* et *Nucbow*, comme c'est le cas dans cette étude.

identifier certaines classes de neurones rétiniens dès E8.5. En particulier, les RGC et les PR sont déjà nés et partiellement différenciés à ce stade. La RGL commence à se détacher de l'INL et on reconnaît la morphologie particulière des PR (**figure 19**, colonne 1). Au niveau de l'ILM, les axones des RGC en croissance sont observables dès E6.5.

Le stade E14.5 est en revanche apparu comme le meilleur compromis pour étudier les types rétiniens (**figure 19**, colonne 2). À ce stade, la genèse de toutes les classes de neurones rétiniens est achevée (Introduction, **figure 12 A1**) (Prada et al. 1991), et ils sont d'avantage différenciés. On voit par exemple les arborisations dendritiques caractéristiques de certaines RGC et AC dans l'IPL, contrairement à E8.5, où elles commencent seulement à former des protrusions (**figure 19 C**). Cependant, à E14.5, des structures ressemblant à des cônes de croissances sont encore visibles à l'extrémité des dendrites présentes dans l'IPL, ce qui semble indiquer que leur croissance n'est pas terminée. À ce stade, toutes les cellules rétinienne sont donc nées et en voie de différenciation, mais elles ne sont pas encore toutes matures (Introduction, **figure 12 A2**) (Doh et al. 2010).

I.3) Définition de clones rétiniens par l'approche *MAGIC Markers*

La stratégie *MAGIC Markers* permet de subdiviser un patron global de marquage avec différentes combinaisons de protéines fluorescentes qui révèlent les frontières entre les clones. Cependant, il est possible que deux clones voisins adoptent une même couleur et soient considérés de manière erronée comme un clone unique. Il est donc important d'établir un critère de sélection de la couleur des clones qui minimise le risque de confondre deux clones (ou plus). Les combinaisons aléatoires de *MAGIC Markers* résultent en un grand nombre de nuances possibles en fonction du niveau d'expression des différentes copies intégrées au génome. Comment analyser ces marqueurs et évaluer la probabilité qu'ils identifient correctement des clones ?

I.3.1) Analyse simplifiée des combinaisons de couleurs

Une première stratégie (simplificatrice) d'analyse des *MAGIC Markers* est de considérer seulement la présence ou l'absence de chacune des trois protéines fluorescentes résultant de la recombinaison des transgènes *Brainbow*, sans se préoccuper de leur niveau d'expression. Le calcul réalisé sur cette base constitue une surestimation du risque de confusion des clones. Dans les faits, la probabilité de confusion réelle sera encore plus faible que celle calculée sans prendre en compte les nuances de couleurs possibles.

La rétine étant organisée en colonnes de cellules ontogéniquement liées, on peut simplifier l'analyse en considérant une surface en 2D correspondant soit à une projection maximale de la rétine vue en face sur toute son épaisseur, soit à une section des colonnes. Le problème de l'analyse clonale est ainsi considérablement facilité par rapport au cortex par exemple où on doit considérer la dispersion des clones dans un espace en 3D.

Définissons maintenant une unité de surface de la rétine comme une colonne ontogénique entourée au plus par six autres colonnes. Au maximum, chaque unité de surface peut ainsi être occupée au plus par sept clones juxtaposés. On peut définir une première probabilité p_M qu'une colonne soit marquée, $(1-p_M)$ étant la probabilité qu'elle ne soit pas marquée. Or, comme on peut le constater sur toutes les rétines électroporées avec les *MAGIC Markers* présentées dans cette thèse, le marquage Brainbow ne couvre jamais à 100% une région de la rétine, au-delà de la taille d'une colonne. Si on considère qu'au maximum 50 % d'une surface unitaire est recouverte par des clones, on a au plus :

$$p_M = 0,5$$

(Pour les rétines où le marquage est moins dense, la probabilité de confusion sera encore plus faible que celle calculée ici.)

On définit trois événements : $(R = 1)$, $(G = 1)$ et $(B = 1)$ comme le fait pour un clone d'être rouge, vert ou bleu ; et $(R = 0)$, $(G = 0)$ et $(B = 0)$ le fait de ne pas posséder l'une ou l'autre couleur. L'expression de combinaisons de marqueurs issus de plusieurs copies distinctes des transgènes Brainbow représente l'intersection de plusieurs événements indépendants. Pour simplifier, on peut écrire $(RGB = (i, j, k))$, i , j , et k étant des valeurs booléennes dans cette première démonstration.

Soit p_C la probabilité de confondre deux clones comme un seul. On a :

$$p_C = p_M \cdot p((RGB = i, j, k))^2$$

Toutes les combinaisons de couleurs possibles ne sont pas équiprobables. Afin d'estimer la probabilité des différentes combinaisons de marqueurs, on peut mesurer la fréquence des différentes couleurs dans les clones sur une région densément marquée (**figure 20**). Des rétines électroporées avec $^{Tol2}CAG::ER^{T2}CreER^{T2}$ et les *MAGIC Markers* dans lesquelles le marquage a été induit à E4.5 par injection de Tamoxifène ont été utilisées pour cette analyse. Elles présentent de très nombreux petits clones qui permettent d'augmenter le nombre de combinaisons de couleur différentes observées sur des surfaces réduites. On considère que la région analysée est représentative de la palette de couleurs possibles avec une recombinaison précoce des *MAGIC Markers* par une Cre constitutive. Cette quantification a été réalisée en pointant le centre des BC de tous les clones d'une région au milieu de l'INL (**figure 20 A**). On

représente ensuite pour chaque point les proportions des trois marqueurs RGB sous forme d'un diagramme ternaire (**figure 20 B**).

On peut calculer les probabilités d'avoir une, deux ou trois couleurs définies en mesurant la densité des clones dans les différentes régions du diagramme. On peut notamment voir que de nombreux clones exprimant une seule couleur de protéine fluorescente occupent les pointes du diagramme ternaire. On élimine donc ces clones présentant une seule couleur comme ayant une p_C trop élevée. Seuls les clones présentant au moins deux couleurs différentes ont été analysés dans la suite de ce travail.

I.3.2) Approche quantitative fine

Pour réaliser une analyse plus précise des *MAGIC Markers*, on peut travailler directement sur l'espace RGB. On peut alors définir deux probabilités : p_D la probabilité de pouvoir discerner les combinaisons de couleurs de deux clones distincts, et p_C la probabilité de confondre deux clones en un seul.

Chaque couleur R, G ou B, peut prendre la valeur i, j ou k, respectivement, dans l'espace RGB. i, j et k sont ici les valeurs d'intensité de chaque pixel. Ces valeurs peuvent être comprises entre 0 et 4095 pour une image tricolore en 12 bits de niveaux de gris par exemple. Les valeurs prises par R, G et B étant indépendantes (car déterminées par l'activité de transgènes distincts), on peut écrire :

$$(R = i) \cap (G = j) \cap (B = k) = (RGB = (i, j, k))$$

Pour connaître la valeur p_D , on intègre l'espace compris entre les valeurs minimales et maximales prises par R, G et B dans un clone défini comme tel par l'œil humain. Cette probabilité sera aussi très utile pour reconnaître automatiquement des clones avec une approche basée sur du *machine learning*.

On cherche la probabilité que $p(RGB = (i,j,k))$ sachant que $(RGB = (i,j,k))$. Ces deux événements sont indépendants, la combinaison de couleurs d'un RPC est analogue au résultat d'un tirage aléatoire avec remise. On a alors :

$$p_C = p_M \cdot p(RGB = (i,j,k)/RGB = (i,j,k))$$

$$p_C = p_M \cdot p(RGB = (i,j,k) \cap RGB = (i,j,k))$$

$$p_C = p_M \cdot p(RGB = (i,j,k))^2$$

Cette méthode est plus précise car elle prend en compte les nuances de couleur possibles (p_D). Néanmoins, elle sous-estime encore les combinaisons possibles car elle ne prend pas en compte les couleurs du noyau et du cytoplasme.

II] Le développement des classes de neurones rétiniens

Un des buts initiaux de ma thèse était d'approfondir les connaissances sur le développement des différentes classes de neurones rétiniens à l'aide de l'approche de traçage multicolore du lignage. Le développement des classes a déjà été décrit très en détail (voir Introduction II.3)) avec des approches monochromes. On sait ainsi que les RPC prolifératives peuvent générer toutes les classes de neurones rétiniens, tandis que les RPC neurogéniques génèrent typiquement une paire ou quelques cellules appartenant à une ou quelques classes déterminées. Le modèle actuellement admis propose un mécanisme de choix stochastique restreint qui évolue au cours du temps entre différents destins possibles en fonction des déterminants moléculaires agissant sur les RPC. L'articulation entre RPC prolifératives et neurogéniques reste cependant obscure chez les vertébrés, et on ne dispose pas encore d'une séquence détaillée de génération des neurones rétiniens depuis les RPC prolifératives.

II.1) Tentative de restriction temporelle du marquage Brainbow dans les RPC neurogéniques

Le but de ces premières expériences était de déterminer s'il existe une transition claire entre phase proliférative et phase neurogénique dans la rétine aviaire. Je souhaitais pouvoir isoler des colonnes de cellules générées par une RPC neurogénique "typique", à partir de sa première division asymétrique. Il semble néanmoins que les RPC prolifératives dont les déterminants transcriptionnels varient progressivement au cours du temps génèrent régulièrement des RPC neurogéniques qui vont réaliser seulement une ou quelques divisions asymétriques ou symétrique terminale pour donner des cellules post-mitotiques. Il serait donc complexe d'isoler un "clone neurogénique typique", car des divisions symétriques et asymétriques ont lieu en même temps à partir de différentes populations de RPC pendant plusieurs jours durant la rétinogénèse.

Pour obtenir la restriction temporelle de l'activation des *MAGIC Markers*, j'ai développé une approche basée sur une recombinaise Cre inducible. La $ER^{T2}CreER^{T2}$ (Felker et al. 2016; Matsuda & Cepko 2007) porte deux récepteurs aux œstrogènes qui empêchent la translocation de Cre dans le noyau et donc la recombinaison des sites *lox*. En présence de 4-hydroxytamoxifène (4-OH-TX), un composé synthétique dérivé des œstrogènes, la Cre est libérée, pénètre dans le noyau et y effectue la recombinaison. Le gène codant cette recombinaise a été cloné sous contrôle du promoteur à spectre large *CAG* (Niwa et al. 1991) dans un vecteur porteur des séquences de transposition *Tol2* afin de permettre son intégration

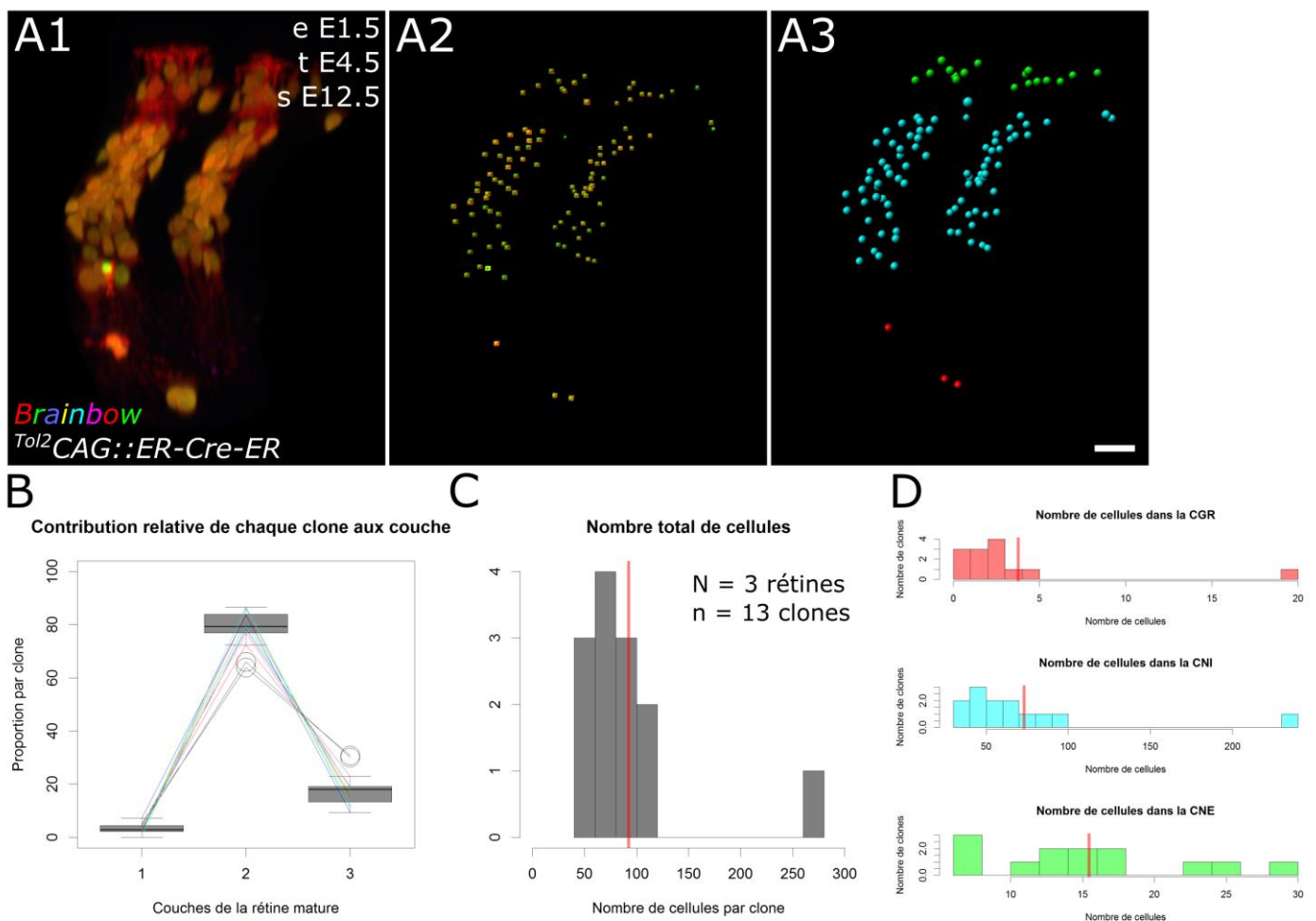


Figure 21 – Analyse de l'organisation radiale des colonnes de cellules composant les clones rétiniens

A - Vue en 3D d'un clone identifié avec les *MAGIC Markers*, formé de deux colonnes de cellules et étapes du comptage semi-automatique des cellules composant ces colonnes. A1 - Marquage Brainbow. A2 - Cellules pointées de manière semi-automatique avec le logiciel Imaris. A3 - Attribution des cellules pointées aux trois couches de la rétine. B - Boxplots de la répartition des cellules de 13 clones issus de 3 rétines dans les trois couches de la rétine. Des lignes relient les points correspondant à chaque clone. C - Histogramme de la distribution du nombre total de cellules dans ces clones. D - Histogrammes de la distribution du nombre de cellules des clones présentes dans chaque couche. Le trait rouge en C et D indique la moyenne. (Barre d'échelle : 15 μ m)

stable au génome. Le plasmide résultant ($Tol2CAG::ER^{T2}CreER^{T2}$) est co-électroporé avec les transposons $Tol2CAG::Cytbow$, $Tol2CAG::Nucbow$ et la *Tol2ase* à E1.5, comme dans l'approche *MAGIC Markers* classique. On peut ensuite choisir différents stades d'injection du 4-hydroxytamoxifène pour activer le marquage combinatoire. Notons que nous utilisons ici du tamoxifène hydroxylé, déjà sous sa forme active. La version non hydroxylée du tamoxifène peut être utilisée chez l'adulte où elle sera d'abord transformée dans le foie.

J'ai tout d'abord testé la $Tol2CAG::ER^{T2}CreER^{T2}$ en absence de 4-OH-TX chez l'embryon de poulet électroporé. Aucune recombinaison de fuite n'a été constatée dans la rétine, en accord avec les résultats publiés par les concepteurs de cette Cre inducible (Matsuda & Cepko 2007).

Plusieurs exemples de clones obtenus après électroporation de $Tol2CAG::ER^{T2}CreER^{T2}$ avec les *MAGIC Markers* et injection de 4-OH-TX à E4.5 sont visibles dans les figures 17 à 20. La composition des clones obtenus dans cette condition a été analysée (**figure 21**). Après électroporation, dissection et montage à plat, les rétines sont imagées au microscope confocal. Les images en 3D obtenues sont ensuite assemblées dans le cas d'acquisitions en mode mosaïque. Les clones sont caractérisés avec le logiciel d'analyse en 3D Imaris (**figure 21 A**). Les cellules constituant chaque clone sont segmentées et les données sont corrigées à la main (**figure 21 A**, au milieu). Les cellules peuvent ainsi être attribuées aux trois couches de la rétine en fonction de leur position en profondeur (**figure 21 A**, à droite). La proportion de cellules dans chaque couche est représentée pour chaque clone sous forme de boxplot (**figure 21 B**) et sous forme d'histogrammes (**figure 21 C & D**). On peut voir que les RPC marquées à E4.5 peuvent participer à la formation de toutes les couches de la rétine. Ces résultats confirment la littérature, selon laquelle on a encore à ce stade des RPC prolifératives qui génèrent des RPC neurogéniques capables de produire à leur tour les différentes classes de cellules rétinienne. De façon intéressante, on verra plus loin que les RPC à E4.5 produisent peu de RGC, ces cellules étant, en grande partie, déjà nées avant.

II.2) Tentative de restriction transcriptionnelle du marquage Brainbow aux RPC neurogéniques

Le développement de la rétine se déroule dans le temps mais aussi dans l'espace. Les différentes régions ne se développent pas toutes à la même vitesse. Le développement suit un gradient centro-périphérique, les cellules situées à la périphérie étant les dernières à être

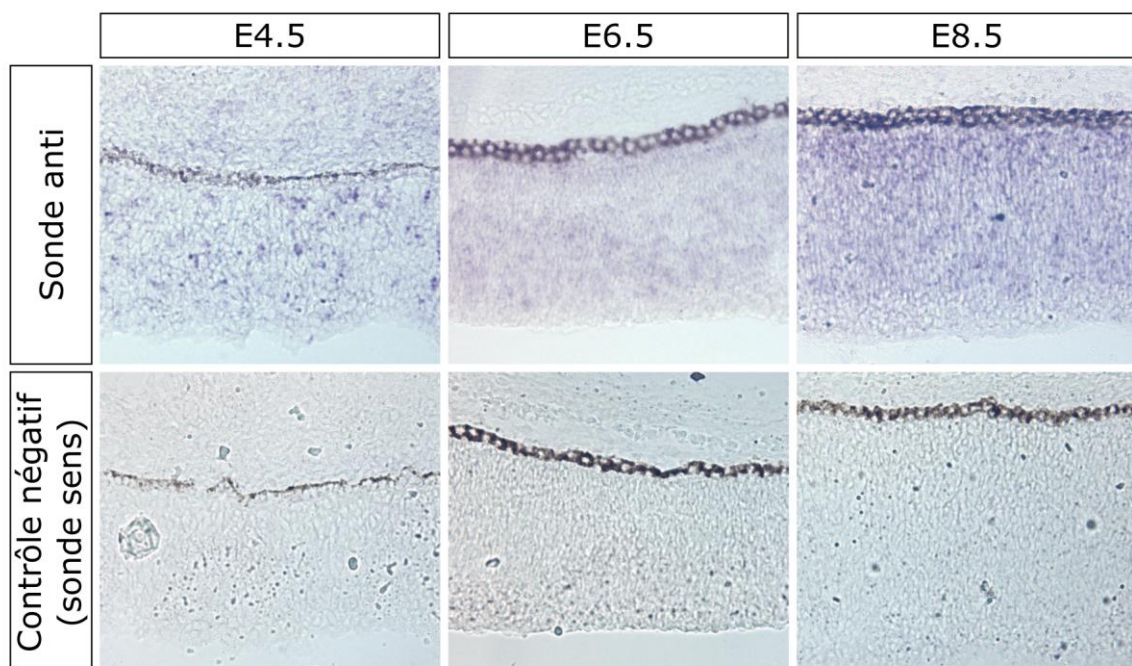


Figure 22 – Hybridation in situ du gène *Btg2*

Hybridation *in situ* pour le transcrit du gène *Btg2* sur coupes de rétine d'embryon de poulet à différents stades de développement. Rangée supérieure d'images, sonde anti ; rangée inférieure, contrôle négatif (sonde sens). On peut voir que le gène est exprimé selon un motif poivre et sel à E4.5 puis dans toute la rétine à E6.5 et E8.5. Le promoteur de ce gène pourrait représenter un candidat intéressant pour restreindre l'activation des *MAGIC markers* aux RPC neurogéniques.

produites et à se différencier (Prada et al. 1991). On voit ici une autre limite de l'approche basée sur la recombinaise inducible $ER^{T2}CreER^{T2}$: quel que soit le stade d'injection du 4-OH-TX choisi, les RPC ne seront jamais au même stade entre le centre et la périphérie. À ce décalage vient s'ajouter la présence simultanée de RPC prolifératives et de RPC neurogéniques pendant les stades intermédiaires de la rétino-génèse.

Afin de tenter de restreindre le marquage Brainbow dans les RPC en divisions asymétriques, je me suis intéressé au gène *Btg2*. Ce gène est supposé être exprimé dans les progéniteurs neuraux avant leur première division asymétrique (Attardo et al. 2008; Iacopetti et al. 1999). La lignée de souris *Tis21::GFP* (KI) a permis d'identifier deux populations de progéniteurs neuraux dans le télencéphale de la souris. Elle a mis en évidence des cellules neuroépithéliales produisant des neurones et, en plus grand nombre, des progéniteurs basaux (Haubensak et al. 2004). Cette lignée a aussi été utilisée pour étudier le plan de clivage pour les divisions des cellules neuroépithéliales et son influence sur le type de division réalisée (Kosodo et al. 2004). *Tis21/Btg2* a été détecté dans la rétine murine (Trimarchi et al. 2008). Il a également été détecté chez l'embryon de poulet (Kamaid & Giraldez 2008).

J'ai d'abord vérifié le patron d'expression du gène *Btg2* par hybridation *in situ* dans la rétine de poulet en développement (**figure 22**). J'observe un patron d'expression "poivre et sel" à E4.5 puis une expression plus générale à E6.5 et E8.5. J'ai fait l'hypothèse que cette expression révèle la présence d'un nombre grandissant de RPC neurogéniques.

J'ai ensuite tenté de tirer parti de cette expression avec plusieurs nouveaux transgènes. Le promoteur de *Tis21* (la version murine de *Btg2*) ainsi que celui du *Btg2* aviaire ont été utilisés pour contrôler l'expression de la recombinaise Cre. La séquence *Tis21* a été clonée à partir d'un outil déjà disponible (Saade et al. 2013) et celle de *Btg2* par une PCR amplifiant la séquence analogue dans le génome de poulet (Fletcher et al. 1991).

Malheureusement, l'électroporation des plasmides $Tol2Tis21::Cre$ comme $Tol2Btg2::Cre$ avec les *MAGIC Markers* donne des résultats visuellement identiques à une électroporation avec la SeCre placée sous contrôle du promoteur CAG. On n'observe pas de clones plus petits, ni d'une taille stéréotypée, ce qui aurait indiqué une restriction du marquage dans des RPC à une étape spécifique de leur lignage. Cette sous-partie de mon projet a donc été abandonnée.

II.3) Étude du sous-lignage des RPC *Atoh7*⁺

Après avoir tenté de restreindre le marquage Brainbow à des RPC effectuant leur première division asymétrique, je suis passé sur une approche différente de suivi du "sous-lignage" de

RPC identifiées moléculairement. Cette fois, je me suis tourné vers un autre promoteur identifié dans la littérature : celui du gène *Atoh7* (*Ath5/Math5* chez d'autres espèces). Les RPC *Atoh7*⁺ présentent un biais vers la génération de certaines classes de cellules rétinienne, en particulier les RGC pour lesquelles elles jouent un rôle essentiel (Wang et al. 2001), ainsi que les PR, HC et AC (Brzezinski et al. 2012; Feng et al. 2010). Si ces biais sont bien établis à l'échelle de la population des RPC *Atoh7*⁺, les potentialités individuelles de ces RPC restent à étudier. La version aviaire du promoteur *Atoh7* nous a généreusement été fournie par J.-M. Matter qui l'a lui-même sous-cloné et étudié son rôle durant le développement de la rétine du poulet (Hernandez et al. 2007; Matter-Sadzinski et al. 2001).

L'objectif était alors de disséquer *in situ* le lignage spécifique de RPC *Atoh7*⁺ prises individuellement, ce dans une même rétine grâce aux *MAGIC Markers*.

II.3.1) Bloquer la fuite aspécifique de l'expression épisomale des transgènes électroporés dans les RPC

Étudier la composition de séquences promotrices, ou restreindre efficacement l'expression de transgènes à des types cellulaires spécifiques requiert d'habitude la génération de lignées transgéniques. À cet effet, un gène rapporteur ou effecteur est placé sous contrôle du promoteur (ou de séquences régulatrices) du gène dont on cherche à identifier les éléments importants, ou dont la spécificité spatiale ou temporelle est recherchée. On peut dans ce cas générer des lignées chez lesquelles l'expression du gène inséré reflète fidèlement celle de l'endogène dont le promoteur est utilisé (Gong et al. 2003). Contrairement à un plasmide, le transgène intégré dans le génome est alors présent en nombre faible et constant de copies, favorisant une régulation appropriée par des éléments à courte portée (promoteurs, enhancers), comme à longue portée (enhancers, TADs et organisation de la chromatine).

Le gène rapporteur peut être celui de la β -galactosidase ou d'une protéine fluorescente par exemple, pour repérer les cellules chez lesquelles le transgène est actif au moment de l'observation (Gong et al. 2003). Pour obtenir une expression plus forte, on peut aussi utiliser un système rapporteur basé sur la recombinaise *Cre* ou le facteur de transcription *Gal4*. Chez les invertébrés et le poisson zèbre, le système UAS/*Gal4* est très utilisé pour obtenir une expression amplifiée (Caygill & Brand 2016). Il offre également une grande versatilité avec d'un côté de nombreuses lignées *Gal4* avec des sites d'insertions spécifiques, et de l'autre, de nombreuses lignées UAS exprimant par exemple des protéines fluorescentes ou des indicateurs calciques. Le système *Cre/lox*, très employé chez la souris (Branda & Dymecki

2004), peut être utilisé comme un système rapporteur indélébile. Il permet de suivre la destinée de cellules ou populations de cellules en activant de manière permanente l'expression d'une protéine fluorescente dans toutes les cellules exprimant le gène d'intérêt à un moment précis du développement. Il offre également une grande versatilité avec des lignées Cre d'un côté et des lignées *floxées* de l'autre, permettant ainsi de nombreuses configurations (expression de rapporteurs fluorescents, KO conditionnel, etc.).

Chez le poulet, il n'existe que quelques lignées transgéniques (Balic et al. 2014) et la mise en place de nouvelles lignées est complexe. La difficulté semble notamment résider dans les conditions requises pour mettre en place une animalerie de poules génétiquement modifiées, d'avantage que dans la transgénèse (McGrew et al. 2004). Cependant, comme on l'a vu, on peut contourner le problème de l'expression stable en utilisant un transposon qui permet d'intégrer le transgène de façon permanente dans le génome des cellules somatiques transfectées.

Néanmoins, le transposon s'exprime aussi en tant que plasmide épisomal, tant qu'il n'est pas intégré dans le génome hôte (Loulier et al. 2014; Maher et al. 2014). Typiquement, l'expression épisomale présente un niveau bien supérieur à celui de l'expression du transgène intégré au génome, sans doute car elle résulte de nombreuses copies. Ce n'est pas un problème si on cherche à avoir une expression aspécifique et large. Mais dans le cas d'un promoteur spécifique, cela génère souvent des fuites d'expression en dehors du patron attendu (Inoue et al. 2017). Ces fuites sont faibles quand on regarde des protéines fluorescentes mais elles posent un vrai problème pour l'expression spécifique de la recombinaise Cre qui peut agir à des concentrations infimes.

Afin de bloquer l'expression épisomale des vecteurs intégratifs électroporés, nous avons mis au point une nouvelle configuration de transposon nommée iOn (**figure 23**, voir en annexe Takuma et al., *en révision*). Cette nouvelle configuration est basée sur le système de transposon piggyBac (Fraser et al. 1996; Lacoste et al. 2009). La transposase de ce système, la PBase, réalise une coupure double-brins à l'extrémité de séquences PB 5' et 3' (surnommés « pieds » du transposon), qu'elle intègre ensuite dans le génome hôte au niveau de motifs TTAA (Ding et al. 2005). En temps normal, les deux pieds du transposon sont orientés de manière opposée, de telle sorte que la séquence qu'ils délimitent est excisée du plasmide donneur avant d'être insérée dans le génome receveur (**figure 23 A**, à gauche). Dans la configuration iOn, les deux séquences PB sont orientées dans le même sens (**figure 23 A**, à

droite). La PBase coupe aux sites habituels, puis insère les deux fragments du plasmide dans le génome en réorientant correctement les deux pieds PB. La cassure double brin entre les deux fragments insérés dans l'ADN génomique est réparée (de manière concomitante ou ultérieure), très vraisemblablement par les mécanismes de la cellule hôte. Dans cette configuration, on peut mettre la séquence du gène d'intérêt en antisens par rapport au promoteur dans le plasmide donneur. Après excision, insertion et réparation, le gène d'intérêt est fusionné au promoteur dans le bon sens et peut alors s'exprimer, tandis que son expression est impossible dans la forme épisomale du vecteur.

Ainsi, tandis que le transposon classique est actif indépendamment de la transposition, le switch iOn conditionne l'expression du gène d'intérêt à l'action de la PBase. L'expression d'un transgène est ainsi bloquée avant son intégration génomique.

Le switch peut être transcriptionnel (iOn) en inversant toute la séquence codante du gène. Cependant nous avons constaté que cette configuration présente encore des traces de fuite épisomale. L'équipe a alors développé un switch traductionnel (LiOn), dans lequel le gène d'intérêt est scindé en deux, en laissant une courte partie 5' contenant l'ATG devant le promoteur tandis que le reste de la séquence est inversée. Ainsi, si une transcription de fuite affecte l'épisme, l'ARNm obtenu ne peut être traduit en un produit fonctionnel. On supprime virtuellement toute fuite possible en absence de PBase avec le switch LiOn.

J'ai utilisé le système LiOn pour construire un premier transgène avec le promoteur du gène *Atoh7* : $^{PB}Atoh7\infty RFP$ (**figure 23 B**). Le symbole " ∞ " dénote la configuration iOn induisant un réarrangement du transgène accompagné de l'inversion du gène d'intérêt. J'ai comparé dans un premier temps l'expression des protéines fluorescentes obtenue par électroporation de ce vecteur dans la rétine de poulet avec un transposon classique construit pour l'occasion : $^{PB}Atoh7::GFP$. Si le promoteur *Atoh7* utilisé fonctionne comme prévu, on s'attend à retrouver du marquage fluorescent uniquement dans les cellules générées récemment par des RPC *Atoh7*⁺, en particulier les RGC, ou exprimant elle-même *Atoh7* (**figure 23 C**). Mes résultats montrent que le transposon classique et le vecteur LiOn sont tous deux fortement exprimés dans la RGL. Le transposon classique présente cependant une expression plus forte et anormale dans les couches intermédiaires, interprétable comme une fuite due à l'expression épisomale. Cette expérience valide l'utilisation du système iOn dans la rétine, et démontre son intérêt pour améliorer le contrôle de l'expression de transgènes à partir de promoteurs spécifiques dans des expériences de transfection somatique.

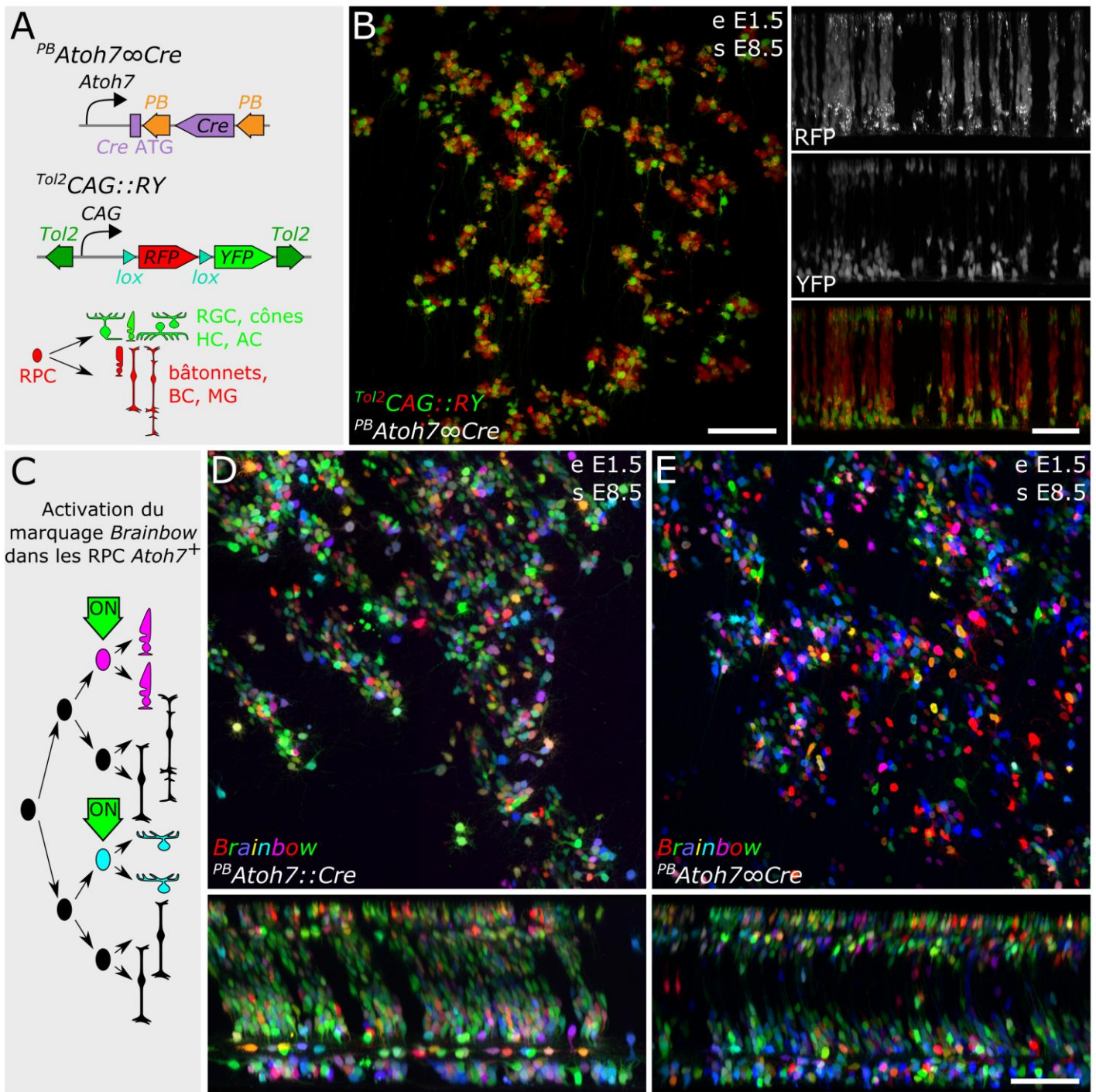


Figure 24 – Contrôle de l'activation du marquage Brainbow avec $^{PB}Atoh7\infty Cre$

A - Principe de l'activation d'un transgène rapporteur ($^{Tol2}CAG::RY$) par un vecteur LiOn exprimant la recombinaise Cre sous contrôle du promoteur Atoh7 ($^{PB}Atoh7\infty Cre$). B - Projections maximales en face (gauche) et radiale (droite) d'une région de rétine électroporée avec les transgènes présentés en A, imagée par microscopie confocale. C - Principe de l'activation des *MAGIC markers* dans les RPC $Atoh7^+$ avec le vecteur $^{PB}Atoh7\infty Cre$. D & E - Comparaison du marquage obtenu en co-électroporant les *MAGIC Markers* ($^{Tol2}CAG::Cytbow$ et $^{Tol2}CAG::Nucbow$) avec un transposon classique $^{PB}Atoh7::Cre$ (gauche) ou le vecteur LiOn $^{PB}Atoh7\infty Cre$ (droite). Projections maximales en face (haut) et radiale (bas) de régions de deux rétines au stade E8.5 électroporées à E1.5. Tandis qu'une importante recombinaison est observée dans l'INL avec le transposon classique (colonnes quasiment continues de cellules), le transgène LiOn restreint le marquage aux parties externes et internes de la rétine.

(Barres d'échelle : 50 μm)

II.3.2) Contrôler la recombinaison Cre/lox avec un promoteur spécifique grâce à la configuration iOn

J'ai ensuite utilisé la configuration LiOn pour contrôler l'expression de la recombinaise Cre avec le promoteur du gène *Atoh7* (**figure 24**). J'ai d'abord testé le vecteur $^{PB}Atoh7\infty Cre$ avec le transposon rapporteur de la recombinaison $^{Tol2}CAG::RY$. Ce transposon, préalablement validé *in vitro* par l'équipe, exprime par défaut la RFP. Après recombinaison d'une paire de site *lox* par la Cre, le gène de la RFP est excisé et celui de la YFP s'exprime alors. Dans les rétines électroporées avec le transposon $^{Tol2}CAG::RY$, on obtient des colonnes de cellules rouges qui démontrent son intégration génomique dans les RPC. En présence de $^{PB}Atoh7\infty Cre$, un grand nombre de cellules exprimant YFP (vertes) sont observées, indiquant que la Cre y a été active. Elles peuvent coexprimer RFP et YFP (cellules jaunes) si la recombinaison est récente et que toute la RFP n'a pas encore été recyclée dans le cytoplasme (**figure 24 A**). De plus, on peut voir que le rapporteur $^{Tol2}CAG::RY$ n'est recombiné que dans les couches externe et interne de la rétine où se situent les PR, RGC, HC et AC (**figure 24 B**). On observe donc le marquage attendu pour une action de la recombinaise Cre restreinte aux progéniteurs *Atoh7*⁺ (Brzezinski et al. 2012; Feng et al. 2010), validant ainsi l'outil $^{PB}Atoh7\infty Cre$.

Dans un deuxième temps, j'ai combiné le vecteur $^{PB}Atoh7\infty Cre$ avec les *MAGIC Markers* afin de disséquer le lignage issu des RPC *Atoh7*⁺ (**figure 24 C, D & E**). Pour contrôler la spécificité de l'activation de Cre par le système LiOn, j'ai comparé le marquage multicolore obtenu avec $^{PB}Atoh7\infty Cre$ et celui généré par $^{PB}Atoh7::Cre$ (transposon PB classique). Mes résultats montrent une restriction partielle du marquage Brainbow avec le transposon classique, mais on observe également de nombreuses cellules dans l'INL par rapport à la version iOn (**figure 24 C & D**). Ces cellules de l'INL ont des couleurs simples (essentiellement vertes dans la figure 24 D). Ce marquage pourrait indiquer un faible niveau de recombinaison des *MAGIC Markers* lié à une expression de fuite de la Cre, plus faible que celle définie par le promoteur. Le vecteur iOn montre donc une meilleure restriction de la recombinaison que la version classique du transposon.

Avec le switch iOn, on dispose ainsi d'une approche de recombinaison Cre/lox contrôlable par un promoteur spécifique chez le poulet sans avoir recours à la génération de lignées transgéniques.

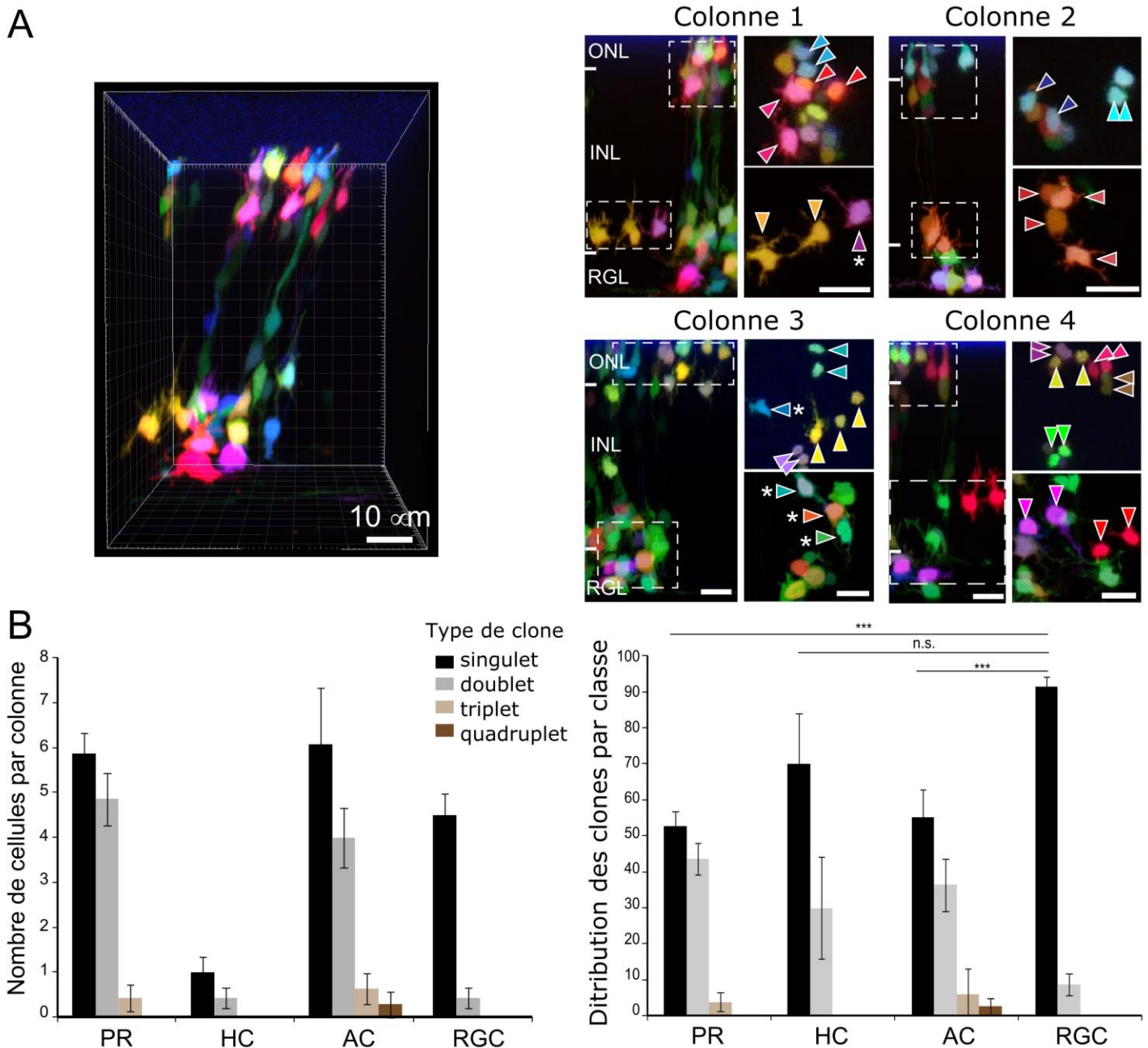


Figure 25 – Analyse des potentialités individuelles des RPC *Atoh7*⁺

A - A gauche, vue en 3D d'une colonne de cellules rétinienne au stade E8.5 dans laquelle les *MAGIC Markers* (*Tol2CAG::Cytbow* et *Tol2CAG::Nucbow*) ont été activés avec le vecteur *LiOn^{PB}Atoh7[∞]Cre*. A droite, vue radiale de quatre colonnes contenant des clones de 2 à 4 cellules (flèches de couleurs) et des cellules seules (flèche avec astérisque). La colonne 1 correspond à celle montrée en 3D à gauche. B - A gauche, quantification du nombre de cellules appartenant à des clones composés de 1 à 4 cellules en fonction de leur classe (PR, HC, AC ou RGC). A droite, les mêmes données exprimées comme le pourcentage des cellules de chaque classe (moyennes ± erreur standard, n = 14 colonnes imagées dans deux embryons différents ; un test de Kruskal-Wallis montre une différence significative entre la répartition clonale des RGC d'une part et celle des PR/AC d'autre part (p<0.001)). (Barres d'échelle : 10 µm)

II.3.3) Analyse des clones générés par des RPC *Atoh7*⁺

Les clones marqués dans les rétines électroporées avec *^{PB}Atoh7 ∞ Cre* et les *MAGIC Markers* ont été analysés au stade E8.5. Pour chaque cellule, on détermine si elle appartient à un clone d'une, deux, trois ou quatre cellules en se basant sur les combinaisons de couleurs observées. On détermine également la classe à laquelle la cellule appartient en fonction de sa position dans la rétine et de sa morphologie (**figure 25 A**). Notons que nous avons ici analysé séparément les cellules présentes dans les couches externes et internes de la rétine. En effet, les échantillons n'ayant pas été transparisés, il est difficile de s'assurer que deux cellules appartenant à l'ONL et la RGL partagent la même couleur à cause des artefacts liés à l'atténuation du signal de fluorescence en profondeur. Ce risque d'artefact est d'autant plus grand que nous analysons ici de nombreux petits clones marqués avec des couleurs complexes et non les colonnes de cellules cohésives habituelles.

Les résultats obtenus montrent que les PR, les HC et les AC peuvent appartenir à des singulets ou des doublets de cellules exprimant la même combinaison de marqueurs. Les doublets observés permettent de déduire qu'une fraction importante des PR et AC issus des RPC *Atoh7*⁺ (43.6±4,4% et 36.4±7,3%, respectivement) sont générés par des divisions symétriques terminales. On trouve aussi quelques PR et AC appartenant à des triplets voire des quadruplets de cellules (**figure 25 B**). Les cellules d'un clone de plus de deux cellules sont souvent de même classe, surtout dans le cas des doublets de cellules (**figure 25 A**, clones pointés).

Les RGC, à l'inverse, appartiennent fréquemment à des singulets. Ceci indique que soit i) les autres cellules du clone sont mortes, par apoptose par exemple, soit ii) elles sont présentes dans l'ONL mais n'ont pas pu être appariées aux RGC du même clone à cause des artefacts d'imagerie liés à la profondeur dans les rétines non transparisées.

Ces résultats, en permettant de décrire le lignage des RPC *Atoh7*⁺ à l'échelle des cellules individuelles, affinent ceux de la littérature. Ils valident l'utilisation de l'approche iOn pour déclencher les *MAGIC Markers* dans des progéniteurs moléculairement identifiés. Grâce aux couleurs, on a le bénéfice de pouvoir identifier un grand nombre de clones simultanément dans une même rétine. On pourrait donc poser des questions plus fines sur le sous-lignage des RPC *Atoh7*⁺, par exemple analyser le résultat de perturbations pour étudier le rôle d'un gène ou d'un lncRNA.

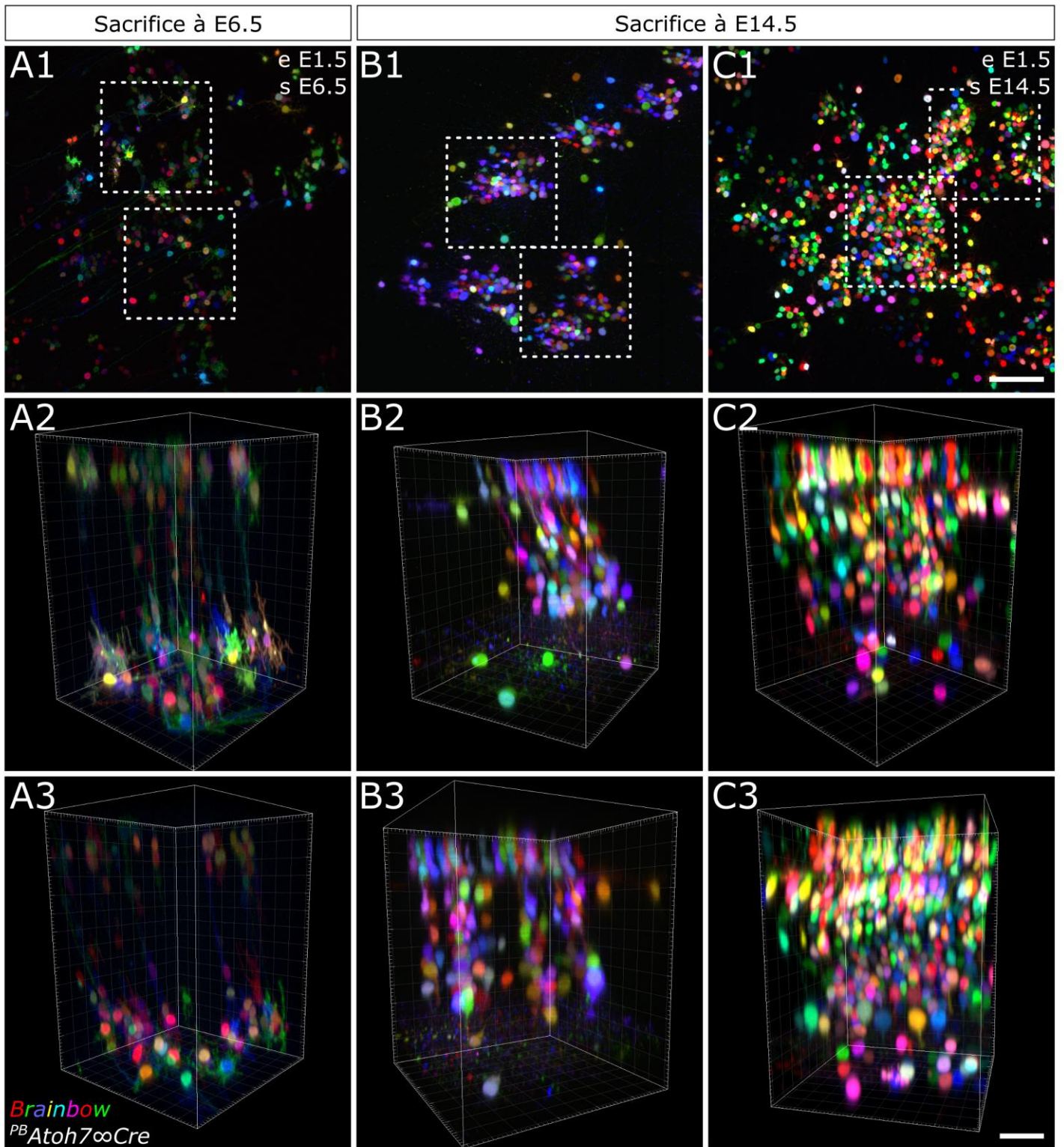


Figure 26 – Observation des clones générés par des RPC *Atoh7*⁺ à différents stades de développement

A – Marquage multicolore de clones générés par des RPC *Atoh7*⁺ à E6.5. B, C - Marquage multicolore de clones générés par des RPC *Atoh7*⁺ à E14.5. Comme dans la figure précédente, les *MAGIC Markers* (*Tol2CAG::Cytbow* et *Tol2CAG::Nucbow*) ont été activés avec le vecteur *LiOn^{PB}Atoh7[∞]Cre*. A1, B1, C1 - Projections maximales de régions de rétines vues en face. A2-3, B2-3 et C2-3 – Vues en 3D de colonnes délimitées en pointillés sur les projections maximales. Tandis qu'à E6.5 le marquage multicolore est restreint aux zones les plus internes et externes de la rétine, comme à E8.5, à E14.5, on retrouve des cellules marquées dans toutes les couches. Ces cellules dans l'INL, potentiellement des BC, semblent moins nombreuses que dans les clones *Brainbow* obtenus avec *SeCre*.

(Barres d'échelle : ligne 1 - 50 μ m ; ligne 2 & 3 - 20 μ m)

II.3.4) Observations de clones générés par des RPC *Atoh7*⁺ à différents stades de développement

Des rétines électroporées avec les *MAGIC Markers* et *^{PB}Atoh7 ∞ Cre* à E1.5 ont également été prélevées sur des embryons sacrifiés à E6.5 et à E14.5 (**figure 26**).

À E6.5, on retrouve la restriction du marquage observée à E8.5 dans les PR et RGC (**figure 26 A**). On observe également des cellules post-mitotiques peu brillantes en migration dans l'INL et potentiellement des RPC au niveau de la face externe de la rétine. On observe plus facilement des doublets de RGC qu'à E8.5, ce qui favorise l'hypothèse que le déficit de clones de deux RGC et plus serait lié à la mort programmée d'une partie d'entre elles au cours du développement.

À E14.5, on observe toujours des RGC, des PR, des HC et des AC (**figure 26 B et C**). Cependant, de manière inattendue, on observe également un nombre non négligeable de cellules au centre de l'INL qui pourraient correspondre soit à des BC soit à des MG en cours de différenciation. Cette observation va à l'encontre des résultats attendus pour le lignage des RPC *Atoh7*⁺ (Feng et al. 2010).

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce résultat. La première serait une légère fuite du transgène *^{PB}Atoh7 ∞ Cre* dans des RPC neurogéniques tardives (après E8.5) produisant des BC ou MG. La deuxième serait la génération de BC (ou de RPC générant des BC) par des RPC ayant exprimé *Atoh7* à un moment de leur développement. Ce dernier point constituerait une découverte inattendue. Pour s'en assurer, il faudrait vérifier les classes de cellules produites par les RPC *Atoh7*⁺ en effectuant des marquages immunohistologiques.

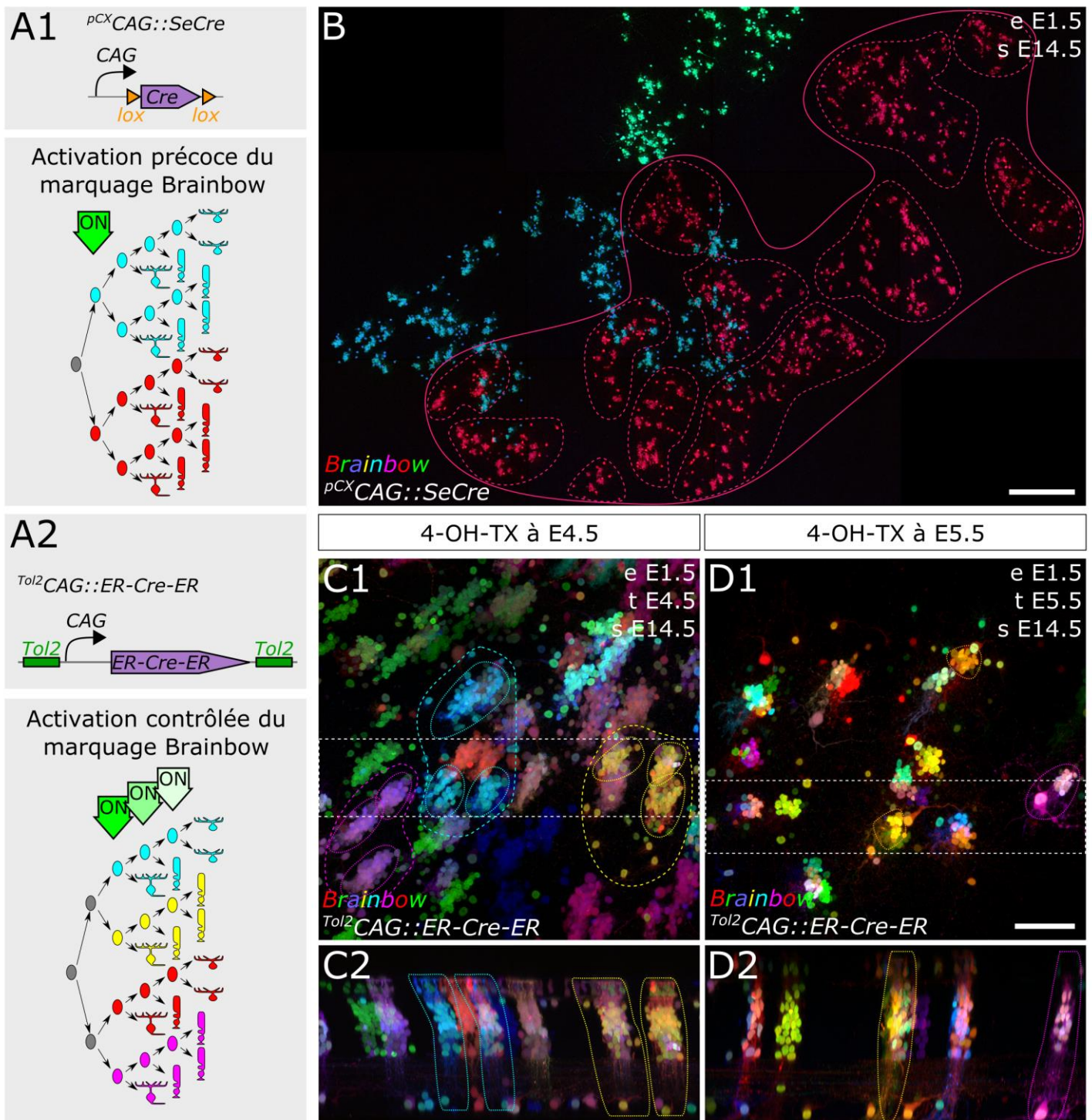


Figure 27 – Dispersion tangentielle des clones rétiniens

A - Présentation de deux stratégies de recombinaison alternatives, utilisées pour activer les *MAGIC markers* à différents stades de développement. A1 – L'utilisation d'un plasmide non intégratif $pCX^{CAG::SeCre}$ permet l'expression d'une recombinaise Cre constitutivement active et « auto (self) excisable » pour écourter son action. Cette expression suit de peu l'électroporation et est donc idéale pour obtenir une recombinaison aussi précoce que possible, mais ne peut pas être contrôlée. A2 – Un transposon $Tol2^{CAG::ER^{T2}CreER^{T2}}$ permet l'expression stable d'une forme inducible de la recombinaise Cre ($ER^{T2}CreER^{T2}$) dont l'activation est déclenchée par une injection ultérieure de 4-hydroxytamoxifène. Ceci permet de contrôler le stade d'activation des *MAGIC markers*. B, C & D – On observe trois degrés de dispersion tangentielle des clones, "macro", "méso" et "micro", soulignées par des lignes continues, en tiret ou en pointillés, respectivement. B - Projection maximale de la couche des AC vue en face, montrant des clones de grande taille très étendus, obtenus après activation précoce du marquage Brainbow par la SeCre. C & D - Exemple de clones de taille réduite obtenus après activation du marquage Brainbow par la $ER^{T2}CreER^{T2}$ via l'injection de 4-hydroxytamoxifène à E4.5 (C) ou E5.5 (D). C1 & D1 - Projection maximale incluant toutes les couches de la rétine vues en face. C2 & D2 - Projection maximale d'orientation radiale des régions encadrées par des tirets blancs en C1 et D1. (Barres d'échelle : B - 200 μm ; C, D - 50 μm)

III] Dispersion tangentielle des clones rétiniens

Tandis que le développement des classes de neurones rétiniens participe à la formation d'unités colonnaires de traitement de l'information visuelle, le développement des types, lui, doit aboutir à la formation de mosaïques intriquées couvrant tout ou partie de la rétine. Celles-ci sont indispensables au traitement homogène des différentes modalités de l'information visuelle. Dans la suite de mon travail, j'ai étudié les patrons de dispersion des clones dans la rétine pour comprendre si leur développement est lié à celui des types.

III.1) Contrôler le stade d'activation des transgènes *Brainbow* pour suivre la dispersion des clones rétiniens

La comparaison des expériences utilisant la SeCre constitutivement active avec celles où la $ER^{T2}CreER^{T2}$ a été activée à différents stades par injection de 4-OH-TX permet de faire plusieurs constats sur la dispersion des RPC (**figure 27**).

Les grands clones obtenus par activation précoce des *MAGIC Markers* avec la SeCre (**figure 27 A1 & B**) sont systématiquement composés de plusieurs groupes de cellules. Les clones issus de RPC en prolifération peuvent ainsi être découpés en groupes de colonnes de cellules plus ou moins espacés (**figure 27 B**, groupes soulignés par des tirets). On observe ainsi trois niveaux d'organisation de la descendance des RPC :

- Une organisation « macro-clonale » correspondant aux ensembles de colonnes de cellules très dispersés (séparés par de grandes zones non marquées) issus de RPC en divisions symétriques au début de la rétinogénèse (**figure 27**, exemple de macro-clone entouré par une ligne continue).
- On a ensuite une organisation « méso-clonale » correspondant aux groupes de colonnes de cellules plus proches et régulièrement espacées, très vraisemblablement issus de RPC toujours en divisions prolifératives ayant pu générer de premières RPC neurogéniques (**figure 27**, méso-clones entourés par des lignes en tirets).
- On définit enfin des clones cohésifs correspondant aux colonnes radiales de cellules. Ces dernières sont probablement issues de RPC neurogéniques ou d'une RPC proliférative générant uniquement des RPC neurogéniques.

Cette hiérarchisation est appuyée par les expériences utilisant le 4-hydroxytamoxifène. Lorsque ce dernier est injecté à E4.5, on observe essentiellement des « méso-clones » composés de quelques colonnes de cellules et des micro-clones (colonnes isolées) (**figure 27 A2 & C**). Quand on décale l'injection du 4-hydroxytamoxifène à E5.5, on observe

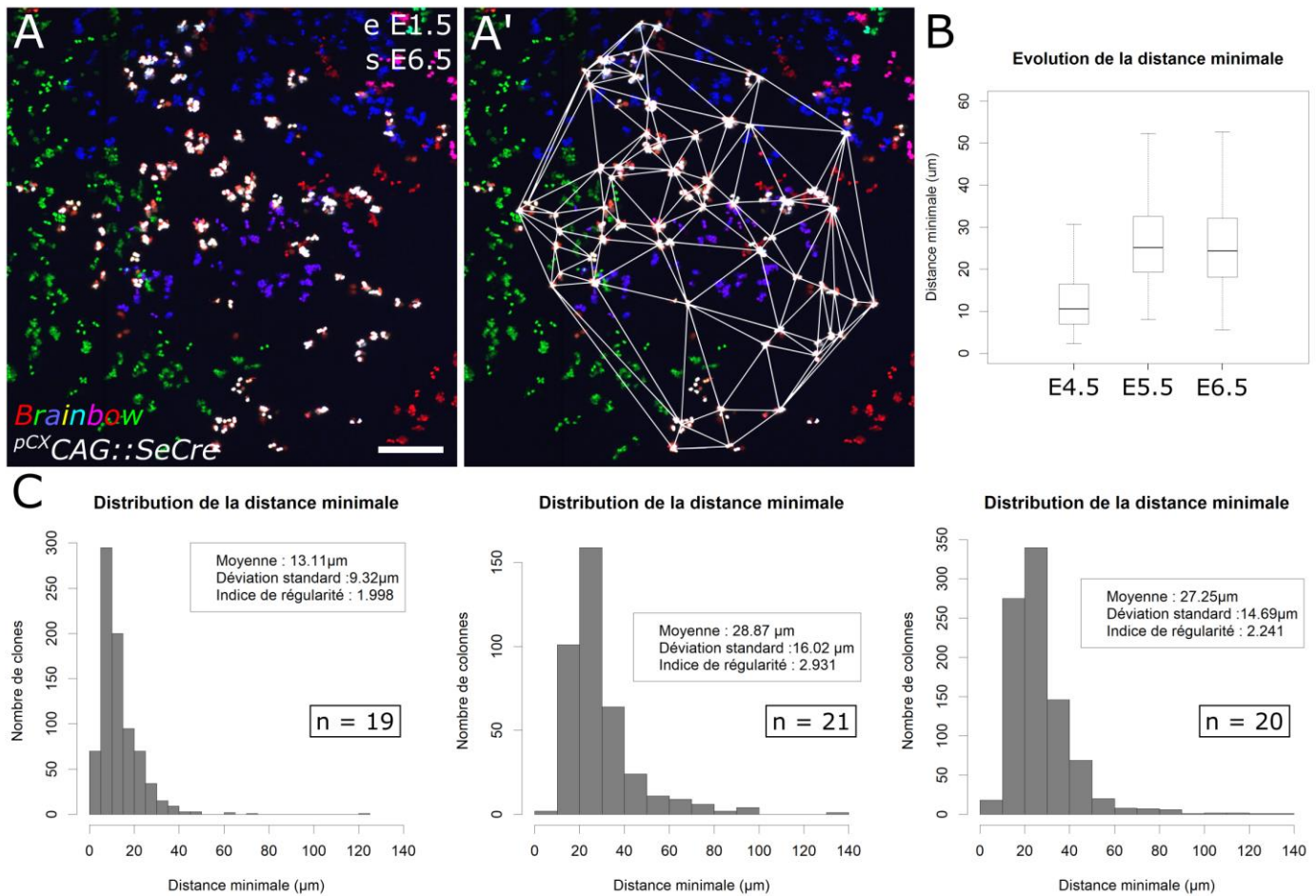


Figure 28 – Caractérisation spatiale et cinétique de la dispersion tangentielle des clones aux stades précoces

A - Principe de l'analyse de la dispersion des clones par triangulation de Delaunay. Le centre des colonnes de cellules composant chaque clone est pointé au niveau des BC et une triangulation de Delaunay (superposée en blanc en A') est utilisée pour calculer les distances entre colonnes les plus proches. Note : aux stades précoces auxquels des colonnes ne sont pas encore apparentes (E4.5), la position des cellules est utilisée à la place. B - Boxplots présentant la distribution de la distance entre voisins les plus proches, entre les cellules à E4.5 et entre les colonnes de cellules composant les clones à E5.5 et E6.5. C - Histogrammes de la distribution des distances entre voisins les plus proches pour chaque stade. On observe que la distance entre les éléments composant les clones augmente entre E4.5 et E5.5 mais pas entre E5.5 et E6.5. Ceci indique une cessation de la dispersion tangentielle des clones autour de E5.5. (n = 19 clones à E4.5, 21 clones à E5.5 et 20 clones à E6.5)

(Barre d'échelle : 100 μm ; figure réalisée à partir des données de Claire Montmasson, stagiaire de M2 encadrée au cours de la thèse)

uniquement des colonnes de cellules isolées. L'observation dans cette condition de marquage de clones accolés indique que des divisions symétriques mais non dispersives des RPC peuvent vraisemblablement donner naissance aux deux moitiés d'un seul micro-clone (ou colonne).

Il est intéressant de noter qu'un déficit de RGC semble affecter les clones marqués à partir de E4.5. Ceci semble cohérent avec la littérature (Prada et al. 1991) : les RGC seraient issues de RPC neurogéniques générées par des RPC prolifératives dès E2. Ces dernières vont ensuite générer d'autres RPC neurogéniques à même de produire les autres classes de cellules de la rétine. Du fait de ces relations de lignage distantes et de la migration plus importante qu'elles accomplissent, les RGC ne se retrouveraient pas forcément toujours positionnées dans un alignement radial avec les micro-clones. Les RGC formeraient plutôt comme un « nuage » lié à un méso-clone.

Les patrons de dispersion observés indiquent que les RPC deviendraient potentiellement totalement neurogéniques à E5.5, si nous considérons que seuls les RPC prolifératives peuvent se disperser tangentiellement. Avant, des divisions symétriques et des migrations tangentielles de progéniteurs seraient encore possibles. Il y aurait donc deux phases de dispersion : une première phase précoce et à grande échelle génère les macro-clones, tandis qu'une deuxième phase plus restreinte génère les méso-clones. Les micro-clones ou colonnes rétiniennes seraient quant à eux issus de RPC neurogéniques ou de RPC prolifératives restant cohésives.

III.2) Étude des différentes phases de dispersion des RPC aux stades précoces de la rétino-génèse

Afin de mieux comprendre la dispersion des RPC aboutissant à l'espacement des colonnes rétiniennes, nous avons étudié l'évolution de la distance entre colonnes voisines dans des rétines précoces (**figure 28**). Cette étude a été réalisée par une stagiaire de M2, Claire Montmasson, que j'ai encadrée.

Dans ce but, des embryons ont été électroporés à E1.5 avec les *MAGIC Markers*, la *SeCre* et la *Tol2ase*. Ils ont ensuite été sacrifiés à E4.5, E5.5 et E6.5 et les rétines électroporées ont été disséquées, montées à plat et imagées. À E4.5, les colonnes n'étant pas encore présentes, les RPC marquées ont été directement pointées. À E5.5, on discerne de petites colonnes de cellules cohésives : à partir de ce stade, le centre des colonnes a été pointé. On a ensuite

mesuré les distances entre cellules/colonnes immédiatement voisines (les plus proches les unes des autres). Pour ce faire, on utilise la triangulation de Delaunay (**figure 28 A**) qui permet d'identifier les paires de points voisins les plus proches et de mesurer les distances les séparant. On peut représenter la distribution de ces distances sous forme d'histogrammes. On voit apparaître dans cette distribution une distance minimale correspondant au rayon d'un cercle dans le périmètre duquel on ne peut pas trouver une deuxième cellule ou colonne voisine. Ce minimum reflète ainsi l'existence d'une zone d'exclusion entre les cellules ou les colonnes pointées. On peut également calculer l'indice de régularité (RI) qui correspond à la moyenne des distances entre paires de colonnes (ou cellules) les plus proches divisée par leur écart type. Le RI donne une idée de la régularité de la mosaïque constituée par les éléments pointés. On considère qu'un RI inférieur à 2 indique un placement aléatoire des cellules, tandis qu'un RI supérieur à 2 indique un placement des éléments selon une organisation pseudo-mosaïque, d'autant plus régulière que la valeur du RI est grande. Les analyses spatiales ont été réalisées avec le package spatstat sur R (Baddeley & Turner 2005; R Development Core Team 2019).

On observe une augmentation non significative de la distance entre les cellules à E4.5 par rapport à la distance entre les colonnes de cellules à E5.5 (**figure 28 B**). La distance n'évolue pas entre E5.5 et E6.5. Les dernières divisions dispersives auraient donc lieu au plus tard entre E4 et E5. On assiste ensuite uniquement à une dispersion radiale correspondant à la formation des colonnes.

Le développement de la rétine implique donc une dispersion tangentielle des RPC pendant la phase de prolifération qui conduit à une organisation mosaïque semi-régulière des clones de cellules sœurs. Dans la suite de mon travail, j'ai voulu savoir si cette disposition régulière des clones pouvait être liée à celle des types neuronaux rétiniens.

IV] Le développement des types neuronaux rétiniens

Cette partie constitue le principal sujet de mon travail thèse. Elle a eu pour but d'étudier le développement des différents types d'AC et RGC et de comprendre si des biais existent au niveau des RPC dans la génération de certains d'entre eux. Pour ce faire, j'ai mis en place des protocoles d'immunohistochimie (IHC) ainsi que de transfection compatibles avec les protéines fluorescentes exprimées par les *MAGIC Markers*. J'ai ensuite déterminé une liste de cinq marqueurs de type ou de sous-population d'AC et de RGC. Enfin, j'ai analysé la répartition de ces marqueurs dans des clones générés par des RPC marquées à E1.5.

On pose deux hypothèses générales, H_0 et H_1 , sur le modèle de développement des types neuronaux rétiniens :

- H_0 : la détermination du type a lieu dans les cellules post-mitotiques après leur différenciation dans une classe spécifique. Chaque cellule d'une classe donnée pourrait alors raffiner son identité en un ensemble de types de façon stochastique et indépendante. Ce choix intrinsèque en fin de lignage correspond à la vue classique de la biologie du développement dans laquelle la différenciation des cellules implique une succession de choix dichotomiques. Dans ce cas, on s'attend à pouvoir modéliser la distribution observée pour les marqueurs de type par une distribution statistique unimodale reflétant la densité moyenne du marqueur et le bruit dans le choix du nombre de cellules d'un type donné dans chaque clone.
- H_1 : le type serait une modalité de l'identité cellulaire totalement ou partiellement indépendante de la classe. On suppose alors qu'il existe un biais plus ou moins précoce dans la spécification des types de cellules générés dans un clone (de pénétrance complète ou incomplète). La combinaison d'un biais des RPC précoces avec les différentes phases de dispersion observées dans la partie III pourrait contribuer à préétablir la mosaïque des types. Cette hypothèse est attrayante car elle suivrait un principe de parcimonie intéressant : le développement de la rétine prendrait aussi en compte son développement mécanique. Ceci diminuerait le coût énergétique de la rétino-génèse au sens thermodynamique du terme, en évitant d'importantes réorganisations spatiales basées sur des migrations tangentielles ou de l'apoptose. Si cette hypothèse est valide, on s'attend à observer une distribution plus complexe des marqueurs de types qu'il restera à modéliser.

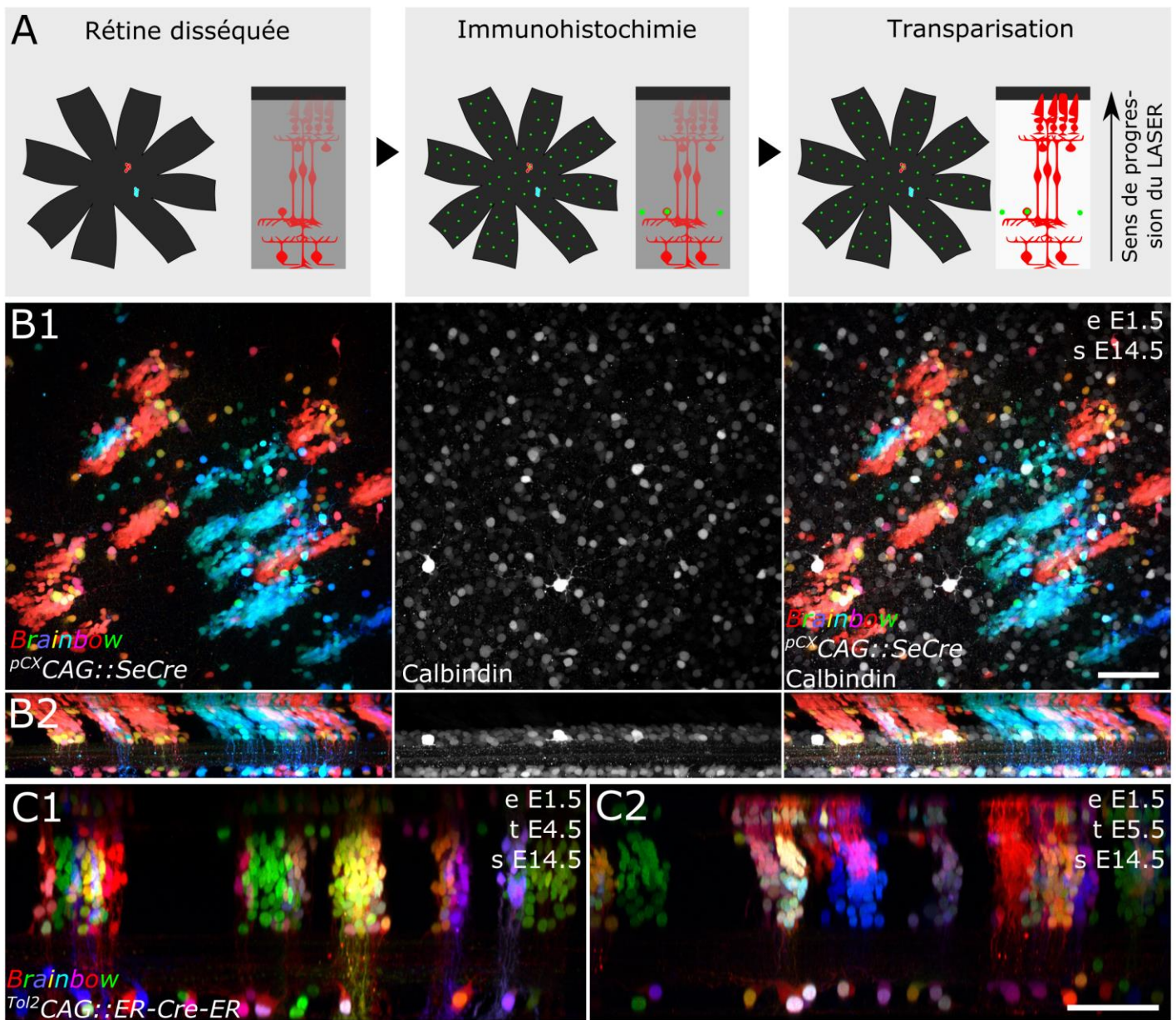


Figure 29 – Validation d'un protocole d'immunohistochimie et de transparisation compatible avec le marquage multicolore Brainbow

A - Étapes du protocole d'immunohistochimie et transparisation à partir de la rétine électroporée disséquée jusqu'au montage à plat de la rétine transparisée. B - Projections maximales en face (B1) et radiale (B2) d'une région de rétine électroporée avec les *MAGIC markers* et marquée avec un anticorps primaire anti-Calbindin révélé avec un anticorps secondaire associé à l'Alexa Fluor 647. A gauche, marquage *Brainbow* dans les canaux RGB, au centre, marquage Calbindin en niveaux de gris, à droite, combinaison des deux marquages. C - Projections maximales d'orientation radiale réalisées sur une épaisseur d'environ 100 μm pour une rétine non transparisée (1) et une rétine transparisée (2). Les deux rétines sont électroporées avec les versions cytoplasmique et nucléaire des *MAGIC markers*. Noter la forte diminution d'intensité au niveau des photorécepteurs en C1, absente en C2.

(Barres d'échelle : 50 μm)

IV.1) Mise en place et validation de la méthodologie expérimentale

IV.1.1) Immunohistochimie et transparence

Afin de pouvoir atteindre l'objectif fixé pour ce projet, j'ai mis en place une méthodologie comprenant plusieurs étapes. Les rétines, une fois disséquées et ouvertes grâce à quatre incisions, sont traitées en deux temps pour chercher un éventuel biais dans la formation des différents types (**figure 29 A**).

La première étape consiste à révéler le marqueur de type ou sous-population de neurones choisi par immunohistochimie (IHC) (**figure 29 B**). Un protocole *in toto* compatible avec le marquage Brainbow est utilisé. Les trois canaux cyan, jaune et rouge étant déjà occupés, il ne reste que le canal rouge lointain qui soit suffisamment distinct pour être utilisé en même temps en microscopie confocale. En théorie, on pourrait aussi utiliser le canal bleu. Néanmoins, dans les tests que j'ai effectués avec les microscopes confocaux disponibles sur la plate-forme de l'Institut de la Vision, le marquage bleu était visible dans le canal cyan, rendant cette combinaison inexploitable.

En parallèle du protocole d'IHC, j'ai également adapté un protocole allégé de transparence adapté à la faible épaisseur de la rétine (**figure 29 C**). Cette transparence est basée sur une molécule : le iohexol, utilisée dans deux milieux de clarification publiés, le RIMS et SeeDB2 (Ke et al. 2016; Yang et al. 2014). Ce protocole peut être utilisé en conjonction avec l'IHC en ajoutant une étape. Il peut également être utilisé seul sur les rétines n'ayant pas besoin de marquage IHC. Dans les deux cas, cette étape améliore l'imagerie et évite de devoir utiliser des corrections post-acquisition comme la correction de l'intensité en z, corrections susceptibles de produire des artefacts. Cela est essentiel dans le cas de l'analyse clonale multicolore qui requiert une détection des combinaisons de couleurs aussi égale que possible sur l'ensemble du volume imagé.

IV.1.2) Imagerie des rétines marquées

Les rétines sont imagées selon une séquence définie pour maximiser la rapidité et la reproductibilité de l'analyse (**figure 30 A**).

Dans un premier temps, une cartographie en deux dimensions de chaque rétine est réalisée au microscope à épifluorescence pour repérer les clones. Cette carte apporte deux avantages pour la suite de l'imagerie : d'une part, tous les clones intéressants peuvent être repérés et on évite de passer à côté d'informations pertinentes. D'autre part, on connaît ainsi les limites des clones

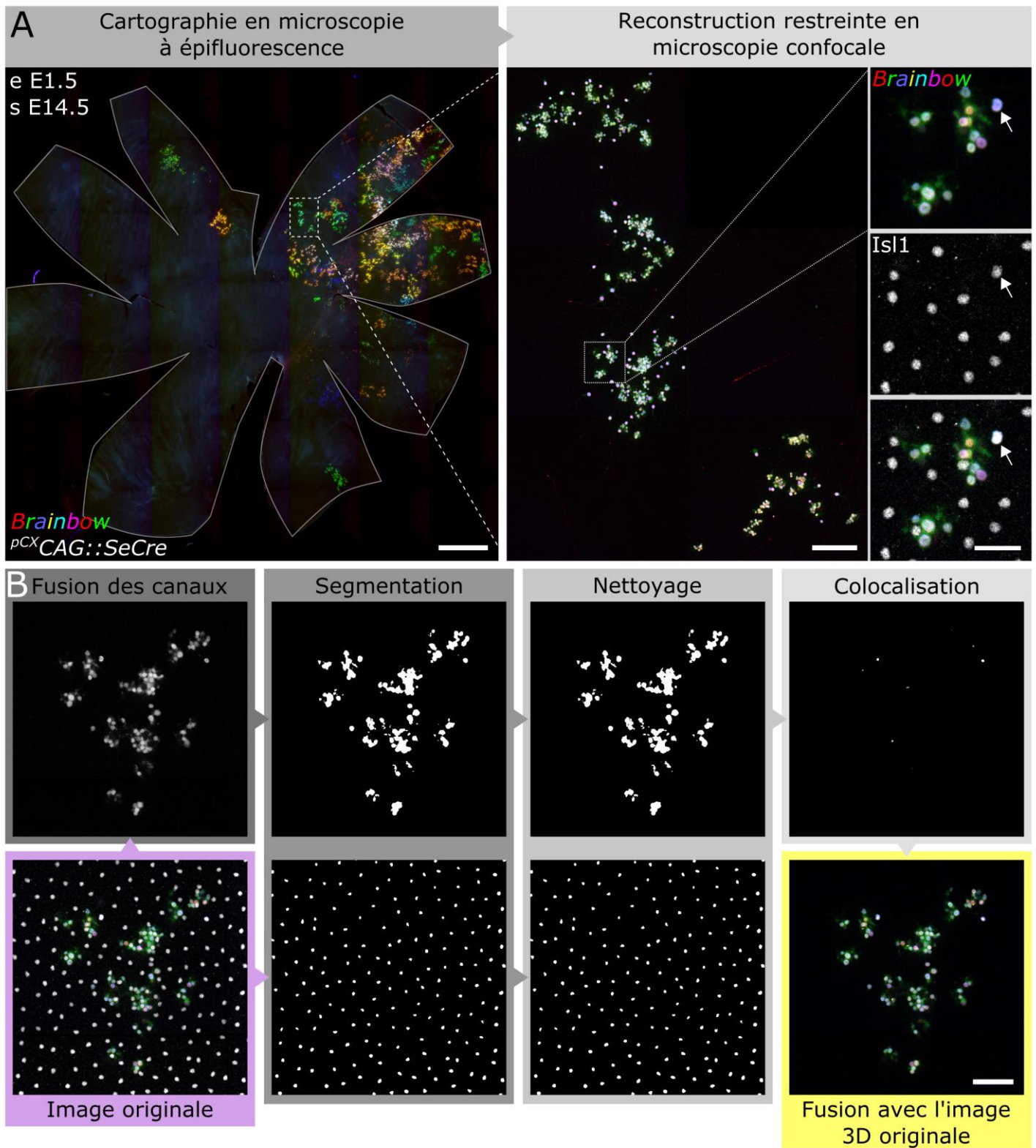


Figure 30 – Étapes d'imagerie et d'analyse pour l'étude du lignage des types neuronaux rétiniens

A - Étapes d'imagerie. À gauche, cartographie 2D d'une rétine à E14.5 entière par microscopie à épifluorescence. À droite, projection maximale d'une région reconstruite à haute résolution et en 3D par microscopie confocale. La reconstruction 3D est restreinte en (x,y) à la zone marquée avec Brainbow observée sur la carte 2D (A, gauche), et en z aux seules couches contenant les cellules marquées par immunohistochimie. Ici, seules les AC Isl1⁺ sont présentées pour une meilleure lisibilité. Des agrandissements sont présentés à droite pour donner une idée de la résolution des images. La flèche désigne une cellule coexprimant les *MAGIC markers* et Isl1. B - Étapes de traitement des images, incluant : la fusion des trois canaux RGB de l'image Brainbow en une seule image en niveaux de gris ; la réalisation de deux masques de segmentation à l'aide d'ilastik, un logiciel basé sur du machine learning ; une étape de « nettoyage » des objets de taille inférieure à une cellule unique ; enfin, la détection de zones de colocalisation entre le masque Brainbow et le masque du marquage IHC.

(Barres d'échelle : A : carte 2 mm, région 100 µm, détail 25 µm ; B : 50 µm)

intéressants. Ils peuvent alors être imagés en entier en microscopie confocale, en optimisant la taille de la région imagée tout en évitant d'omettre une partie du clone en cherchant à l'aveugle avec l'objectif à fort grossissement du confocal. La carte peut aussi être utilisée pour mieux déterminer les combinaisons de couleurs dans les clones. La résolution de la carte ne donne cependant pas accès à leur répartition dans les compartiments cellulaires.

Dans un deuxième temps, les régions identifiées comportant un ou plusieurs clones intéressant(s) sont reconstruites en 3D par microscopie confocale. Afin d'optimiser le temps des acquisitions tout en gardant un échantillonnage satisfaisant pour l'analyse, les régions imagées sont limitées en z aux couches contenant les cellules marquées à analyser. Les images sont acquises avec un objectif à huile minérale à grossissement intermédiaire (20X, NA = 0.85). Les images sont échantillonnées avec une taille de voxel de $0,62 \times 0,62 \times 1,64 \mu\text{m}^3$.

IV.1.3) Traitement des images 3D des clones

Les mosaïques d'images acquises au microscope confocal sont assemblées. On peut ensuite travailler sur les images en 3D. Pour faciliter le comptage des cellules dans les clones et rendre possible des analyses complémentaires, les éléments marqués sont segmentés et la colocalisation entre *MAGIC Markers* et IHC est détectée automatiquement dans un nouveau canal (**figure 30 B**).

D'un côté, on peut segmenter directement le canal unique de l'IHC. De l'autre, on fusionne tout d'abord les trois canaux RGB contenant le marquage *Brainbow* en un canal unique en niveaux de gris. On facilite ainsi la segmentation en ne prenant pas en compte la couleur. Cela permet aussi de diminuer les différences d'intensité entre les différents clones, source d'erreur potentielle durant la segmentation. La segmentation est réalisée avec ilastik, un logiciel basé sur le *machine learning* capable de classer les pixels d'une image en deux catégories ou plus, typiquement le fond et le signal (Sommer et al. 2011). Les images sont séparées par groupes présentant des niveaux d'intensité et de bruit de fond homogènes pour chaque marqueur IHC et pour le marquage *Brainbow*. Le logiciel est ensuite entraîné avec une à quatre images en 3D représentatives de leur groupe avant de passer à la segmentation du groupe entier. Chaque canal binaire est nettoyé avec un filtre de taille passe haut pour éliminer le bruit d'un volume inférieur à celui d'une cellule rétinienne. Le nettoyage de la segmentation est effectué avec le package MorphoLibJ dans FIJI (Legland et al. 2016; Rueden et al. 2017; Schindelin et al. 2012).

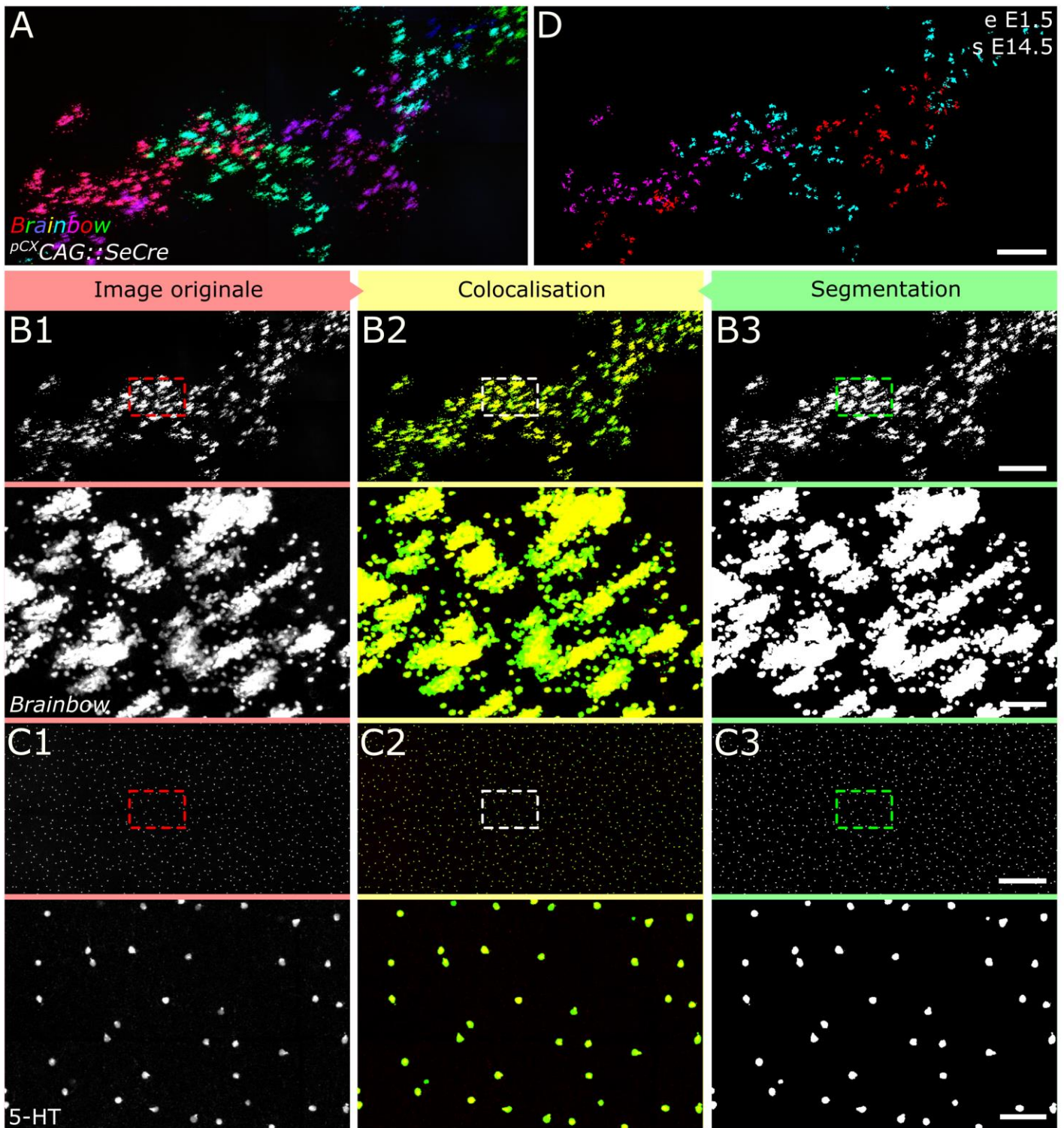


Figure 31 – Qualité de la segmentation

A - Projection maximale en face de la partie de l'INL contenant les AC d'une portion de rétine à E14.5 marquée avec les *MAGIC Markers*, imagée en 3D par microscopie confocale. B & C - Projections maximales des canaux Brainbow (B, fusionnés en un canal unique en niveaux de gris) et rouge lointain (C, correspondant ici au marquage IHC contre 5-HT) de la région présentée en A. La première rangée d'images représente la région entière, la deuxième rangée représente un élargissement de la sous-région encadrée par des tirets. Image originale à gauche, masque de segmentation à droite, et colocalisation entre les deux en fausses couleurs au centre. D - Coupe optique unique (épaisseur 1,64 μm) au niveau des AC 5-HT⁺. La surface des clones exprimant des combinaisons complexes de *MAGIC Markers* a été indiquée en fausses couleurs à partir de la segmentation présentée en B.

(Barres d'échelle : A & D - 200 μm, B & C région - 300 μm, B & C élargissement - 50 μm)

On obtient pour chaque région deux masques binaires correspondant à la segmentation des *MAGIC Markers* et de l'IHC dont chaque pixel peut prendre deux valeurs : 0 s'il appartient au fond, 1 s'il appartient à une cellule (signal). Il suffit ensuite de multiplier entre eux les deux canaux pour obtenir un nouveau canal contenant uniquement les cellules marquées à la fois avec les *MAGIC Markers* et l'IHC. En théorie, on pourrait alors appliquer une nouvelle étape de nettoyage basée sur des paramètres de taille, de circularité et de remplissage, avant de déterminer automatiquement le nombre de cellules co-marquées et leur centroïde dans l'espace 3D. On pourrait également développer un algorithme permettant d'adresser chaque cellule co-marquée au bon clone dans la région en se basant sur la position des couleurs de ce clone dans l'espace RGB.

Ces étapes pourront être implémentées dans le futur. A ce stade de développement des étapes de traitement, le canal des cellules co-marquées est fusionné avec l'image 3D originale. Les cellules sont ensuite manuellement adressées aux différents clones. Ceci permet de garder un contrôle visuel de la segmentation et de la colocalisation. On choisit des paramètres qui évitent les faux négatifs : segmentation légèrement surestimée du signal IHC et peu de nettoyage des canaux binaires obtenus. On génère ainsi des faux positifs qui sont éliminés manuellement mais on évite de passer à côté de cellules co-marquées.

Le processus de traitement des images décrit ci-dessus pourra par la suite être affiné. Les images traitées et analysées dans cette thèse pourront servir de lot d'entraînement pour automatiser complètement ce genre d'analyse.

IV.1.4) Qualité de la segmentation

On peut vérifier la qualité de la segmentation en fusionnant l'image originale, correspondant au canal IHC ou RGB fusionné, avec l'image segmentée (**figure 31**).

On peut voir que les trois canaux fusionnés des cellules marquées avec les *MAGIC Markers* représentent fidèlement le marquage total avec une variabilité limitée de l'intensité de la fluorescence (**figure 31 A & B1**). La colocalisation des canaux originaux et segmentés, respectivement codés en rouge et vert, résulte en des cellules essentiellement jaunes, ce qui indique une excellente fidélité de la segmentation (**figure 31 B**). On ne voit aucun pixel rouge, indiquant qu'il n'y a pas de sous-segmentation de certaines régions. On peut cependant voir des pixels verts au bord des cellules, ce qui pourrait indiquer une surestimation de la segmentation. Cette surestimation est susceptible de créer quelques faux positifs dans la colocalisation mais ceux-ci peuvent être facilement éliminés de manière automatique ou

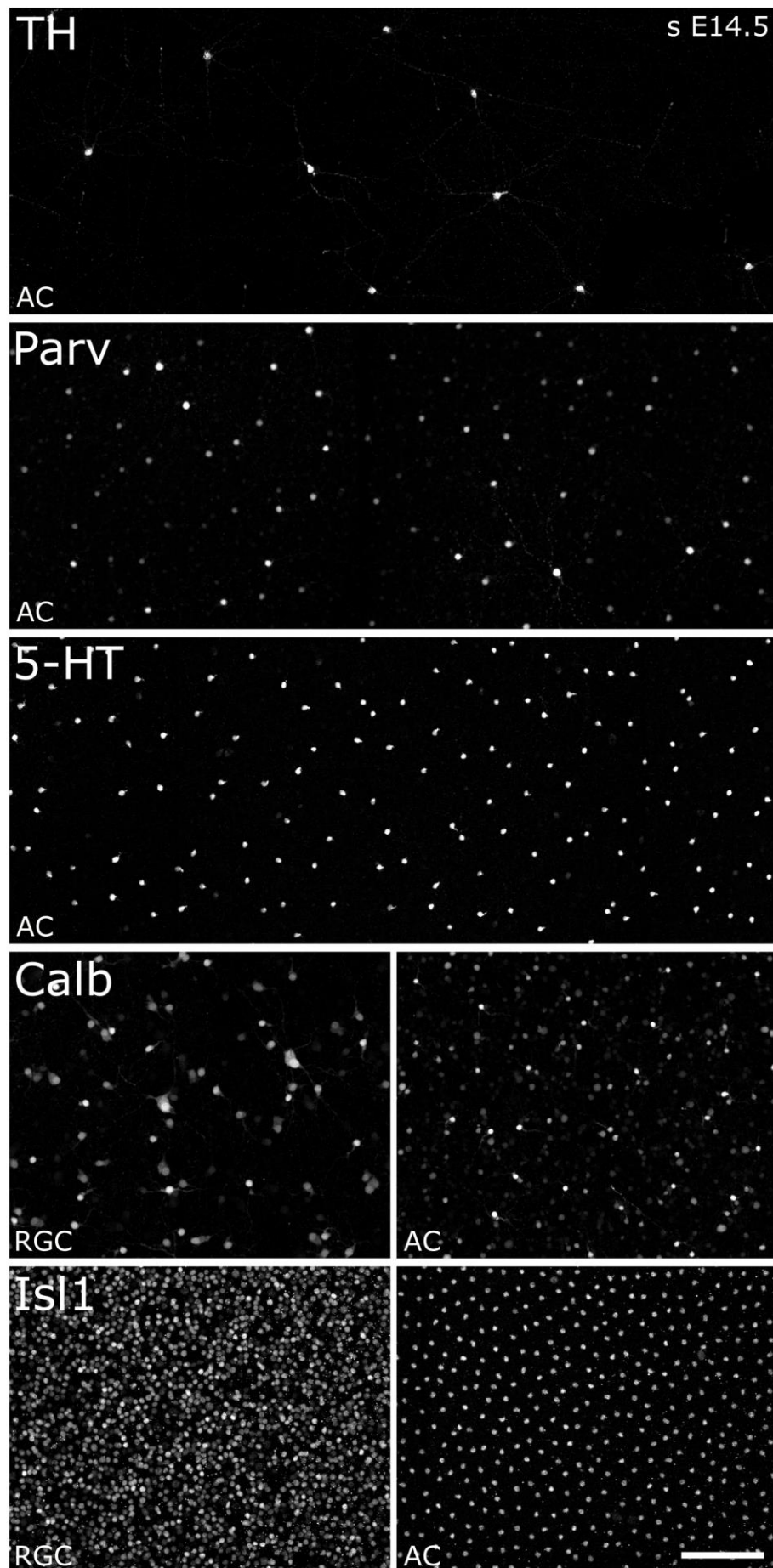


Figure 32 – Présentation des marqueurs de types neuronaux rétiniens choisis

Projection maximale en vue en face de la couche des AC (et éventuellement de la RGL) pour les cinq marqueurs étudiés.

(Barre d'échelle : 100 μ m)

manuelle. Cette estimation à la hausse pourrait être plus problématique pour l'estimation de la taille des clones d'après leur surface.

IV.2) Marqueurs choisis

Cinq marqueurs ont été choisis pour cette étude :

- Tyrosine Hydroxylase (TH), marqueur d'un type d'AC (cellules dopaminergiques),
- Parvalbumine (PV), marqueur d'un type d'AC,
- 5-HT, marqueur d'un type d'AC (cellules sérotoninergiques),
- Calbindin (Calb), marquant des sous-populations de RGC et d'AC,
- Islet 1 (Isl1), facteur de transcription connu pour marquer une sous-population de RGC ainsi que les AC et dAC cholinergiques dans la région interne de la rétine.

Cet ensemble de marqueurs a été déterminé après plusieurs tests d'anticorps. Il cible des populations de cellules plus ou moins denses dans la rétine de poulet : certains marqueurs définissent des types rétiniens individuels tandis que d'autres marquent des sous-populations plus larges. Des marquages immunohistochimiques contrôles ont été réalisés en utilisant des co-marqueurs connus pour mieux caractériser ces différentes populations dans la rétine aviaire (**figure 32**).

IV.2.1) Relation entre les marqueurs d'AC sélectionnés

Des co-marquages ont été réalisés entre d'un côté les marqueurs choisis et de l'autre AP2 α , un marqueur d'une fraction importante des AC. Certains anticorps incompatibles n'ont pas rendu possibles la réalisation de toutes les combinaisons. Les images sont présentées ici pour mieux documenter la morphologie et la position des cellules étudiées dans la rétine du poulet (**figure 33**). On observe que les marqueurs TH; 5-HT et Isl1 ne colocalisent pas avec AP2 α dans les cellules amacrines (**figure 33 A, B & D**). Certaines AC Calb⁺, par contre, sont également AP2 α ⁺ (**figure 33 C**).

On peut voir d'après leur localisation et leur morphologie, quand le marqueur n'est pas nucléaire, que toutes ces cellules sont bien des amacrines, en accord avec la littérature. Tout cela bien que seules certaines cellules Calb⁺ colocalisent également avec AP2 α , censé marquer un grand nombre d'AC.

Par ailleurs, ces observations indiquent que les cellules amacrines de poulet sont réparties sur la partie la plus interne de l'INL, ce qui permet de restreindre l'imagerie à cette sous-couche

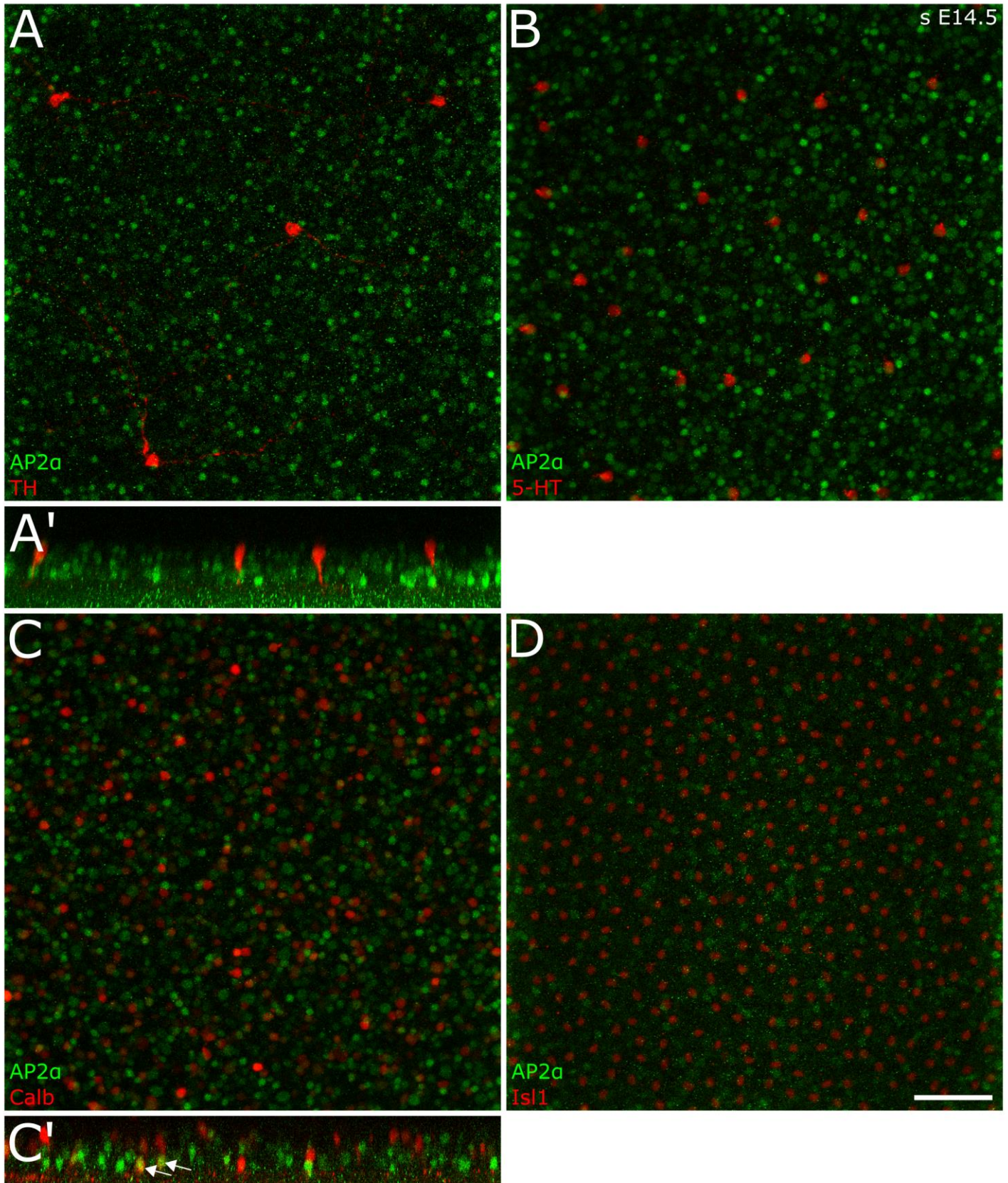


Figure 33 – Caractérisation des marqueurs de cellules amacrines

Co-marquage des marqueurs de type ou sous-population choisis avec le marqueur d'AC AP2α. A - Projection maximale des couches contenant les AC AP2α⁺ et TH⁺. Aucune colocalisation n'est visible. A' - Projection maximale radiale partielle de la rétine en A. On voit que les deux populations n'appartiennent pas à la même couche. B - Projection maximale des couches contenant les AC AP2α⁺ et 5-HT⁺. Aucune colocalisation n'est visible. C - Projection maximale des couches contenant les AC AP2α⁺ et Calb⁺. C' – Projection maximale radiale partielle de la rétine en C. Certaines cellules colocalisent (flèches blanches). D - Projection maximale des couches contenant les AC AP2α⁺ et Isl1⁺. Aucune colocalisation n'est visible. (Barre d'échelle : 50 μm)

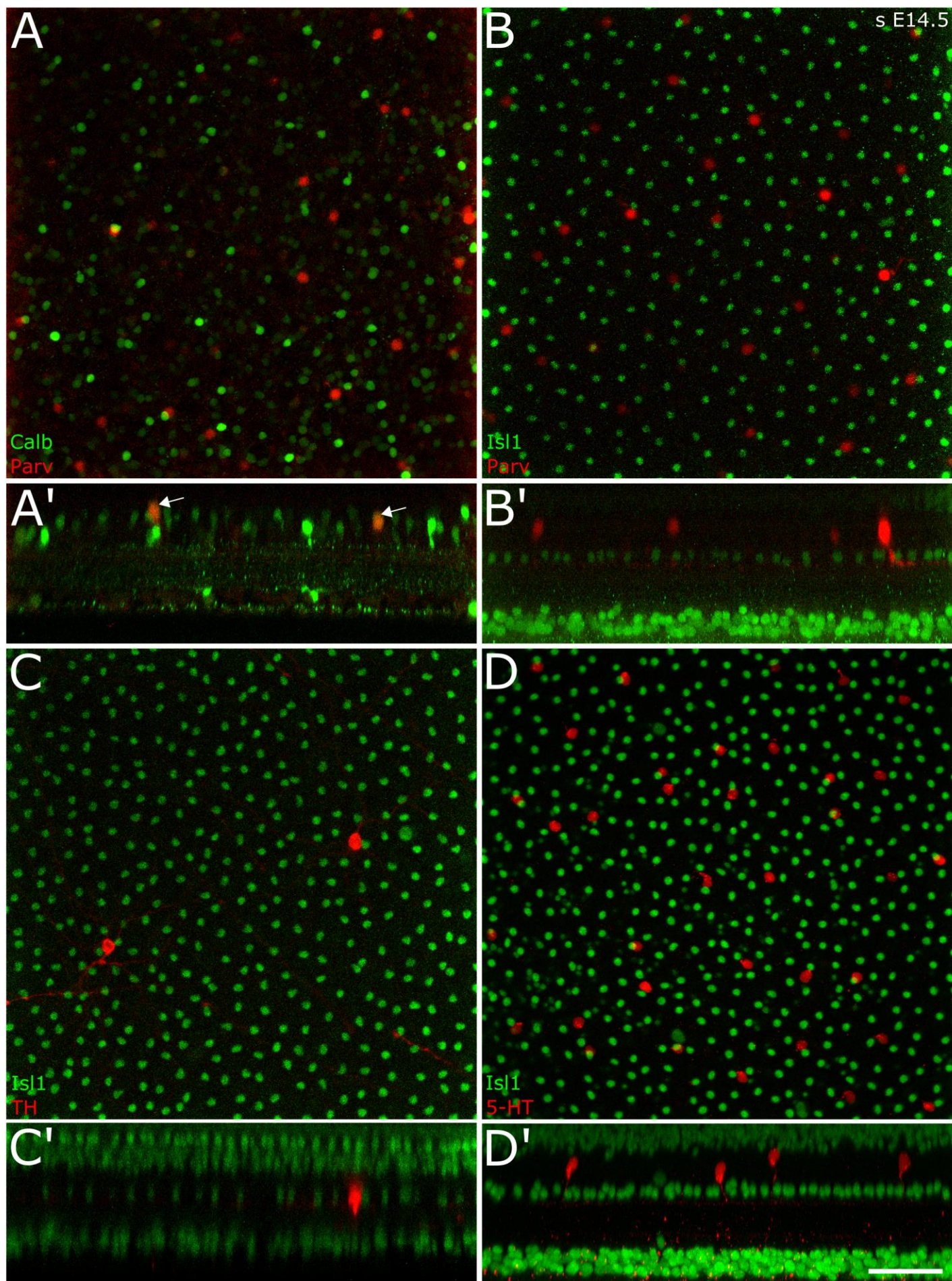


Figure 34 – Tests de colocalisation des marqueurs de cellules amacrines
(légende sur la page suivante)

pour les étudier. De manière intéressante, elles semblent aussi présenter une stratification spécifique de leur corps cellulaire en fonction de leur identité.

On a également effectué les co-marquages possibles entre marqueurs de sous-populations : Calb et Isl1, et les marqueurs de types d'AC : TH, PV et 5-HT. On peut voir que certaines cellules PV⁺ sont également Calb⁺ (**figure 34 A**). Ceci nous indique que les neurones PV⁺ constituent en partie un sous-groupe Calb⁺. L'observation conjointe de cellules PV⁺/Calb⁻ nous indique qu'il existerait au moins deux types d'amacrines différents au sein de la sous-population PV⁺.

Les autres marqueurs testés ne montrent aucune colocalisation entre Isl1 et les marqueurs PV, TH et 5-HT, respectivement (**figure 34 B, C & D**). Nous pouvons ainsi révéler cinq sous-populations d'AC essentiellement distinctes les unes des autres avec les marqueurs choisis.

IV.2.2) Relation entre les marqueurs de RGC sélectionnés

Pour les deux marqueurs de sous-population de RGC sélectionnés, Calb et Isl1, des expériences de co-marquage ont aussi été réalisées. Tandis que les AC Isl1⁺, présentes sur un niveau de l'INL, ne colocalisent pas avec les amacrines Calb⁺, présentes sur deux niveaux de l'INL (**figure 35 A1 & A2**), au niveau de la RGL par contre, on discerne trois sous-populations de cellules dans lesquels ces marqueurs intersectent : Isl1⁺/Calb⁻, Isl1⁺/Calb⁺ et Isl⁻/Calb⁺ (**figure 35 A4**).

Enfin, nous avons réalisé un co-marquage d'Isl1 et Calb, respectivement, avec RBPMS, un marqueur de toutes les RGC, y compris les RGC déplacées (dRGC) présentes dans la partie inférieure de l'INL (**figure 35**). On peut voir qu'Isl1 marque des RGC et des AC (**figure 35 B**). Isl1 marque également les dRGC (identifiables car RBPMS⁺) dans l'INL (**figure 35 B1**,

Figure 34 – Tests de colocalisation des marqueurs de cellules amacrines

Expériences de co-marquage IHC entre les marqueurs d'AC étudiés (TH, PV et 5-HT) et les marqueurs de sous-populations Calb et Isl1. A - Vue en face d'une portion de rétine à E14.5 correspondant à la projection maximale des couches contenant les AC Calb⁺ et PV⁺. A' - Projection maximale radiale partielle de la rétine montrée en A. Plusieurs exemples de cellules PV⁺/Calb⁺ sont visibles (flèches blanches). B - Projection maximale en face des couches contenant les AC Isl1⁺ et PV⁺. Aucune colocalisation n'est visible. B' - Projection maximale radiale partielle de la rétine présentée en B. On voit que les deux populations ne sont pas localisées dans la même sous-couche. C - Projection maximale en face des couches contenant les AC Isl1⁺ et TH⁺. C' - Projection maximale radiale partielle de la rétine montrée en C. Les deux populations appartiennent à la même couche mais ne colocalisent pas. D - Projection maximale en face des couches contenant les AC Isl1⁺ et 5-HT⁺. Aucune colocalisation n'est visible. D' - Projection maximale radiale partielle de la rétine en D. On voit que les deux populations n'appartiennent pas à la même couche. (Barre d'échelle : 50 µm)

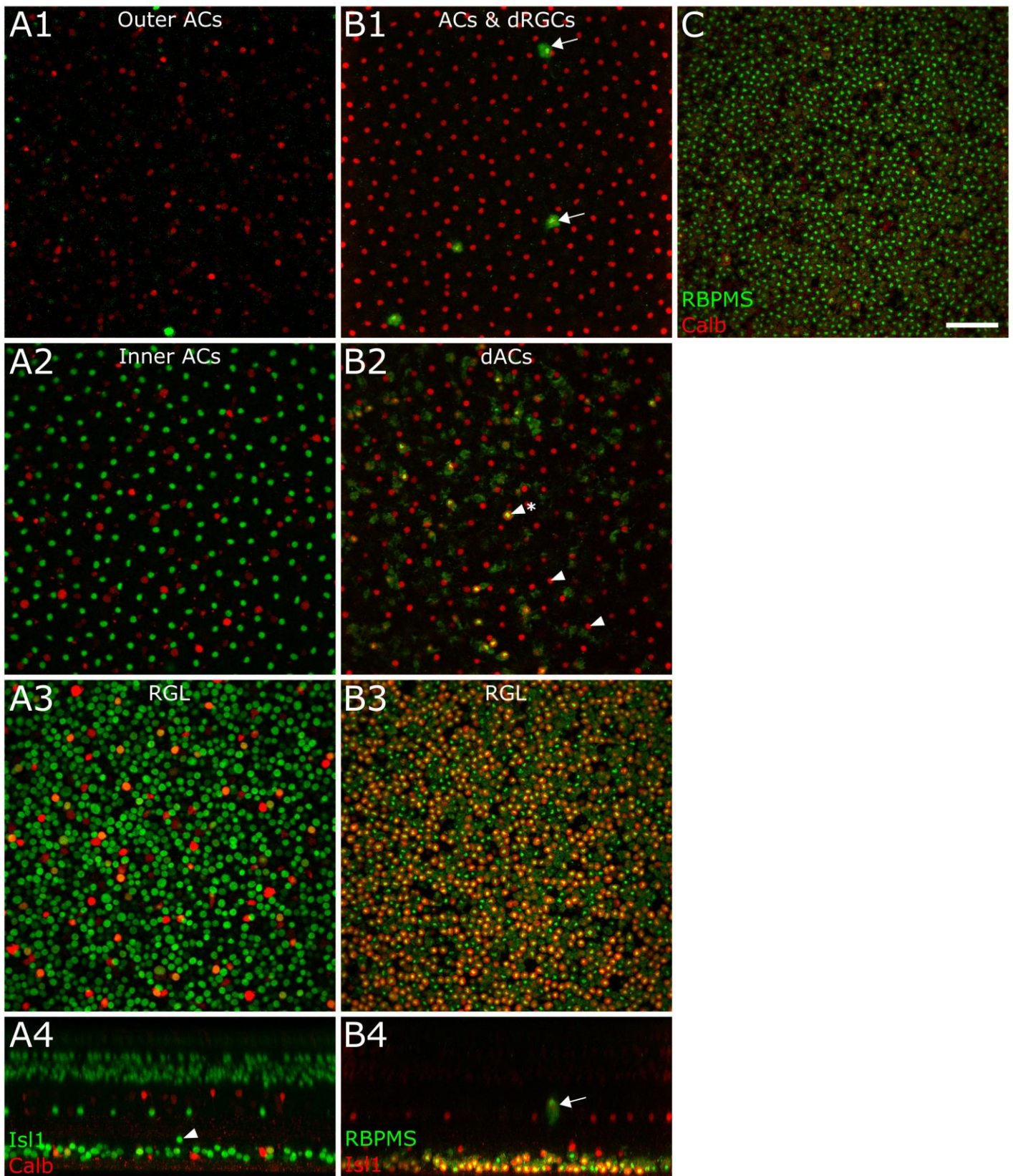


Figure 35 – Caractérisation des marqueurs de cellules ganglionnaires

Expériences de co-marquage immunohistologique avec les marqueurs de RGC choisis (Calb et Isl1) ainsi qu'avec le marqueur pan-RGC RBPMS. A - Co-marquage Isl1 (vert) et Calb (rouge). A1 & A2 - Projections maximales à deux niveaux différents de la partie de l'INL contenant les AC. Les AC Isl1⁺ et Calb⁺, respectivement présentes dans un et deux niveaux de l'INL, forment des populations distinctes. A3 - Projection maximale de la RGL. On peut discerner trois sous-populations de cellules : Isl1⁺/Calb⁻, Isl1⁺/Calb⁺ et Isl1⁻/Calb⁺. A4 - Projection maximale radiale de la portion de rétine présentée en A.

(suite sur la page suivante)

flèches blanches) ainsi que les dAC (RBPMS⁻) dans la partie externe de la RGL (**figure 35 B2**, pointes blanches). Les AC et dAC Isl1⁺ sont censés correspondre aux cellules cholinergiques exprimant le marqueur ChAT. Malheureusement, il n'a pas été possible à ce jour de trouver un anticorps primaire anti-ChAT fonctionnant chez le poulet pour confirmer ce point.

Enfin, bien que l'IHC soit de mauvaise qualité, le marqueur Calb semble bien colocaliser avec RBPMS dans la RGL (**figure 35 C**). Les dAC sont Isl1⁺/Calb⁻ d'après leur localisation et la comparaison des différents co-marquages (figure 21 A4, pointe blanche). Cela suggère fortement que Calb marque uniquement des RGC dans la RGL et des AC dans l'INL interne.

IV.3) Distribution des types d'AC dans les clones issus de RPC précocement marquées

IV.3.1) Distribution des marqueurs de sous-populations d'AC dans les clones

Pour chercher un biais éventuel dans la répartition des différents types et sous-populations d'AC définis ci-dessus dans les clones issus de RPC en prolifération, on électropore à E1.5 des embryons de poulets avec les *MAGIC Markers* et la *SeCre*. On récupère les rétines des embryons sacrifiés à E14.5 et on les traite avec les procédures d'IHC et de clarification présentées plus haut (IV.1)). Afin d'analyser des clones uniques, on s'intéresse exclusivement à ceux exprimant la combinaison d'au moins deux protéines fluorescentes de couleurs différentes. Toutes les cellules exprimant à la fois les *MAGIC Markers* et le marqueur immunohistochimique ont été pointées et dénombrées pour tous les clones satisfaisants la condition d'expression d'une combinaison de couleurs minimale.

Pour la couche de l'INL contenant les AC (et les dRGC), la surface du clone a été segmentée au niveau de l'INL auquel les cellules marquées en immunohistochimie occupent une surface maximale (**figure 31 D**). Compter toutes les cellules de cette couche serait une source d'erreur substantielle à cause de leur taille et leur chevauchement. À la place, les mesures de surface

Figure 35 – Caractérisation des marqueurs de cellules ganglionnaires

(suite) B - Co-marquage RBPMS (vert) et Isl1 (rouge). B1 - Projection maximale de l'INL au niveau des AC et des dRGC. Les grosses cellules Isl1⁺ sont également RBPMS⁺ et sont donc des dRGC (flèches blanches). B2 - Projection maximale de la partie externe de la RGL. On observe qu'Isl1 marque à la fois des RGC (cellules RBPMS⁺, pointe de flèche blanche avec astérisque) et des dAC (cellules RBPMS⁻, pointe de flèche blanche). B3 - Projection maximale de la RGL. On observe qu'Isl1 marque une partie importante des RGC mises en évidence avec RBPMS. B4 - Projection maximale radiale de la portion de rétine présentée en B. C - Co-marquage RBPMS et Calb, projection maximale de la RGL. Les cellules Calb⁺, toutes positives pour RBPMS, sont bien des RGC.
(Barre d'échelle : 50 µm)

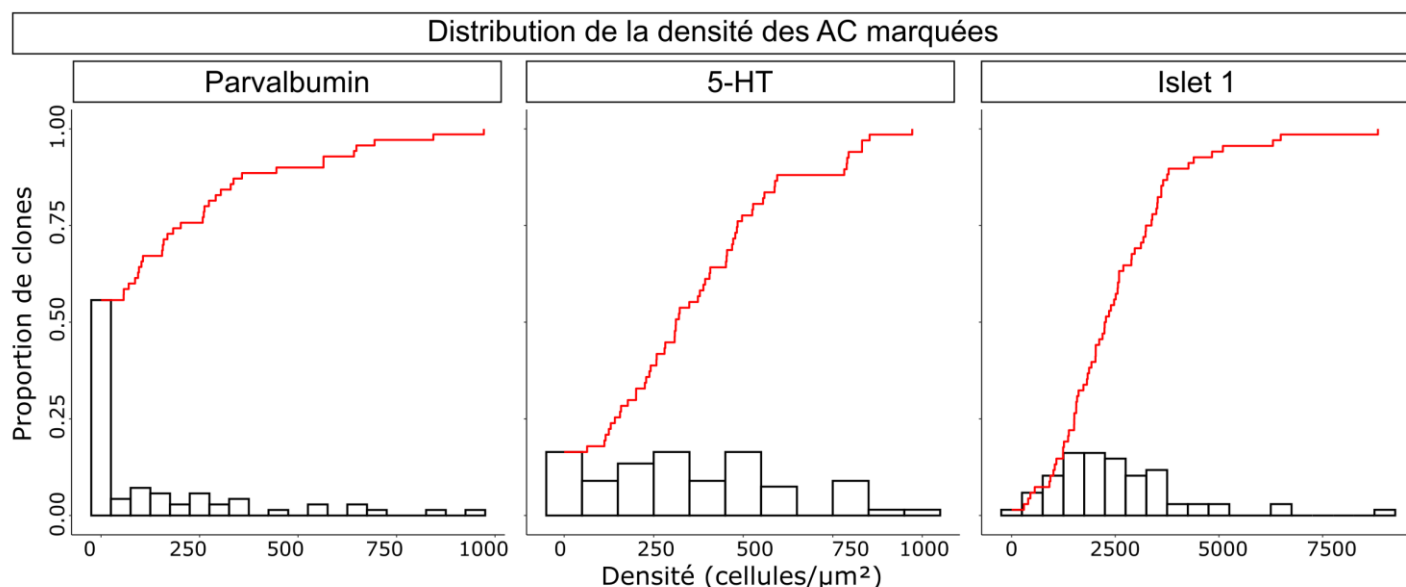


Figure 36 – Distribution des trois types d'AC étudiés dans les clones identifiés avec les *MAGIC Markers*

Histogrammes (en noir) et distribution cumulative (en rouge) présentant la distribution de la densité des trois types d'AC étudiés (PV, 5-HT et Isl1) dans les clones identifiés par les *MAGIC Markers*. La densité du marqueur étudié dans un clone (nombre de cellules positives par unité de surface du clone, mesurée par segmentation de la zone exprimant les *MAGIC Markers* dans la couche des AC) est utilisée pour approximer la proportion d'AC du clone qui expriment ce marqueur. On observe pour le marqueur PV (le moins dense) une très forte proportion de clones ne contenant aucune AC positive et, à l'inverse, la présence de clones présentant une forte densité d'AC positives. Le même type de biais est présent dans une moindre mesure pour le marqueur 5-HT (de densité plus forte), tandis que le marqueur Isl1 présente une distribution rappelant d'avantage une gaussienne.

(PV : n = 70 clones répartis sur N = 7 rétines ; 5-HT : n = 67 & N = 8 ; Isl1 : n = 68 & N = 9)

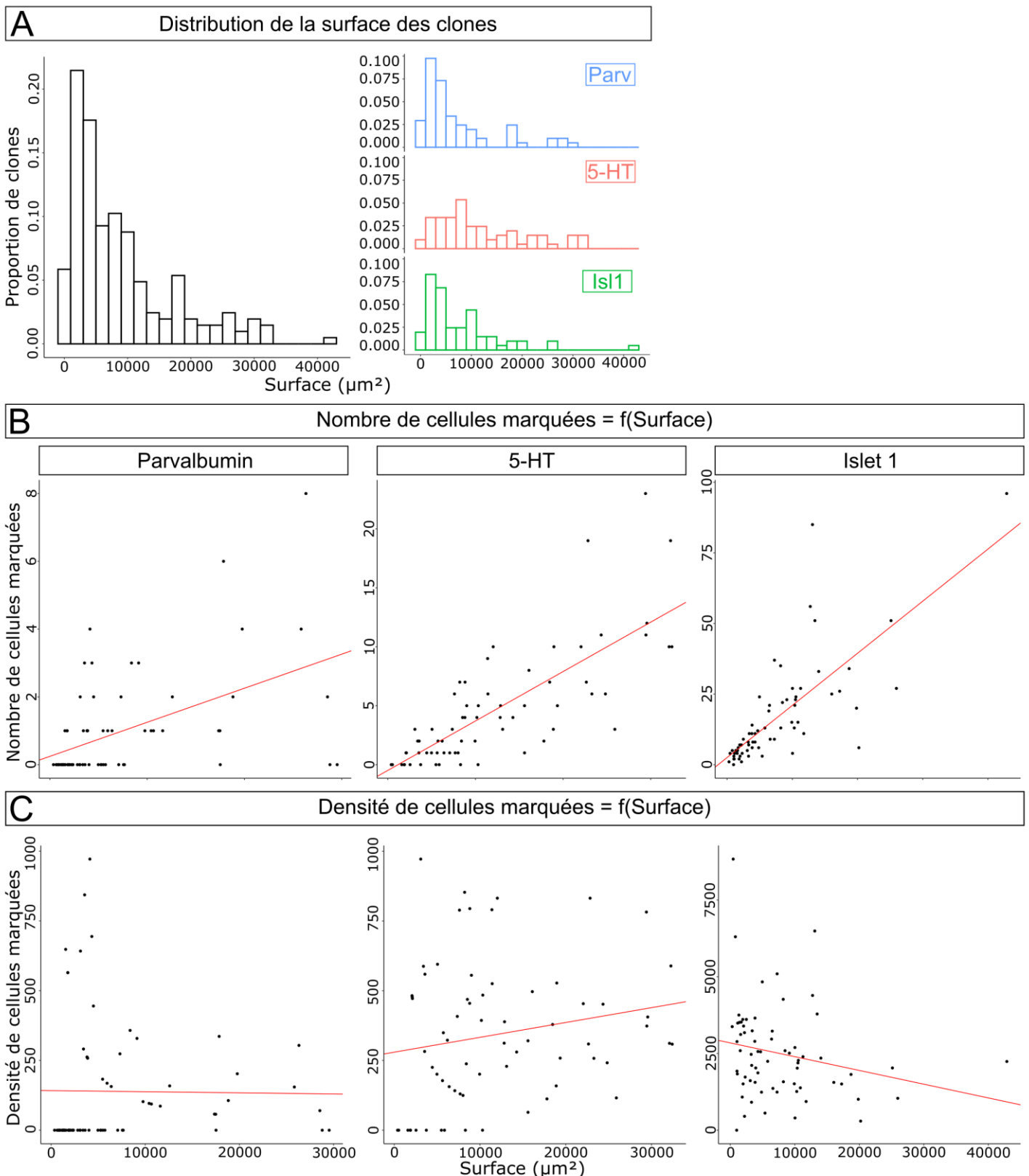


Figure 37 – Corrélation entre taille des clones et nombre d'AC marquées

A - À gauche, histogramme de la distribution de la surface des différents clones analysés pour toutes les conditions (mesurée par segmentation dans la couche des AC de la zone exprimant les MAGIC Markers, proportionnelle au nombre total d'AC du clone) ($n = 205$ clones répartis sur $N = 24$ rétines). À droite, histogrammes séparés par condition de marquage (IHC anti-PV, 5-HT ou Isl1) de la distribution présentée à gauche. B - Graphe en nuage de points (en noir) et régression linéaire (en rouge) présentant le nombre de cellules marquées dans un clone en fonction de sa taille, pour chacune des trois conditions de marquage. Comme attendu, plus les clones sont grands, plus ils contiennent d'AC du type étudié. Un groupe de clones négatifs est apparent pour les deux marqueurs les moins denses. C - Graphe en nuage de points (en noir) et régression linéaire (en rouge) présentant la densité de cellules marquées dans un clone en fonction de sa taille pour chacune des trois conditions de marquage.

(PV : $n = 70$ clones répartis sur $N = 7$ rétines ; 5-HT : $n = 67$ & $N = 8$; Isl1 : $n = 68$ & $N = 9$)

permettent de comparer efficacement et rapidement la taille des clones marqués. La distribution de la densité des AC TH⁺, PV⁺ et Isl1⁺ a ainsi été calculée en divisant le nombre de cellules positives dans chaque clone par sa surface. La densité est présentée sous forme d'histogrammes (**figure 36**).

On peut voir que les distributions obtenues ne ressemblent pas à une loi de distribution évidente au premier abord. Au lieu de décroître régulièrement et rapidement comme on pourrait s'y attendre dans le cas d'une détermination stochastique d'un évènement à probabilité faible, les histogrammes de la distribution des types PV et 5-HT sont anormalement « plats ». Ils montrent des proportions de clones à faible et forte densité du marqueur étudié assez similaires au lieu d'une relation décroissante. La distribution du marqueur Isl1 semble en revanche d'avantage proche d'une Gaussienne. Ces observations révèlent-elles l'existence de biais de lignage dans la détermination des types d'AC ?

IV.3.2) Lien entre taille des clones et nombre de cellules des types étudiés

On peut apprécier la distribution de la surface des clones pour toutes les conditions de marquage réalisées (IHC anti PV, 5-HT ou Isl1) prises ensemble et séparément (**figure 37 A**). Si la génération des types suit l'hypothèse H₀ (indépendance des choix de destinée en fin de lignage), on s'attend à ce que le nombre de cellules marquées dans chaque clone soit directement corrélé à sa taille.

Pour évaluer cet aspect, nous avons réalisé des graphes montrant le nombre de cellules positives pour les marqueurs étudiés en fonction de la surface des clones (**figure 37 B**). Un test de corrélation de Pearson entre ces deux paramètres a été effectué (**Table 4**).

Type	PV	5-HT	Isl1
Coefficient r	0,498	0,774	0,758
de Pearson			
IC à 95 %	0,298 - 0,656	0,657 - 0,856	0,634 - 0,844
Coefficient	0,248	0,600	0,574
R²			
p-value	1,15.10 ⁻⁵	1,45.10 ⁻¹⁴	7,55.10 ⁻¹⁴

Table 4 - Résultats de la corrélation de Pearson dans l'INL

On peut voir qu'il existe une assez bonne corrélation entre taille et nombre de cellules marquées pour les marqueurs 5-HT et Isl1. Le coefficient de ces corrélations est supérieur à

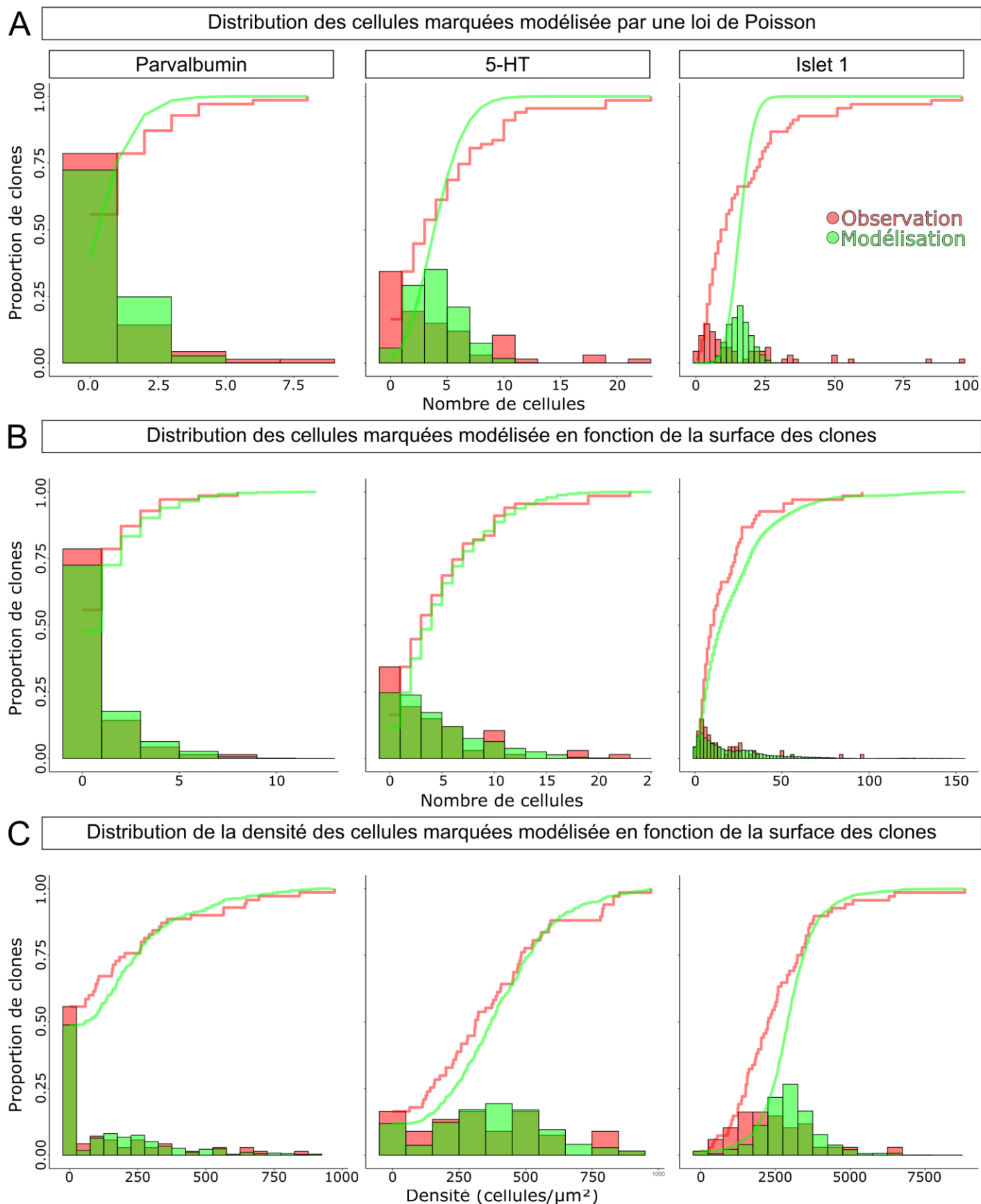


Figure 38 – Modélisation de la distribution des différents types d'AC dans les clones

Présentation de différentes modélisations du nombre de cellules positives et de la densité de ces cellules dans les clones pour chacun des trois marqueurs d'AC étudiés (PV, 5-HT et Isl1). Les données observées (histogramme de la distribution et distribution cumulative) sont présentées en rouge. Les distributions modélisées sont en vert.

A - Modélisation du nombre de cellules positives par une loi de Poisson ayant pour paramètre le nombre moyen de cellules positives observées pour tous les clones. B - Modélisation du nombre de cellules positives pour chaque clone en prenant en compte sa taille et la densité théorique du marqueur considéré. C - Densité des cellules marquées par clone, calculée à partir de la simulation en B. Le modèle semble fonctionner avec succès pour PV et 5-HT, pas pour Isl1. Ceci indiquerait un biais uniquement dans le développement des AC Isl1⁺.

au moins 0,65 et 0,63, respectivement, d'après l'intervalle de confiance à 95%. La p-value très faible (inférieure à 1.10^{-13}) confirme la validité du test.

Pour le marqueur PV en revanche, l'intervalle de confiance à 95% indique un coefficient de corrélation compris entre 0,30 et 0,66 : il existe donc possiblement une corrélation mais elle est plus faible que pour 5-HT et Isl1. La p-value, faible (inférieure à 1.10^{-4}), confirme également la validité du test.

Il semble logique que le nombre de cellules d'un type d'AC donné présents dans un clone soit corrélé à sa taille. Néanmoins, les coefficients de corrélation moyens à faibles obtenus semblent indiquer que la taille n'est pas ici le seul paramètre permettant de prédire le nombre de cellules positives dans un clone. Ceci inciterait à nous faire rejeter l'hypothèse H_0 .

Le grand nombre de clones à 0 cellules pourrait néanmoins fausser le test de corrélation et la régression linéaire pour les marqueurs les moins denses comme PV.

La densité des trois marqueurs d'AC étudiés en fonction de la surface des clones est représentée (**figure 37 C**). On s'attend alors, dans le cas d'une distribution stochastique et indépendante (hypothèse H_0), à ce que les valeurs soient resserrées autour d'une droite de coefficient directeur nul. On pourrait éventuellement observer des points plus dispersés pour les petits clones susceptibles de capturer un effet d'échantillonnage. Or on observe une grande diversité dans les valeurs de densité dans les grands clones, en particulier pour le marqueur 5-HT.

Ces résultats semblent indiquer la présence d'un biais dans les potentialités des RPC à donner un certain type. Ce biais constituerait alors un deuxième paramètre qui, s'il peut être modélisé, permettrait avec la taille de prédire la distribution du nombre de cellules marquées dans un clone.

IV.3.3) Tentative de modélisation

Si le choix d'identité de type des AC est un événement stochastique et indépendant (hypothèse H_0), on peut représenter cet événement comme une expérience de Bernoulli avec une probabilité p de générer le type d'intérêt, et une probabilité $(1-p)$ de générer un autre type. Cette expérience est réalisée un nombre n de fois correspondant au nombre d'AC du clone dans la couche où se localise le type étudié. La distribution du nombre de cellules d'un type

donné dans chaque clone suivrait alors une loi binomiale de paramètres (n, p) . Or, p est faible. On peut l'estimer inférieure à $1/30$, étant donné qu'il y aurait au moins 30 types de cellules amacrines (néanmoins cela dépend de la fréquence du type considéré). Par ailleurs, n est grand : on peut en effet compter jusqu'à plusieurs centaines d'AC dans un clone issu d'une RPC proliférative. On peut alors approximer la distribution des types d'AC dans les clones par une loi de Poisson de paramètre $\lambda = p \cdot n$ pour des clones de taille donnée.

C'est ce qui a été tenté dans un premier temps pour modéliser la distribution du nombre de cellules positives pour les marqueurs de types (**figure 38 A**, rouge - valeurs observées, vert - valeurs modélisées). La valeur λ est égale au nombre moyen de cellules positives par clone pour la condition de marquage étudiée. Cette distribution est cependant en partie inexacte, elle correspond à celle d'un ensemble de clones qui feraient tous la même taille, à savoir la moyenne des surfaces mesurées pour la condition. On voit clairement que cette modélisation ne fonctionne pas pour les types les plus denses comme 5-HT et Isl1. Elle est par contre déjà assez bonne pour le marqueur le plus épars étudié, PV. Ceci peut être expliqué par la faible valeur de p dans le cas d'une faible densité : le paramètre n a alors moins d'influence sur la valeur de λ .

Idéalement, il faudrait donc modéliser la distribution de la surface des clones. On pourrait alors tirer au hasard un clone de surface S_i puis tirer le nombre de cellules d'un type donné dans ce clone en utilisant une loi de Poisson de paramètre $\lambda_i = p \cdot S_i$. (p étant la densité moyenne de cellules par unité de surface). Ou encore $\lambda_i = p \cdot n_i$ (en notant p la proportion moyenne de cellules AC positives pour le marqueur étudié et n_i le nombre total d'AC dans le clone).

La distribution de la surface des clones (**figure 37 A**) pourrait être modélisée avec une estimation par noyau de la densité.

En attendant de trouver une meilleure solution, j'ai modélisé le nombre de cellules adoptant un type donné dans les clones puis leur densité directement à partir des surfaces mesurées pour chaque condition. On peut vérifier que chacune des trois conditions de marquage réalisées contient approximativement toute la diversité des surfaces observée globalement (**figure 37 A**, à droite). Pour chaque clone, je tire aléatoirement cent valeurs possibles du nombre de cellules positives avec une loi de Poisson de paramètre $\lambda = p \cdot S_C$ (en notant p la densité théorique du sous-type (**figure 32**) et S_C la surface du clone).

La distribution du nombre de cellules marquées est représentée sous forme d'histogramme et de distribution cumulative (**figure 38 B**, rouge - valeurs observées, vert - valeurs modélisées). On peut voir que cette fois, les valeurs obtenues sont proches de celles observées.

On calcule ensuite les densités en divisant les nombres de cellules positives par la surface du clone modélisé. La distribution est représentée sous forme d'histogramme et de distribution cumulative sur la figure 38 C (en rouge : valeurs observées, en vert : valeurs modélisées).

Un test de χ^2 a été réalisé entre les distributions observées et modélisées. Les catégories et les effectifs correspondants sont disponibles en annexe (**tables S1 à 3**). Les résultats sont résumés dans la Table 5 ci-dessous :

Marqueur	PV	5-HT	Isl1
χ^2	2,07	4,00	51,3
ddl	3	5	4
p-value	0,558	0,549	$1,95.10^{-10}$

Table 5 - Résultats des tests de X^2 pour la modélisation

Dans le cas du marqueur Isl1, on rejette la distribution modélisée à partir de l'hypothèse H_0 . Avec un score de χ^2 de 51,3 et une p-value estimée très faible, ce rejet est très fiable.

A l'inverse, pour les marqueurs PV et 5-HT, on ne rejette pas les distributions modélisées. La faiblesse des scores de χ^2 ainsi que les valeurs élevées de p-value estimées suggèrent que la répartition de ces marqueurs suit l'hypothèse H_0 d'indépendance.

En conclusion, d'après cette première analyse, la distribution des cellules amacrines Isl1⁺ serait biaisée, tandis que la distribution des cellules amacrines PV⁺ et 5-HT⁺ se ferait de façon indépendante.

Limites

La modélisation est imparfaite. Le tirage de cent clones aléatoires à partir de chaque vrai clone induit un biais dans la distribution des tailles. Il a pour effet d'augmenter le nombre de clones de taille extrême et de diminuer le nombre de clones de taille moyenne. Des clones de taille aléatoire devraient être tirées d'une densité estimée de la distribution. De façon alternative, on pourrait également modéliser la distribution de la surface avec des chaînes de Markov (Sun 2015).

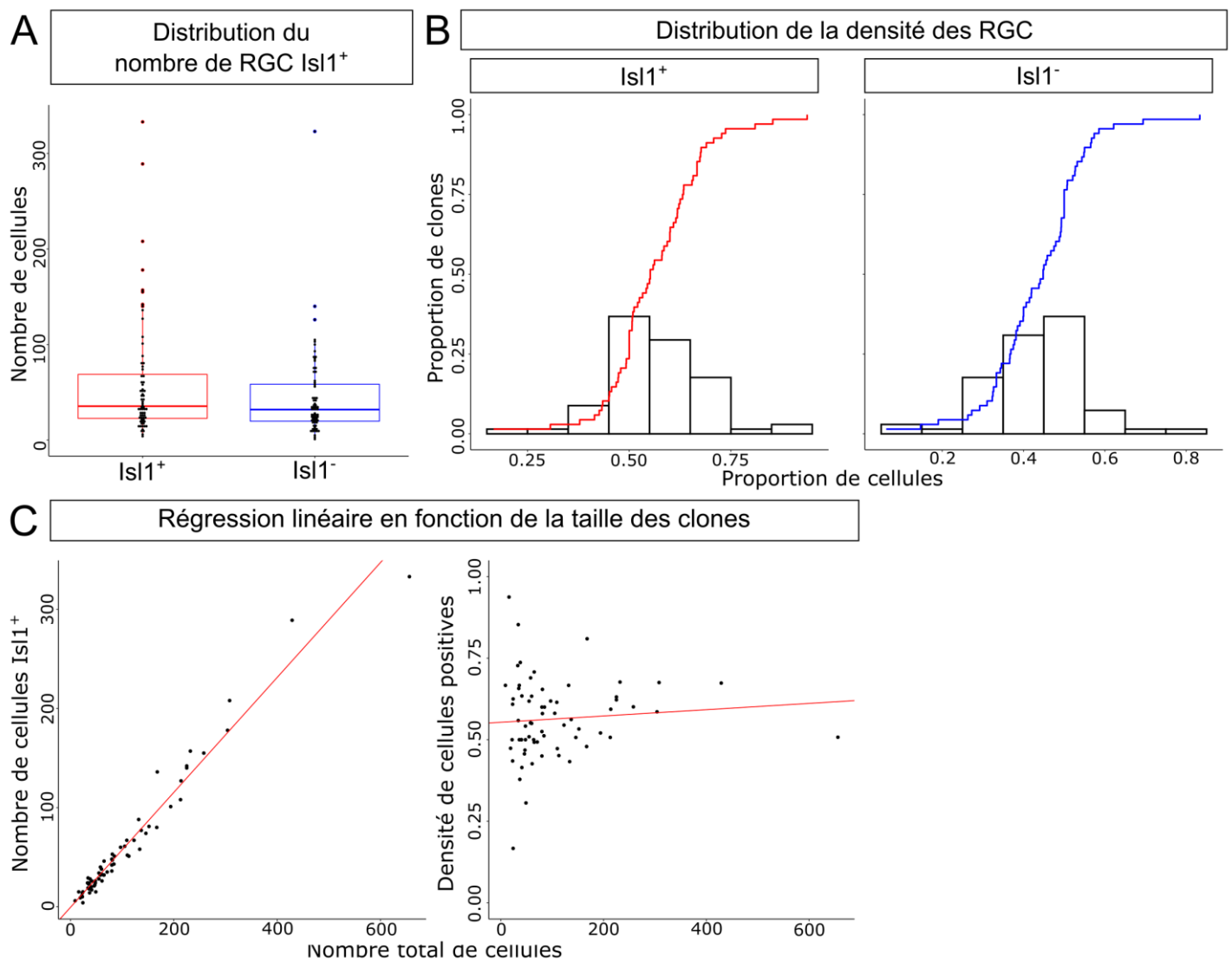


Figure 39 – Distribution du marqueur Isl1 dans les clones au niveau de la RGL

A - Boxplots de la distribution du nombre de RGC et dAC Isl1⁺ et Isl1⁻ dans les clones analysés. Les points observés sont superposés en noir. B - Histogrammes (en noir) et distribution cumulative (en couleur) de la densité de cellules Isl1⁺ et Isl1⁻ dans les clones au niveau de la RGL normalisée par le nombre total de cellules du clone dans cette couche. C - À gauche, graphe présentant pour chaque clone le nombre de cellules Isl1⁺ en fonction du nombre total de cellules présentes dans la RGL (en rouge, régression linéaire). Le nombre de cellules Isl1⁺ augmente linéairement avec le nombre de cellules de la RGL comprises dans les clones. À droite, idem pour la densité de cellules marquées.

(n = 68 clones répartis sur N = 9 rétines)

Le test du χ^2 est normalement conçu pour comparer des distributions discrètes. Un test de Kolomogorov-Smirnov devrait être utilisé pour comparer les deux distributions continues.

Le nombre d'AC par unité de surface de rétine a été quantifié mais pas encore analysé. Le nombre total d'AC dans les clones pourra ainsi être utilisé plutôt que leur surface pour normaliser la densité d'AC marquées. On pourra alors utiliser une loi binomiale de paramètres (n, p) plutôt qu'une loi de Poisson. En effet, pour les types les plus denses (p élevée), une loi de Poisson ne devrait pas être utilisée pour approximer une loi binomiale. Une loi de Poisson a été utilisée car à ce stade c'est la surface, une donnée continue, qui permet d'estimer la taille des clones.

IV.4) Distribution des types de RGC

La distribution des cellules Isl1⁺ présentes dans la RGL (RGC et dAC) a également été analysée (**figure 39**). Dans cette couche, il est possible de compter toutes les cellules appartenant à un clone pour normaliser le nombre de cellules marquées et calculer leur densité sans passer par les mesures de surface effectuées plus haut pour les AC.

La distribution du nombre des cellules Isl1⁺ et Isl1⁻ (**figure 39 A**) semble suivre celle de la taille des clones (**figure 37 A**). Ceci semble se confirmer quand on représente la densité de cellules marquées (**figure 39 B**). On peut voir que les clones contiennent en moyenne 56,4 % de cellules Isl1⁺ dans la RGL (43,6 % de cellules Isl1⁻). La distribution des densités, contrairement aux distributions d'AC observées dans la partie précédente, semble ici suivre une loi statistique unimodale.

Comme mentionné précédemment lors de l'analyse du lignage des types d'AC, on s'attend à ce que le nombre de cellules marquées soit fonction de la seule taille du clone si on suit l'hypothèse H₀. En effet, si la détermination du type a lieu de façon stochastique et indépendante en fin de lignage, il devrait exister une relation linéaire entre le nombre de cellules marquées et le nombre total de cellules dans les clones.

Pour vérifier cette hypothèse, on représente le nombre de cellules marquées ainsi que leur densité en fonction du nombre total de cellules (**figure 39 C**). On réalise un test corrélation de Pearson entre le nombre de cellules marquées et le nombre total de cellules. Le résultat de ce test est résumé ci-après (**table 6**).

Marqueur	Isl1
Coefficient r de Pearson	0,981
IC à 95 %	0,969 - 0,988
Coefficient R²	0,962
p-value	2,20.10 ⁻¹⁶

Table 6 - Résultats de la corrélation de Pearson dans la RGL

Le coefficient de corrélation r est supérieur à 0,95 avec un intervalle de confiance de 95 %. La très faible p-value indique une excellente robustesse de la corrélation. On peut donc affirmer que le nombre de cellules des clones exprimant le marqueur Isl1 peut être prédit par le nombre total de cellules de ces mêmes clones présentes dans la RGL. L'excellente corrélation entre la taille des clones et le nombre de cellules marquées semble indiquer que l'expression d'Isl1 dans la RGL est purement stochastique et indépendante de l'origine clonale des clones considérés.

V] Approche de perturbation de la mosaïque des types neuronaux rétiniens

Tout en cherchant un biais de lignage qui pourrait être à l'origine de l'organisation mosaïque des types neuronaux rétiniens, j'ai également développé une stratégie pour tenter de perturber cette organisation. L'idée est d'augmenter localement la prolifération de quelques RPC pour augmenter la taille de certains clones, ce qui devrait perturber la formation de la mosaïque dans le cas où les RPC présenteraient des potentialités biaisées.

Dans ce but, j'ai induit une surexpression du domaine intracellulaire de Notch (NICD) dans les RPC précoces. NICD désigne la partie intracellulaire du récepteur transmembranaire Notch qui est clivée lors de l'activation du récepteur et pénètre alors dans le noyau où elle interagit avec ses cibles dans l'ADN génomique. Notch est un régulateur bien connu des progéniteurs neuronaux (Pierfelice et al. 2011). En particulier, l'activation de la voie Notch est connue pour maintenir les progéniteurs en prolifération et réprimer leur différenciation (Hämmerle et al. 2011). Des travaux récents chez le poisson zèbre proposent que la voie Notch serait un marqueur des RPC prolifératives qui produisent les différentes RPC neurogéniques (Rulands et al. 2018). Ces mêmes progéniteurs produiraient la glie de Müller via leurs dernières divisions. Il a également été démontré que la voie Notch joue différents rôles à des stades plus tardifs de la rétino-génèse, notamment dans la spécification de la glie de Müller (Jadhav et al. 2006, 2009). L'expression de Notch est aussi importante dans le maintien de la CMZ et les ratios de cellules de différentes classes produites dans cette dernière (Pérez Saturnino et al. 2018). On s'attend donc à ce qu'une surexpression de Notch dans les RPC précoces les maintienne plus longtemps en prolifération.

V.1) Perturbation de la formation de la mosaïque des types rétiniens par surexpression de NICD avec un vecteur iOn

Dans un premier temps, j'ai utilisé le système LiOn pour surexprimer NICD dans la rétine embryonnaire avec un transposon : $^{PB}CAG\propto NICD-2A-RFP$. Ce transposon exprime une RFP qui permet de localiser les cellules perturbées surexprimant NICD. Ce transgène étant intégratif, les RPC perturbées devraient surexprimer NICD de façon permanente. De ce fait, compte tenu des effets connus de NICD, elles ne devraient théoriquement jamais se différencier et être maintenues en prolifération. On s'attend alors à créer une perturbation mécanique de la rétino-génèse et potentiellement de la dispersion tangentielle des RPC.

Si les neurones rétiniens continuent à se positionner de manière mosaïque en bordure des zones perturbées, on pourra en conclure que l'établissement de la mosaïque repose sur des

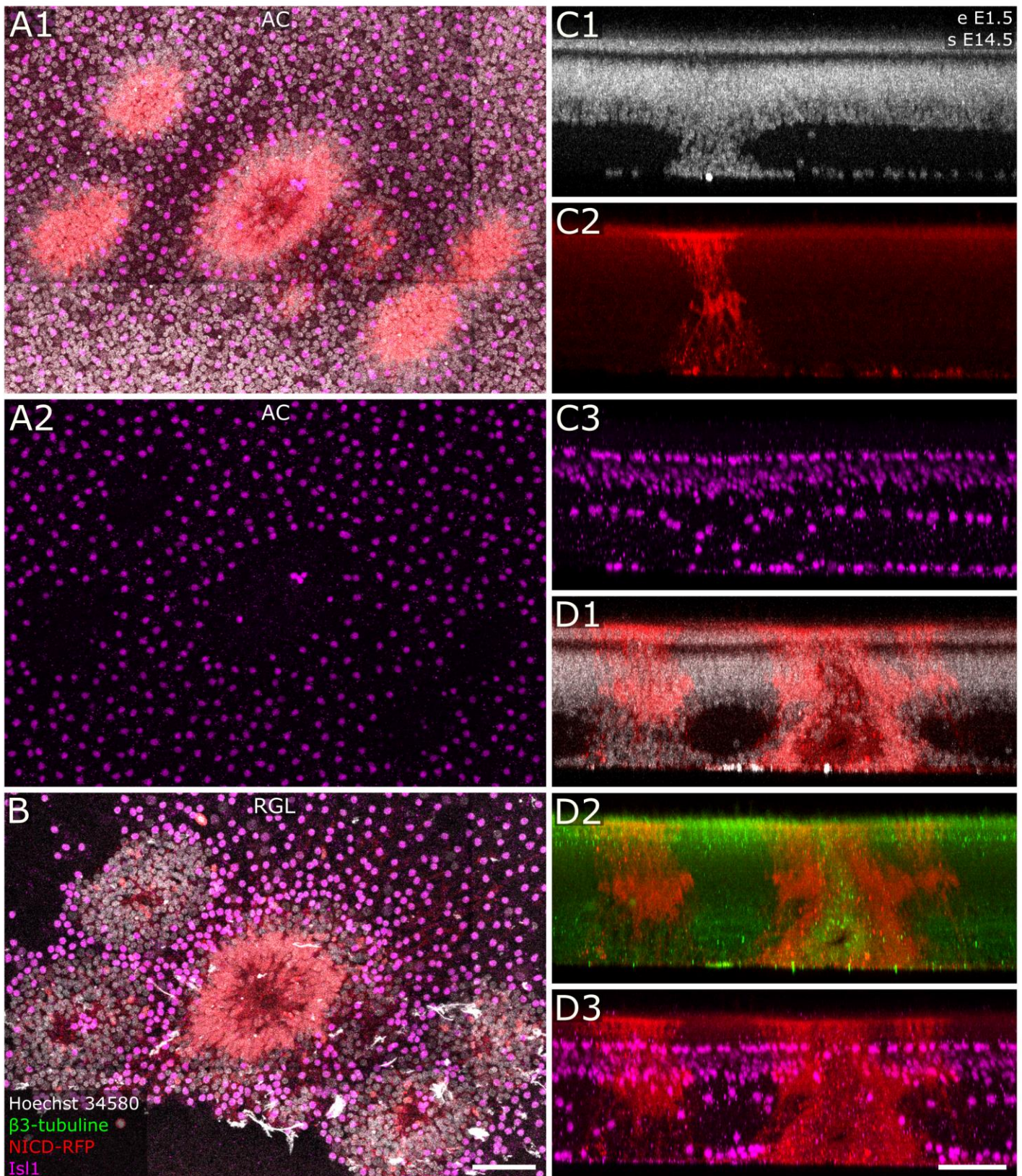


Figure 40 – La surexpression de NICD par un vecteur iOn déforme la mosaïque des sous-types rétiens

Observations de rétines au stade E14.5 électroporées à E1.5 avec un vecteur iOn ^{PB}CAG- α NICD-2A-RFP coexprimant le domaine intracellulaire du récepteur Notch (NICD) et le marqueur RFP. A - Projection maximale de l'INL au niveau des AC Isl1⁺. A1 – Superposition des canaux du contre-marquage nucléaire en gris, NICD-RFP en rouge et Isl1 en magenta. On peut voir plusieurs colonnes de cellules cohésives surexprimant NICD. A2 - Canal Isl seul (magenta). On observe des « trous » dans la mosaïque des AC Isl1⁺ au niveau des cellules perturbées et une perturbation potentielle partielle de cette dernière autour de ces mêmes cellules. B - Projection maximale de la RGL. Superposition des canaux du contre-marquage nucléaire en gris, NICD-RFP en rouge et Isl1 en magenta. C - Projection maximale radiale partielle d'une sous-région essentiellement non perturbée de la région en A et B. C1 - Marquage nucléaire (gris). C2 - Canal NICD-RFP seul (rouge). C3 - Canal Isl1 seul (magenta). (suite de la légende sur la page suivante)

phénomènes tardifs comme des migrations tangentielles limitées. Si, à l'inverse, on observe des accumulations ou déficits de cellules en bordure des zones de perturbation, on pourra au contraire penser que des RPC biaisées se sont retrouvées "coincées" et que les clones qu'elles ont générés n'ont pas pu se disperser correctement.

Pour trancher entre ces deux possibilités, des embryons ont été électroporés à E1.5 selon le protocole habituel avec le transgène ^{PB}*CAG∞NICD-2A-RFP* et une source de PBase. Ces embryons ont ensuite été sacrifiés et leurs yeux prélevés à E8.5 et E14.5. Premier point intéressant, on voit apparaître dans certains yeux un à plusieurs filaments qui traversent l'humeur vitrée. La nature de ces filaments reste à déterminer.

Afin de révéler l'identité des cellules perturbées, un marquage IHC a été effectué contre la β 3-tubuline, classiquement employé pour mettre en évidence les projections des neurones. Un marquage a également été effectué contre Isl1. Ce deuxième marqueur met en évidence une mosaïque d'AC dense et bien organisée dont on souhaite vérifier si elle est perturbée ou non (**figure 32**). Enfin, on réalise également un contre-marquage nucléaire avec du Hoechst 34580 pour contrôler la structure des couches de la rétine. Les rétines ont été imagées au microscope confocal (**figure 40**).

Tout d'abord, on peut voir que les cellules surexprimant NICD forment de larges colonnes de cellules cohésives (**figure 40 A**). Ceci constitue un premier résultat intéressant qui nous indique que les RPC perturbées ne se sont pas ou plus dispersées passé un certain stade : soit i) la surexpression de NICD induit des divisions cohésives ; soit ii) le tissu rétinien passe d'un état mécanique permettant les dispersions tangentielles à un état où les cellules ne peuvent

Figure 40 – La surexpression de NICD par un vecteur iOn déforme la mosaïque des sous-types rétiniens

(suite) On observe des « trous » dans la mosaïque des AC Isl1⁺ au niveau des cellules perturbées et une perturbation potentielle partielle de cette dernière autour de ces mêmes cellules. B - Projection maximale de la RGL. Superposition des canaux du contre-marquage nucléaire en gris, NICD-RFP en rouge et Isl1 en magenta. C - Projection maximale radiale partielle d'une sous-région essentiellement non perturbée de la région en A et B. C1 - Marquage nucléaire (gris). C2 - Canal NICD-RFP seul (rouge). C3 - Canal Isl1 seul (magenta). D - Projection maximale radiale partielle d'une sous-région passant par le centre de plusieurs colonnes de cellules perturbées de la région en A et B. D1 - Superposition du marquage nucléaire en gris et NICD-RFP en rouge. On observe que l'organisation des trois couches est perturbée, en particulier l'INL et la RGL. D2 - Superposition du marquage β 3-tubuline en vert et NICD-RFP en rouge. On peut voir les segments externes des PR marqués avec l'anti- β 3-tubuline. Leur organisation semble peu perturbée, y compris au-dessus des colonnes de cellules surexprimant NICD. On peut également voir le marquage β 3-tubuline envahir le centre de la colonne de droite. D3 - Marquage Isl1 en magenta et cellules perturbée avec NICD-RFP en rouge. L'organisation des cellules Isl1⁺ est fortement perturbée au niveau des colonnes, en particulier les AC et RGC.
(Barres d'échelle : 50 μ m)

plus se disperser autant après leur division.

Le marquage β 3-tubuline est absent des cellules RFP⁺ (**figure 40 D2**) : comme on s'y attendait, celles-ci ne se sont pas différenciées en neurones. Ce résultat est également confirmé par l'absence de cellules RFP⁺/Isl1⁺ (**figure 40 A1 & B**). La structure de la rétine est par ailleurs fortement perturbée au niveau des colonnes de cellules RFP⁺. Les cellules non perturbées semblent repoussées en périphérie de ces colonnes (**figure 40**). Dans la plus grosse des colonnes imagées, on peut même observer un espace dénué de cellules au centre (**figure 40 A1 & D**) qui semble envahi par des projections neuronales (**figure 40 D2**). Des cellules saines RFP⁻ semblent aussi entraînées dans les déformations à proximité des colonnes (**figure 40 C & D1**). On peut ainsi voir des cellules avec le marquage Hoechst ou Isl1 qui ne semblent pas à leur place.

Au niveau de l'INL enfin, la surexpression sporadique de NICD génère des « trous » dans la mosaïque des AC Isl1⁺ (**figure 40 A**). Ceci confirme encore que les RPC surexprimant NICD ne se sont pas différenciées.

Il serait intéressant de pointer les cellules autour des déformations et de caractériser leur organisation par la triangulation de Delaunay. On pourrait ainsi voir si la mosaïque s'est formée correctement (selon H₀) ou si les cellules se sont anormalement accumulées autour de la zone perturbée (selon H₁).

V.2) Perturbation du biais des RPC par surexpression de NICD avec un vecteur d'expression épisomal

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à créer une perturbation transitoire du développement des RPC. Nous avons pour cela utilisé un vecteur épisomal, *^{pCX}CAG::NICD-GFP*, co-exprimant NICD avec la GFP sans s'intégrer au génome (Murtaugh et al. 2003). Ici, le but est d'augmenter le nombre de divisions symétriques des RPC pendant la phase de prolifération, avant la génération des premiers progéniteurs neurogéniques. Des expériences dans l'équipe d'accueil ont démontré que les plasmides épisomaux étaient dilués et ne s'exprimaient plus à E4.5, trois jours après l'électroporation à E1.5.

Si un biais des RPC existe et est établi de manière précoce dans le développement, on s'attend à obtenir deux types de clones en fonction du RPC perturbé : si le RPC présente un biais positif pour la production du type neuronal étudié, on s'attend à observer un clone de cellules comportant une densité élevée de cellules marquées, résultant en l'apparition d'un « hot spot » local dans la mosaïque. Si le RPC est biaisé négativement pour le type étudié, on s'attend

inversement à observer un clone étendu comportant une faible densité de cellules marquées. Ceci résulterait en une raréfaction voire un « trou » dans la mosaïque du type étudié.

Claire Montmasson, la stagiaire de M2 que j'ai encadrée, a réalisé cette expérience. Des embryons ont été électroporés à E1.5 avec $p^{CX}CAG::NICD-GFP$, $p^B CAG\infty RFP$, $p^B CAG\infty iRFP$ et une source de PBase. Les rapporteurs fluorescents iOn intégrés de façon stable au génome permettent de localiser la région électroporée. Malheureusement, dans les expériences réalisées jusqu'à présent, seuls des clones de RPE semblent avoir été perturbés. Cette perturbation a résulté en une déformation des rétines. Il est cependant difficile de dire au vu des images obtenues si des clones issus de RPC perturbées par NICD sont présents.

La stratégie employée ici n'est cependant pas sans défauts : la surexpression de NICD pendant quelques jours dans les RPC est en effet susceptible de perturber l'identité des différentes classes de neurones qu'elles vont générer. De plus, contrairement à la stratégie iOn employée en V.1), le plasmide épisomal $p^{CX}CAG::NICD-GFP$ ne permet pas de savoir exactement quelles cellules sont issues d'une RPC perturbée. En effet, ce plasmide et la GFP qu'il exprime sont dilués au cours des divisions cellulaires.

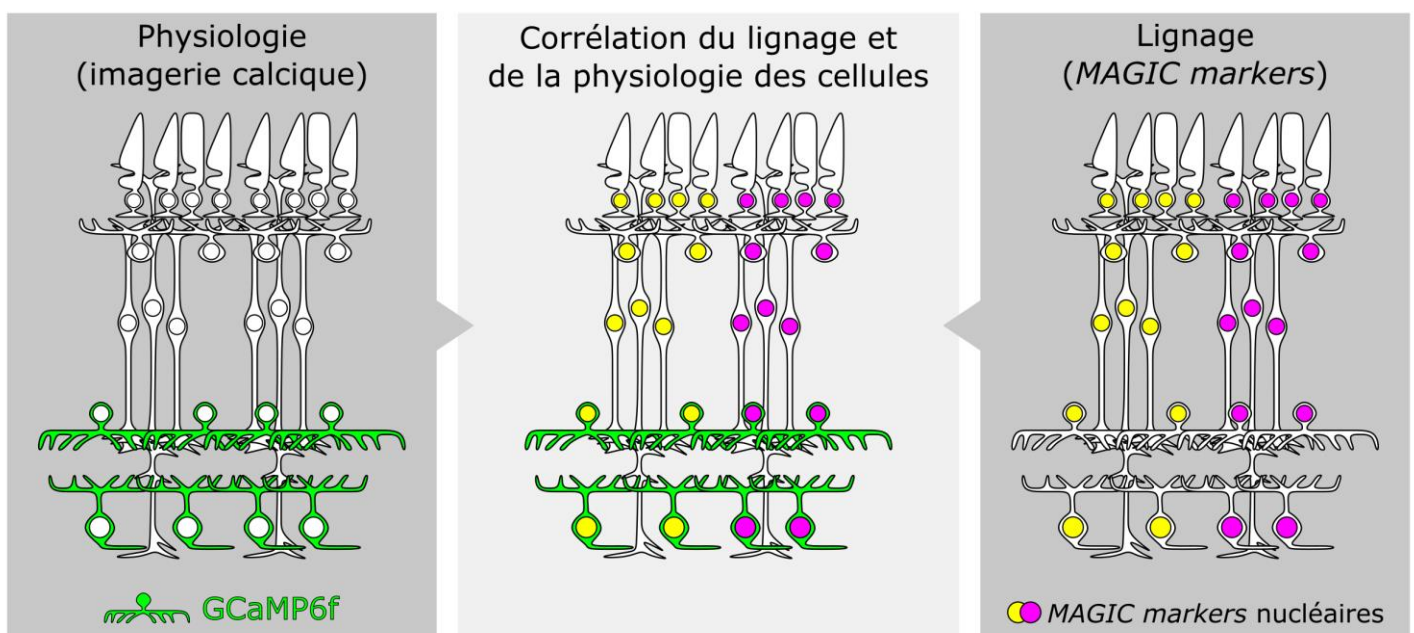


Figure 41 – Combinaison des informations fonctionnelles et ontogéniques dans un même échantillon

Schéma conceptuel présentant le principe de la combinaison de l'imagerie calcique avec *GCaMP6f* d'un côté pour identifier le type des cellules marquées et leurs éventuelles interconnexions, avec la détermination de leur origine clonale grâce aux *MAGIC markers* de l'autre côté.

VI] Premiers éléments de caractérisation physiologique des types neuronaux de la rétine aviaire

Le but de cette dernière partie est de lancer un pont entre le développement et la physiologie de la rétine aviaire. Le développement d'un outil d'imagerie calcique compatible avec Brainbow permettrait d'aller beaucoup plus loin dans l'identification des types, et même des connections (préférentielles ou non) entre cellules d'un même clone.

En lien avec les capacités techniques de l'IDV, cette partie du projet a été effectuée en deux temps. D'une part, des *microelectrode arrays* (MEA) ont été utilisés pour déterminer les conditions permettant d'enregistrer des réponses à la lumière dans la rétine aviaire *ex vivo*. L'excellente résolution temporelle du MEA aurait également pu être mise à profit pour chercher des premières signatures spécifiques de certains types de RGC. D'autre part, des transgènes intégratifs ont été construits et testés pour exprimer le rapporteur calcique GCaMP6f dans des clones de neurones rétinien matures par électroporation *in ovo* aux stades précoces de la rétinogenèse. Ces premiers résultats devaient permettre d'encourager un projet plus important avec l'enregistrement en direct des réponses des cellules rétinien en imagerie calcique et la corrélation de l'imagerie Brainbow et GCaMP6f (**figure 41**).

VI.1) MEA : conditions de survie *ex vivo* et premiers enregistrements

Les expériences avec le MEA ont dans un premier temps eu pour but de mettre en place des conditions d'acquisitions en direct dans la rétine aviaire *ex vivo* (**figure 42**).

Le MEA est une puce carrée et transparente porteuse de 256 microélectrodes plates (il existe des modèles différents). On applique la face interne d'un morceau de rétine sur la puce. On peut ensuite stimuler la rétine à travers la puce avec des signaux lumineux et enregistrer en réponse le potentiel électrique des RGC plaquées dessus (Neumann et al. 2008). Le MEA peut aussi être utilisé pour stimuler les RGC (Stett et al. 2000). Le morceau de rétine est maintenu en vie dans une solution oxygénée et maintenue à 37°C.

Les conditions permettant d'enregistrer des réponses avec la rétine murine étaient établies mais il restait à déterminer celles pour la rétine aviaire. Tout d'abord, différents milieux ont été testés. Une recette modifiée pour la rétine neurale de fluide cérébro-spinal artificiel (aCSF) (Williams et al. 2013) a été comparée au milieu AMES (Sigma Aldrich). Il a été déterminé que l'AMES est le meilleur milieu pour enregistrer des réponses aux stimuli lumineux.

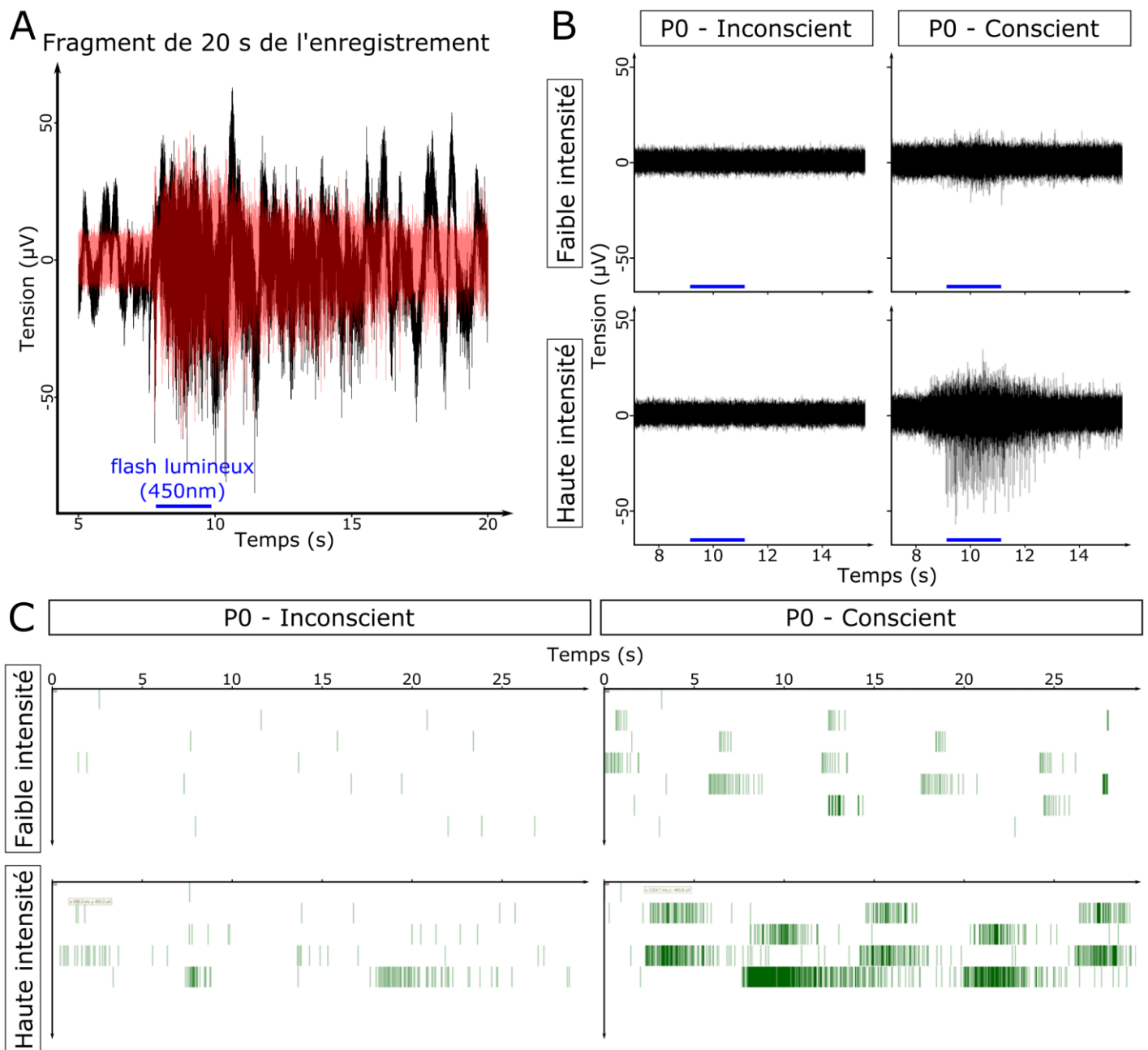


Figure 42 – Obtention de réponses unitaires à la lumière dans des rétines ex vivo avec un système de microelectrode array (MEA)

Les enregistrements sont réalisés sur des rétines de poulets sacrifiés à E20+/P0. A - Enregistrement d'une électrode du MEA au cours d'une période de 20 secondes. En noir, enregistrement brut. En rouge, enregistrement après application d'un filtre de Butterworth passe-haut d'ordre 3 avec une fréquence de coupure de 300 Hz. En bleu, période de stimulation avec un flash de lumière bleue d'une durée de deux secondes. B - À gauche, enregistrement provenant d'une électrode du MEA placée sur une rétine issue d'un embryon P0 encore inconscient. À droite, enregistrement d'une électrode du MEA placée sur une rétine issue d'un embryon P0 conscient (sacrifié après le début des pépiements accompagnant la naissance). La rangée de graphes du haut correspond à l'enregistrement de la réponse à des flashes de lumière de faible intensité ($\lambda = 450 \text{ nm}$, $I = 1.10^{14} \text{ photons.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ; la rangée du bas, à des flashes de forte intensité ($\lambda = 450 \text{ nm}$, $I = 1.10^{17} \text{ photons.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$). En bleu, durée d'une stimulation. C - Raster plot présentant les enregistrements des deux électrodes en B sur toute la durée des stimuli (stimuli de 2 s toutes les 10 s pendant 100 s). L'enregistrement à travers le temps se lit de gauche à droite et de haut en bas. Chaque barre représente un pic qui dépasse un seuil de 25 μV sur le tracé filtré (voir A).

La présence de RPE sur les morceaux de rétines choisis était déterminante pour la réussite des enregistrements. Différents stades de développement ont été testés entre E18.5 et E20.5/P0.

Plusieurs expériences réalisées ont permis de constater que les rétines issues des embryons/poussins à E20.5/P0 répondent le mieux aux stimuli lumineux. Nous avons aussi observé des vagues calciques spontanées jusqu'à E18.5, en accord avec la littérature (Wong et al. 1998). Les rétines de poulet répondaient également particulièrement bien aux stimuli dans les longueurs d'onde courtes (bleu), également en accord avec la littérature (Wortel et al. 1986).

Nous avons alors remarqué une différence intéressante entre les rétines issues de poussins conscients à P0, c'est-à-dire émettant leurs premières vocalises et commençant à sortir de leur coquille, par rapport aux embryons au même stade encore inconscients. Les rétines du premier groupe étaient plus actives que les rétines issues du second groupe (**figure 42**).

L'enregistrement obtenu avec le MEA mesure à la fois le potentiel des RGC et le potentiel de champs local (LFP). On peut filtrer l'enregistrement brut pour retirer les oscillations dues aux fluctuations du LFP (**figure 42 A**). On peut voir sur les tracés filtrés que les embryons conscients fournissent des rétines plus actives que les embryons inconscients. L'enregistrement issu de deux électrodes représentatives est représenté (**figure 42 B**). On retrouve le même résultat quand on quantifie le nombre de réponses avec un seuil sur l'enregistrement filtré (seuil = 25 μ V). Les réponses seuillées sont représentées sous forme de *raster plot* (**figure 42 C**).

Pour aller plus loin, on pourrait représenter l'histogramme des réponses autour du temps des stimuli (PSTH). Celui-ci permet de représenter la distribution des réponses dans le temps et pour plusieurs électrodes du MEA. On peut alors plus facilement comparer différentes expériences et différentes conditions.

En conclusion, les expériences réalisées avec le MEA ont permis de déterminer les conditions permettant d'enregistrer les réponses de la rétine aviaire à la lumière *ex vivo*. Des expériences supplémentaires pourraient être réalisées avec le MEA pour chercher les signatures spécifiques de différents types de RGC chez le poulet. Le MEA ne peut en revanche pas être combiné avec de l'imagerie 3D. Il reste donc une étape sur le chemin vers une combinaison du lignage avec la physiologie.

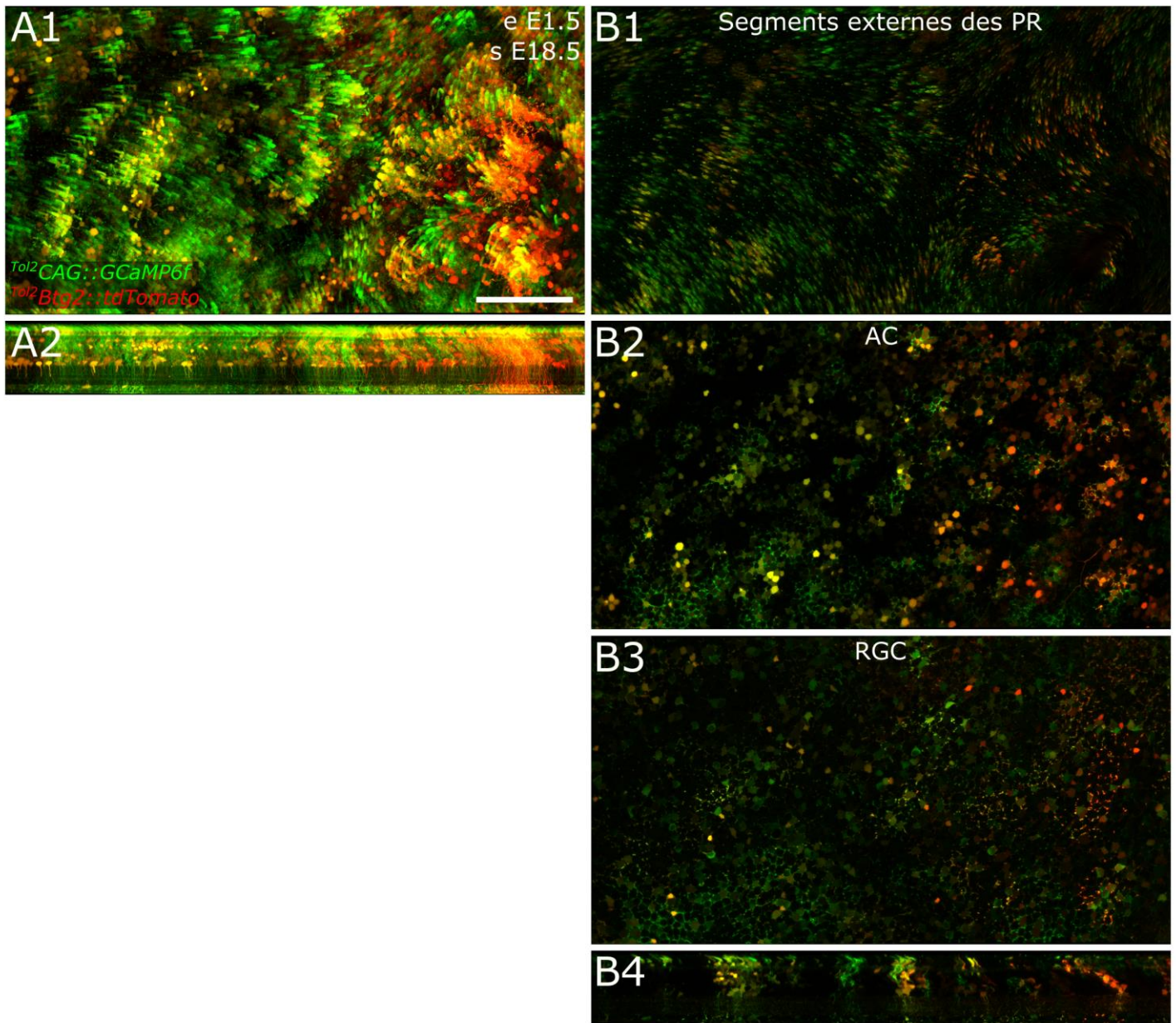


Figure 43 – Expression de *GCaMP6f* dans la rétine d’embryons aviaires tardifs

Images d'une rétine électroporée à E1.5 avec un vecteur *Tol2CAG::GCaMP6f* et un rapporteur, *Tol2Btg2::tdTomato*, prélevée sur un embryon sacrifié à E18.5. A1 - Projection maximale en face de toutes les couches d'une région de la rétine. A2 - Projection maximale radiale de cette région. B - Différentes projections maximales de la région en A, limitées à des couches spécifiques. B1 - Projection maximale au niveau des segments externes des PR. On peut voir l'accumulation de GCaMP6f et de tdTomato dans les segments externes. B2 - Projection maximale de l'INL, limitée au niveau des AC. B3 - Projection maximale de la RGL. On peut voir une accumulation plus forte de GCaMP6f dans les extensions cytoplasmiques des MG par rapport au cytoplasme des RGC. Cela résulte en un mauvais SNR pour l'enregistrement des réponses physiologiques des RGC. Par comparaison, l'accumulation de tdTomato semble plus homogène entre MG et RGC. (Barre d'échelle : 100 μ m)

VI.2) Combiner le suivi du lignage avec les *MAGIC Markers* et l'imagerie calcique avec *GCaMP6f*

Pour aller vers l'imagerie calcique en microscopie bi-photonique, j'ai tenté de construire des transposons permettant l'expression de *GCaMP6f* avec différents promoteurs pour obtenir un SNR optimal.

L'imagerie calcique requiert un bon ratio signal/bruit (SNR) pour permettre d'enregistrer les réponses des cellules. Dans ce but, différentes constructions dirigeant l'expression de *GCaMP6f* ont été clonées :

- Une première construction utilise le promoteur CMV, théoriquement censé donner une expression faible *in vivo* chez le poulet.
- Une deuxième construction est basée sur le promoteur de l'ubiquitine humaine, qui, permet théoriquement une expression forte et homogène.
- Enfin le promoteur *CAG*, donnant une expression très forte chez le poulet, a été employé. Je l'ai déjà utilisé avec succès dans de nombreux vecteurs de ce projet de thèse.

Le vecteur *Tol2CAG::GCaMP6f* a été électroporé à E1.5 dans des embryons selon la procédure habituelle, avec la *Tol2ase* et le vecteur *Tol2Btg2::tdTomato*, servant ici de rapporteur permettant d'identifier les zones électroporées. Ces embryons ont été sacrifiés à un stade tardif, E18.5, pour contrôler la répartition de *GCaMP6f* dans les différents compartiments des cellules rétiniennes (figure 29). Il s'avère que *GCaMP6f* est exprimé avec succès dans toutes les classes rétiniennes générés par les RPC. Néanmoins, on observe une forte accumulation de *GCaMP6f* dans des extensions cytoplasmiques qui semblent appartenir à la MG. Par contraste, l'indicateur calcique est moins concentré dans le corps cellulaire des AC et encore moins dans celui des RGC. Or, ces deux populations sont les plus intéressantes pour étudier la variété des types, suivies par les BC. Dans ce contexte, la construction *Tol2CAG::GCaMP6f* ne semble pas utile pour l'imagerie calcique dans la rétine aviaire. De nouvelles constructions devraient être testés avec des promoteurs plus spécifiques des classes. *Tol2CMV::GCaMP6f* et *Tol2UbiQ::GCaMP6f* devraient également être testés à des stades tardifs pour évaluer leur intérêt éventuel.

Pour l'imagerie calcique bi-photonique, de premières expériences ont été tentées avec Antoine Chaffiol, de l'équipe de Jens Duebel, avec de l'OGB-BAPTA-AM (ThermoFisher). Il s'agit d'un indicateur calcique chimique. Celui-ci est injecté sous l'ILM, il pénètre dans les

RGC. Le groupe AM lipophile permettant de traverser la membrane plasmique est alors clivé dans le cytoplasme et le groupe BAPTA, de poids moléculaire important, empêche toute sortie passive de l'OGB ainsi séquestré dans la cellule.

Malheureusement, aucune réponse à la lumière n'a pu être mesurée dans les conditions expérimentales testées. Celles-ci n'étaient pas encore optimisées au moment des expériences. Il fallait entre autres retirer le RPE pour permettre une stimulation par la face externe et imager par la face interne des rétines. Les embryons choisis n'étaient pas toujours conscients. Or, on a vu ci-dessus que ces conditions ne sont pas optimales pour obtenir des réponses aux stimuli lumineux.

En conclusion, le croisement des informations de lignage avec le marquage Brainbow, d'une part, et les informations physiologiques avec l'imagerie calcique, d'autre part, semble possible. Il faudrait cependant réaliser de nouvelles constructions et expériences pour déterminer les conditions concrétisant cette possibilité.

Discussion

Les résultats présentés dans cette thèse apportent à la fois de nouveaux outils pour étudier le lignage dans la rétine ainsi qu'un nouvel éclairage sur le développement des différentes classes et types de neurones rétinien.

Utilisation des MAGIC Markers

Une stratégie multicolore de suivi du lignage

Comme on peut le voir dans la partie III) de l'introduction et dans les résultats, les *MAGIC markers* sont un outil puissant pour étudier le lignage des RPC. Le marquage multicolore permet d'analyser simultanément de nombreux clones dans des régions densément marquées. On peut ainsi étudier les cellules générées par des RPC individuelles avec un nombre réduit d'échantillons biologiques. On pourrait éventuellement aussi étudier les interactions entre clones voisins avec cette approche.

Dans les approches classiques uni- ou bi-colores, même récentes, la densité du marquage est un paramètre capital. Les RPC doivent être marquées avec une faible densité pour pouvoir suivre des destins individuels. Si la densité est trop élevée, on réalise une étude au niveau de la population. Dans le cas de l'approche MADM, la couleur rouge, jaune ou verte des cellules apporte cependant des informations supplémentaires sur le patron de division des cellules (Henner et al. 2013). Les approches unicolores ne permettent pas non plus d'accéder à des informations sur des clones intriqués. Enfin, ce type d'approches requiert un grand nombre d'animaux pour analyser le destin de progéniteurs individuels avec une statistique suffisante ce qui est une limitation à la fois du point de vue expérimental et éthique.

Pour les approches multicolores comme unicolores, établir des critères de discrimination de clones issus de progéniteurs individuels est primordial avant l'analyse. Cette définition est assez simple pour les approches unicolores et repose sur une faible densité de marquage pour s'assurer de marquer un seul RPC par région analysée. Avec les approches multicolores, des RPC voisines peuvent être analysées mais la définition d'un clone est plus subtile. Seuls les clones présentant des combinaisons de couleur suffisamment rares sont analysés pour réduire le risque de confondre deux clones. Il faut souligner que bien que les méthodes de lignage classiques demandent une faible densité de marquage difficile à ajuster, l'analyse des résultats est assez triviale. Dans le cas des approches multicolores, le marquage de cellules individuelles est plus facile à obtenir mais la définition d'un clone est plus complexe. L'analyse des résultats fait ainsi appel à des outils plus poussés. La procédure d'analyse doit alors être conçue avec précaution pour éviter de créer des artefacts.

Risque de fuite de la Cre

L'expression inappropriée de transgènes est un problème récurrent dans les approches utilisant la recombinaison Cre/lox, telles que la stratégie Brainbow. En effet, une quantité digitale de Cre peut potentiellement recombinaison des couples de lox. Les lignées de souris inductibles CreER présentent par exemple des problèmes de recombinaison de fuite en absence de tamoxifène (Matsuda & Cepko 2007). De même, des transgènes contrôlés par un promoteur spécifique ont souvent une expression de fuite anormale si le transgène n'est pas inséré dans le locus d'intérêt par KI. Pour limiter tout risque de fuite, certains auteurs proposent de combiner deux recombinaisons comme la Cre et la Dre (He et al. 2017). Cette approche est limitante et complexe : elle nécessite plusieurs lignées ou transgènes ce qui rend difficile sa combinaison avec d'autres techniques. La recombinaison inductible ER^{T2}CreER^{T2} dont l'activité est sous contrôle de deux récepteurs aux œstrogènes règle les problèmes de fuite pour les approches de contrôle temporel de la recombinaison. En absence de tamoxifène, je n'ai ainsi jamais observé de recombinaison inattendue dans la rétine, comme cela est rapporté dans l'article d'origine (Matsuda & Cepko 2007). Pour les approches utilisant un promoteur spécifique pour contrôler la Cre, le système iOn apparaît comme une solution d'autant plus prometteuse qu'elle est compatible avec la transgénèse somatique.

Risques de transfert intercellulaire de matériel

Récemment, des auteurs ont détecté un problème de transfert de matériel entre cellules injectées et photorécepteurs dans des tentatives de thérapie cellulaire. Les implications de ce risque ont été revues par (Boudreau-Pinsonneault & Cayouette 2018) pour les aspects liés à la biologie du développement. Des protéines fluorescentes comme des protéines saines manquantes chez l'individu injecté ou même la Cre peuvent être transférées. Ceci pourrait poser un gros problème pour les approches Brainbow dans la rétine. Cependant, ce problème de transfert n'a été détecté que dans la rétine de souris adulte entre des photorécepteurs matures et des précurseurs de PR injectés. Le risque semble donc assez faible voire nul dans ce projet de thèse. Et aucun de mes résultats ne semble indiquer ce type de transfert. On ne voit par exemple aucun mélange des combinaisons de couleurs au niveau des photorécepteurs de deux clones accolés, ce qui est également vrai pour le reste de la colonne.

Nouvelles approches pour l'étude de la rétine et de son développement

Immunohistochimie et transparisation

Ce travail de thèse aura été l'occasion d'adapter un nouveau protocole d'immunohistochimie pour les rétines. Ce protocole a été adapté à partir de celui de K. Ba-Charvet (Institut de la Vision) pour les rétines de souris. L'utilisation de DMSO (voir Matériel & méthodes) facilite la pénétration des anticorps. Ce protocole fonctionne également avec des rétines de poulets disséquées et ouvertes en quatre pétales. L'utilisation d'un protocole *in toto* permet de conserver les informations 3D du tissu. La forme pseudo-sphérique de la rétine peut même être rétablie avec un package dans FIJI (Sterratt et al. 2013) qui effectue une opération qui s'apparente à l'inverse d'une projection de Mercator. Les coordonnées des cellules dans l'œil pourraient ainsi être calculées pour effectuer des analyses spatiales plus poussées.

Ce protocole d'IHC a été complété avec une étape de transparisation pour améliorer l'imagerie 3D par microscopie confocale. En effet, la transparisation de l'échantillon permet d'éliminer largement l'atténuation du signal de fluorescence en profondeur. Pour développer ce protocole, j'ai comparé différentes solutions de transparisation. Dans un premier temps, on peut distinguer deux types d'approches : celles utilisant des solutions polaires et celles utilisant des solutions aqueuses. Les premières ont tendance à rétrécir le volume du tissu et à le durcir. Les deuxièmes, au contraire, induisent un élargissement et un amollissement du tissu. Les solutions polaires sont généralement destructives pour la fluorescence endogène. Je me suis donc tourné vers des méthodes de transparisation utilisant des solutions aqueuses, parmi lesquelles on peut à nouveau distinguer deux grandes familles : actives et passives. Les méthodes actives utilisent des tensioactifs agressifs ou l'électrophorèse pour retirer les lipides du tissu responsables de son opacité. Les méthodes passives, elles, consistent seulement à introduire une molécule dans le tissu pour normaliser son indice de réfraction. Les méthodes passives correspondent notamment à des milieux de montage. Pour qu'elles fonctionnent de façon optimale, le tissu doit préalablement être perméabilisé. Les méthodes actives et passives sont en effet complémentaires. On utilise systématiquement un milieu de montage transparisant pour homogénéiser l'indice de réfraction d'un tissu après en avoir retiré les lipides. Les milieux de montage transparisants, eux, peuvent être utilisés directement après perméabilisation, sans retrait des lipides. Cette approche s'avère suffisante pour la rétine, qui est une région fine du SNC (maximum 150 μm). Pour des tissus plus épais comme la moelle épinière ou le cerveau, il est préférable de retirer les lipides du tissu avant de passer au milieu de montage transparisant.

Segmentation avec le logiciel ilastik

La segmentation automatisée des cellules ou clones permet d'accélérer la vitesse de traitement des données. Les expériences combinant l'analyse du lignage par les *MAGIC Markers* avec des marqueurs IHC génèrent des images comportant quatre canaux. L'analyse de ces résultats devient ainsi très fastidieuse si elle est réalisée entièrement à la main. L'analyse manuelle est également sujette à un important risque d'erreur. Pour ce projet, l'analyse n'a pas été entièrement automatisée. D'une part, cela permet une vérification manuelle pour s'assurer de la qualité des segmentations réalisées. L'analyse reste néanmoins plus rapide qu'en mode purement manuel et est d'avantage standardisée. D'autre part, pour être complète, l'analyse devrait prendre en compte la couleur des clones. Pour ce faire, on pourrait extraire la couleur des cellules marquées à partir du masque de segmentation obtenu sur les canaux fusionnés. On pourrait ensuite catégoriser les clones dans l'espace RGB sur la base de critères de distinction et de confusion. L'utilisation de versions cytoplasmiques et nucléaires des *MAGIC Markers* augmente la capacité à résoudre les clones mais rend encore plus complexe l'analyse car certains clones présentent alors une double signature dans l'espace RGB. Ce niveau d'analyse plus complexe a donc été laissé de côté pour l'instant. Les données de cette thèse pourront servir à entraîner des outils basés sur le *machine/deep learning* pour proposer une solution à ce problème.

Analyse et modélisation des données

Dans les résultats présentés, la seule modélisation réalisée est celle de la spécification des types sous l'hypothèse H_0 d'indépendance. On pourrait également modéliser la spécification sous H_1 , soit l'existence de biais. Pour ce faire, un premier cas simple serait de supposer que la distribution observée correspond au mélange de deux distributions. On pourrait alors modéliser cette distribution complexe à partir de deux distributions binomiales de paramètres différents. On appliquerait ensuite une pondération à chaque sous-distribution pour obtenir la distribution finale. On pourrait tester différentes combinaisons de lois binomiales ainsi que différents coefficients de pondération pour trouver une distribution théorique éventuellement meilleure que celle obtenue sous H_0 .

De plus, l'analyse spatiale des données est encore manquante. On pourrait à ce sujet tenter de corréler les patrons de dispersion des clones avec ceux des mosaïques des types. La répartition des colonnes peut être uniforme, régulière ou clustérisée. Pour ce faire, on peut utiliser la distance minimale, l'autocorrélation et la DRP sur la pseudo-mosaïque formée par les

colonnes de cellules au sein des macro-clones. Des paramètres géométriques peuvent également être calculés à partir des triangulations de Delaunay et tessellations de Voronoï associées. On peut également comparer la distribution des pseudo-mosaïques à celle de distributions théoriques.

Il serait également intéressant de regarder s'il existe ou non un biais plus fort d'une rétine à une autre et entre régions d'une même rétine. Enfin, on pourrait analyser la localisation des cellules marquées au sein des clones. Si un biais affecte les RPC postérieurement au stade auquel le marquage Brainbow est induit, on pourrait constater une répartition biaisée spatialement dans les clones. Cela indiquerait que deux RPC biaisées différemment issues de la RPC précoce marquée ont généré indépendamment deux parties du clone. A l'inverse, si le biais est antérieur au stade de marquage des clones ou s'il n'y a pas de biais, on s'attend à retrouver des cellules réparties aléatoirement dans le clone. Ce pourrait également être le cas si le biais est postérieur au marquage des clones mais que les RPC prolifératives ont continué à se disperser après son établissement de telle sorte que leur position soit rendue aléatoire.

Approches -omiques et nouvelles approches de suivi haut débit du lignage

Pour aller plus loin, on pourrait réaliser des analyses transcriptomiques ou épigénomiques de RPC uniques à la recherche de signatures de biais. Une première étude utilisant ces approches identifie déjà deux populations de RPC prolifératives différentes (Clark et al. 2019). La détection d'éventuels biais à pénétrance faible sera cependant un vrai défi compte tenu de la sensibilité des approches actuelles.

Avec l'essor des techniques de séquençage de l'ADN et l'ARN ainsi que la baisse constante de leur coût, de nouvelles approches de suivi du lignage cellulaire apparaissent également. Différentes approches de transcriptomique sur cellule unique sont revues par (Kanter & Kalisky 2015). Ces approches ont par exemple été utilisées pour réaliser un atlas des types neuronaux dans le CNS de la souris (Zeisel et al. 2018). Les approches -omiques produisant de grandes quantités de données ont ouvert la fameuse ère du *big data*. Ces données sont souvent sous-exploitées et de nouveaux outils d'analyse émergent pour mieux les décortiquer. Une nouvelle technique d'analyse utilise par exemple le *machine learning* pour croiser les données transcriptomiques (niveau d'expression des gènes) avec la position des cellules pour identifier les types neuronaux. Cette analyse a été conduite avec succès pour décrire les différents types de neurones constituant les interneurons V1 de la moelle épinière de souris

(Gabbitto et al. 2016). Un autre outil d'analyse a été baptisé vélocité des ARN (RNA velocity). La vélocité des ARNm séquencés est dérivée du ratio entre ARNm épicsés et natifs. Cette vélocité constitue ainsi un nouveau paramètre pouvant être calculé sans changer de technique de séquençage et même dans des ensembles de données déjà séquencés. On peut ainsi caractériser les cellules au cours du développement. La vélocité des ARN permet par exemple de caractériser un état plus ou moins avancé de différenciation (La Manno et al. 2018). Elle a ainsi été exploitée pour mieux comprendre le développement précoce des RGC (Giudice et al. 2018).

La *barcoding* moléculaire constitue une nouvelle méthode de lignage à haut débit pour analyser un grand nombre de clones. Certaines techniques de barcoding permettent même de révéler le lignage de toutes (ou un grand nombre) des cellules d'un tissu ou d'un organisme en procurant des informations sur le niveau de parenté des cellules. Le principe de ces approches est d'introduire un « code-barre », une séquence d'ADN unique dans le génome des cellules pour suivre leur lignage. Les cellules du tissu ou de l'organisme sont ensuite dissociées et séquencées individuellement. Les cellules possédant un même code appartiennent alors au même clone.

Un premier exemple de *barcoding* utilise des rétrovirus intégrant une grande diversité de séquences d'ADN dans le génome des progéniteurs infectés. Un titre suffisamment faible de virus est utilisé pour éviter de donner plus d'un code-barre à chaque cellule. Ces virus ont notamment permis de déterminer l'origine développementale des cellules souches neurales adultes (Fuentelba et al. 2015). Cette approche utilise cependant un ensemble fixe de codes-barres uniques dès le départ. On retrouve alors de nouveau des problèmes de densité d'infection requise.

D'autres approches de barcoding sont basées sur le système CRISPR/Cas9. Dans ce cas, la nucléase Cas9 est dotée d'ARN guides auto-ciblés (Perli et al. 2016). Les séquences des loci reconnus par ces ARN guides sont progressivement mutées au cours du développement de façon unique dans chaque branche de la descendance de chaque progéniteur. Une telle approche nommée GESTALT a été utilisée avec succès pour retracer le lignage d'une grande partie des cellules d'un poisson zèbre entier (McKenna et al. 2016). Les séquences uniques obtenues peuvent être organisées selon un arbre similaire à un arbre phylogénique. On peut ainsi non seulement identifier les cellules appartenant à un même clone mais également établir leur degré de parenté par rapport aux progéniteurs qui forment les nœuds de l'arbre. Une nouvelle itération de cette technologie, le scGESTALT, combine le barcoding avec un

séquençage des ARNm en cellule unique (Raj et al. 2018). On peut alors identifier le type de toutes les cellules générées par un progéniteur et appartenant à un même clone. On peut même le faire en remontant plus ou moins loin dans le lignage grâce à « l'arbre généalogique » obtenu.

Les approches de barcoding peuvent être combinées avec différents outils de transcriptomique en cellule unique (Spanjaard et al. 2018). Différents outils d'analyse épigénomique atteignent maintenant également un niveau de résolution proche de la cellule unique (Kelsey et al. 2017). Il a été démontré que les marques épigénomiques ont un rôle important dans la différenciation et la spécification des différents types cellulaires (Ziller et al. 2015). On pourrait donc appliquer ces techniques aux RPC pour mieux disséquer les circuits de spécification des classes et des types. Pour rechercher un éventuel biais, on pourrait analyser des déterminants transcriptomiques ou épigénomiques en rassemblant des RPC prolifératives issues d'une même cellule neuroépithéliale sur la base des codes-barres identifiés. Cet enrichissement permettrait de voir des traces de différences subtiles autrement perdues dans une approche sur cellules uniques classique.

Les approches de barcoding ont pour inconvénient de devoir dissocier le tissu pour séquencer l'ADN et l'ARN des cellules. Dans le futur, les mêmes informations devraient pouvoir être obtenues dans le tissu intact grâce aux avancées de l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) à haut débit. On aura ainsi accès à la morphologie ou au moins à la position des cellules. Le principe de ces nouvelles approches repose sur des robots capables de performer un grand nombre d'hybridations successives sur le même tissu, voire de réaliser un séquençage *in situ*. On peut alors obtenir à la fois des informations sur d'éventuels code-barres en même temps que sur l'état transcriptomique des cellules. Le SABER-FISH constitue une de ces nouvelles techniques de FISH (Kishi et al. 2019). On peut également citer cette approche de séquençage *in situ* développée par (Wang et al. 2018). Pour le moment, ces approches ne sont possibles qu'en 2D sur des coupes et n'ont pas une résolution très fine.

Une autre approche originale permet de retrouver la position initiale des cellules dans le tissu sans hybridation *in situ* ni microscopie optique. Cette technique de « microscopie à ADN » introduit des séquences d'ADN uniques entre les cellules dans le tissu intact. La lecture ultérieure des séquences attachées sur les cellules dissociées permet de les replacer relativement les unes aux autres dans l'espace. Ces informations viennent alors en complément des données transcriptomiques (Weinstein et al. 2019). Cette technique pourrait

tout à fait être combinée avec un troisième niveau d'informations sur le lignage issues de codes-barres intégrés au génome.

Développement mécanique de l'œil et dispersion cellulaire dans la rétine

De faibles contraintes mécaniques sont requises pour former la pseudosphère de l'œil à partir du tube neural. Au contraire, de contraintes mécaniques plus importantes semblent impliquées dans le développement de la moelle épinière. De fortes transformations du tissu sont-elles associées à une importante dispersion des cellules dans un tissu plus « malléable » ?

L'étude de la dispersion des cellules progénitrices rétinienne aux stades précoces et la comparaison des patrons clonaux avec différentes sources de Cre nous apportent des informations sur la dispersion des RPC dans le tissu rétinien en développement. Cette dispersion est à mettre en perspective avec la formation de l'œil. En effet, la formation d'une sphère à partir du neuroépithélium qui s'évagine puis s'invagine requiert un niveau de contraintes mécaniques suffisamment permissif. On peut ainsi s'interroger sur les moteurs de la dispersion observée. Est-elle due à un phénomène d'intercalation dynamique des cellules en prolifération dans un neuroépithélium localement plus relâché ? Ou bien les cellules filles des RPC se mélangent-elles passivement à cause de la force de tension globale qui joue sur le tissu pour former une sphère ? Il faudra pour répondre à ces questions comparer la dispersion des progéniteurs dans la rétine en développement avec celles dans d'autres tissus. Il faudra également vérifier le lien éventuel entre dispersion des progéniteurs et établissement de mosaïques stéréotypées.

On observe par ailleurs deux phases de dispersion distinctes résultant en la formation de macro- et de méso-clones. Existe-t-il un ou deux moteurs de ces deux phases de dispersion ? Ou bien les méso-clones résultent-ils simplement du ralentissement de la dispersion ? Il y aurait alors seulement deux étapes de développement des clones rétiens : dispersive et cohésive.

Modèle de développement des classes de neurones rétiens

Concernant le développement des classes, les résultats obtenus nous donnent de nouveaux éléments sur les populations de RPC prolifératives et neurogéniques. On peut faire une analogie avec le développement du système visuel chez la drosophile. Chez cette espèce, une population de neuroblastes est maintenue au cours du développement tout en générant plusieurs progéniteurs neurogéniques appelées cellules mères ganglionnaires (GMC) (Perry et

al. 2017). L'expression de différents facteurs de transcription successifs dans les neuroblastes conduit à la production séquentielle de GMC aux potentialités restreintes qui génèrent des types de neurones déterminés. La situation semble similaire dans la rétine aviaire. Les expériences utilisant la SeCre permettent d'obtenir de grands clones issus de RPC prolifératives qui rappellent les neuroblastes de la drosophile. Au contraire, on obtient avec le transposon ^{PB}*Atoh7*∞*Cre* de petits clones de quelques cellules. Les RPC *Atoh7*⁺ rappellent donc les progéniteurs déterminés chez *D. melanogaster*. Les neuroblastes *ato*⁺ sont d'ailleurs responsables de la génération d'un ensemble limité de 4 neurones dans la rétine de drosophile. Il existe maintenant un anticorps anti-Atoh7 qui pourrait être utilisé pour mieux caractériser les RPC *Atoh7*⁺ (Miesfeld et al. 2018).

Par ailleurs, les dernières divisions dispersives des RPC ont lieu avant E5.5 (Résultats, **figure 21**), on observe ensuite uniquement des divisions symétriques cohésives ou asymétriques, accompagnées d'une migration radiale des neurones générés. Or, les RGC commencent à naître avant la fin de la phase de dispersion des RPC, dès E2 selon certaines sources (Doh et al. 2010; Prada et al. 1991). Et on observe que les RGC ne sont pas toujours alignées avec une colonne de cellules clonales. On avait fait l'hypothèse que ces cellules réalisaient des migrations tangentielles après leur naissance. On peut en fait imaginer qu'elles sont présentes dans la zone de leur naissance qui correspond au méso-clone qu'elles surplombent et ne sont en fait pas alignées sur des colonnes car ces structures issues de divisions cohésives se sont formées après leur naissance.

Modèle de développement des types de neurones rétiniens

On peut s'interroger sur le lien entre le lignage des types neuronaux rétiniens et la mise en place de leur organisation mosaïque. On peut à ce propos comparer le développement des types rétiniens avec celui d'autres types cellulaires dans d'autres tissus : les neurones de la moelle épinière ou du cortex, les cellules des ilots de Langerhans dans le pancréas ou encore les cellules des néphrons du rein. Par exemple, dans la moelle épinière, la division symétrique d'un progéniteur aboutit à la formation de deux progéniteurs qui restent cohésifs. Moelle et rétine semblent constituer deux modèles opposés : dans la moelle épinière, des "divisions cohésives" aboutissent à la formation de domaines exclusifs (motoneurones et neurones sensoriels). À l'inverse, dans la rétine, des divisions dispersives aboutissent à la formation de domaines intercalés et homogènes sur la surface du tissu (organisation mosaïque des clones).

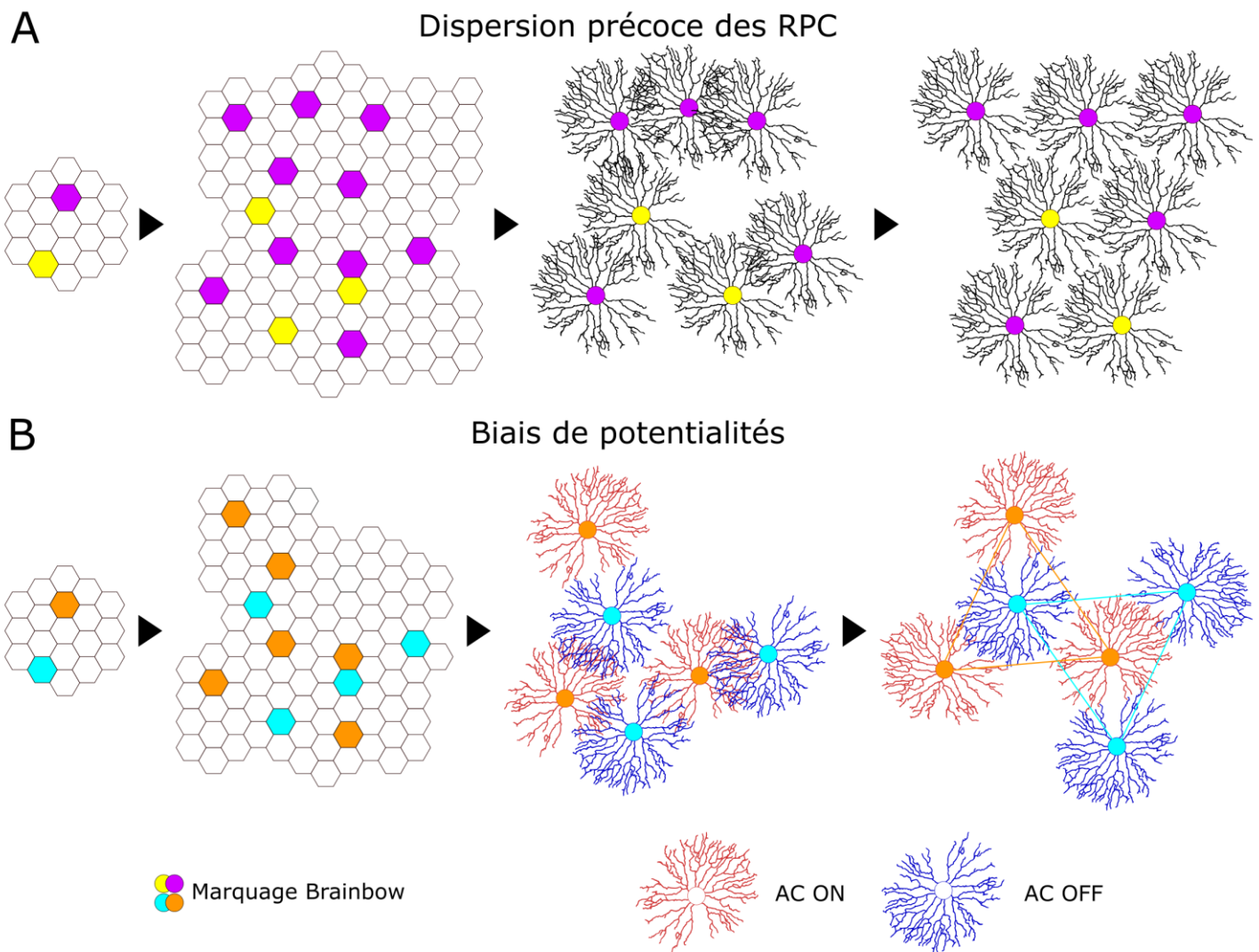


Figure 44 - Modèles de l'établissement de l'organisation mosaïque des types neuronaux rétiniens via la dispersion des RPC précoces

A – Les dispersions tangentielle des RPC prolifératives pendant les stades précoces de la rétinogénèse préétabliraient l'organisation mosaïque des types neuronaux rétiniens. Par exemple, on suit la descendance de deux RPC, une jaune et une violette (première étape). Jusqu'à E5 chez le poulet, les RPC se dispersent dans la rétine immature (deuxième étape), avant de donner naissance à des colonnes de neurones. Il existe une probabilité faible de produire un type d'intérêt dans chaque colonne du clone (ici représentation d'un type d'AC). Les AC générées sont ainsi réparties à la surface de la rétine (troisième étape). Des migrations tangentielle limitées rendent ensuite la mosaïque plus régulière (quatrième étape). B – L'ajout d'un biais dans le modèle précédent pourrait faciliter l'établissement d'un niveau supérieur d'organisation des mosaïques entre elles ou métamosaïque. Dans cet exemple, on suit une RPC orange et une RPC turquoise. Chaque RPC est biaisée à générer un type spécifique d'AC dont les mosaïques sont anti-alignées (dans cet exemple AC ON, en rouge et OFF, en bleu). L'intercalation des RPC générées par les premières RPC marquées pourrait permettre de préétablir la métamosaïque. Des migrations tangentielle pourraient toujours être impliquées pour affiner les mosaïques de chaque type. Les triangles dans la dernière étape représentent la triangulation de Delaunay. Dans le cas de deux mosaïques anti-alignées, la triangulation de Delaunay d'un type est proche de la tessellation de Voronoï de l'autre.

Un préétablissement de la mosaïque des types rétiniens pourrait se faire grâce à la dispersion des RPC au cours de la phase de prolifération combinée à une probabilité faible de générer chaque type dans chaque colonne (**figure 44 A**). Cette hypothèse semble plus parcimonieuse que celle d'un choix aléatoire tardif peu avant ou après la naissance des neurones, car elle limiterait la distance de migration tangentielle et le nombre d'évènements de mort programmée requis dans les cellules post-mitotiques pour affiner la mosaïque.

Le préétablissement de la mosaïque pourrait également être dû aux seules dispersions tangentielles, sans biais de potentialité des RPC. Il suffirait alors d'avoir une probabilité plus ou moins forte de générer chaque type en fonction de sa densité dans la rétine mature. Observons cependant que les cellules qui migrent tangentiellement le plus fortement sont les cellules horizontales (Reese & Tan 1998), c'est ce qu'on observe aussi avec les *MAGIC Markers*, alors qu'il s'agit de la classe de neurones présentant la plus faible diversité et dont les types sont en conséquence relativement denses. Si la migration tangentielle était un moteur essentiel à la répartition des neurones rétiniens on s'attendrait au contraire à ce que les types les plus rares migrent sur de plus grandes distances. La dispersion tangentielle relativement limitée observée pour les différentes classes de neurones rétiniens indique au contraire que chaque type doit être produit par les RPC de manière relativement homogène sur toute la surface rétinienne.

On peut également se demander si la génération des types neuronaux rétiniens par les RPC pourrait se faire selon un biais négatif, positif ou possiblement une conjonction des deux types de biais dans deux sous-populations différentes de progéniteurs.

Pour plusieurs types, l'identité des cellules analysées semble indépendante du lignage (**figure 38**). La relation entre classe et type est-elle vraiment plus orthogonale qu'on ne la conçoit habituellement ? Certains travaux pointent dans cette direction en démontrant un biais dans la production de certaines AC chez le xénope (Huang & Moody 1995, 1997) ou encore dans la production d'un sous-type spécifique de RGC chez la souris (De la Huerta et al. 2012). Le mélange homogène de deux sous-populations de RPC biaisées à générer des types spécifiques et différents pourrait participer à un meilleur préétablissement de la mosaïque pour les types les plus réguliers. Ce biais pourrait également préétablir un niveau d'organisation métamosaïque entre types dont les mosaïques sont spécifiquement alignées (**figure 44 B**).

Si cette répartition tangentielle des types rétiniens est liée à la dispersion de RPC biaisées pendant le développement précoce, nous devons alors expliquer deux phénomènes : par quel mécanisme les RPC pourraient-elles être biaisées ? et quels sont les mécanismes assurant leur

dispersion ? Les marques épigénétiques sont une piste pouvant expliquer des biais dans la génération des différents types de neurones du SNC. De telles empreintes peuvent avoir un effet "à retardement" (pre-priming), revue dans (Amberg et al. 2018) pour le cortex. La dispersion tangentielle des RPC pourrait être liée à différents aspects, en particulier des divisions non-cohésives des progéniteurs, ou des réorganisations liées aux tensions mécaniques dans le tissu. Une modélisation de ces phénomènes pourrait permettre de trancher entre ces hypothèses.

Il y aurait un grand intérêt à explorer plus en avant la bibliographie à l'interface de la biologie, de la modélisation et de la mécanique. Ce niveau interdisciplinaire est requis pour décrire au mieux l'intérêt des dispersions précoces et d'un éventuel biais. Plusieurs revues s'intéressent à la formation de patron dans des tissus en développement à partir des propriétés mécaniques et des gradients de morphogènes dans le tissu (Briscoe 2019; Briscoe & Small 2015). Les modèles de vertex sont par exemple très intéressants pour la modélisation des épithélia en développement (Alt et al. 2017; Farhadifar et al. 2007). Les patrons de Turing sont un autre outil mathématique pouvant être utilisé pour décrire la formation de structures répétées et régulières à partir de diffusion (dispersion) et d'interactions entre cellules (Marcon & Sharpe 2012).

La rétinogénèse comme miroir de la corticogénèse

La rétine est une région du système nerveux central. D'un point de vue évolutif, la rétine trouverait son origine avant l'apparition du pallium. C'est un tissu fortement organisé et d'épaisseur beaucoup plus réduite par rapport au pallium et à plus forte raison au néocortex. La rétine est ainsi un modèle intéressant pour comprendre le développement neural. En particulier, des parallèles frappants existent entre rétine et cortex, et dans le développement de ces deux régions du SNC.

La glie radiaire se comporte comme les RPC prolifératives, ou même les neuroblastes de la drosophile. Elle est capable de générer indirectement tous les neurones et cellules gliales du cortex des vertébrés (Gao et al. 2014). Dans le télencéphale de souris, on observe également des cellules neuroépithéliales produisant quelques neurones via des divisions asymétriques. Ceci rappelle les divisions de RPC prolifératives qui généreraient des RGC et des AC. Dans le même temps, des progéniteurs intermédiaires produisent la majorité des neurones. Ceux-ci rappellent pour leur part les RPC neurogéniques ou même les GMC de la drosophile. Ces

différents patrons de division ont pu être observés dans la lignée de souris *Tis21::GFP* (Haubensak et al. 2004; Iacopetti et al. 1999). Les progéniteurs basaux et les progéniteurs intermédiaires expriment le gène *Tbr2* (Nomura et al. 2016). Chez l'homme, *Notch2nl*, issu de la duplication du gène *Notch2*, prolonge la phase de prolifération des progéniteurs, et, par là, l'expansion du cortex (Suzuki et al. 2018). *PRC2*, une répresseur de *Polycomb*, entraîne dans les progéniteurs une séquence de division et différenciation qui rappelle celle du modèle de transition de compétence des RPC (Telley et al. 2016, 2019). L'activité électrique dans les progéniteurs et les neurones immatures a également un rôle dans la spécification des classes et types neuronaux corticaux (Lancaster 2018), comme dans la rétine où on voit qu'une partie du raffinement des types a lieu dans le tissu mature en activité. La définition des types neuronaux dans la rétine et son applicabilité au cortex est revue par (Seung & Sumbül 2014).

Combiner lignage et physiologie

Combiner l'approche Brainbow avec l'imagerie calcique serait un outil très puissant pour jeter un pont entre biologie de développement et physiologie (**figure 41**). Les *MAGIC Markers* permettraient d'avoir une information sur l'origine clonale des cellules. L'imagerie calcique, quant à elle, permettrait d'enregistrer simultanément les réponses de nombreuses cellules à une variété de stimuli. Ces réponses spécifiques peuvent ensuite être utilisées pour déterminer l'identité des neurones et leurs éventuelles interconnexions. On pourrait ainsi décrire de manière exhaustive la composition en types neuronaux d'un clone, en s'affranchissant des limites de l'immunohistochimie. On pourrait également interroger l'interconnexion radiale et tangentielle éventuellement préférentielle entre les cellules d'un même clone.

Pour ce faire, on pourrait développer un microscope avancé permettant à la fois l'imagerie Brainbow et l'imagerie calcique. Pour l'imagerie Brainbow, il faudrait une méthode d'imagerie rapide des trois couleurs en trois dimensions, permettant de choisir les régions à enregistrer et de connaître l'identité clonale des cellules enregistrées. Les tissus pourraient éventuellement être fixés après l'enregistrement physiologique et transparisés pour être ultérieurement imagés en microscopie confocale de manière plus lente et mieux résolue. Pour l'imagerie calcique, il faudrait une excellente résolution temporelle de l'ordre de 20 Hz pour détecter les réponses fines des types neuronaux rétinien à différents stimuli lumineux (Baden et al. 2016; Franke et al. 2017).

De premières expériences d'imagerie calcique peuvent être réalisées dans la rétine avec des indicateurs chimiques. Ces indicateurs peuvent être injectés directement dans les cellules à l'aide d'un capillaire ou passivement grâce à un groupe lipophile (MacLean & Yuste 2005; Regehr & Tank 1991). L'Oregon Green BAPTA (OGB) est un indicateur calcique efficace *in vivo* avec une excellente cinétique de réponse aux fluctuations de la concentration en ions Ca^{2+} (Ikegaya et al. 2005). L'OGB est incapable de traverser la membrane plasmique des cellules. S'il est injecté dans un neurone avec un capillaire, il est ainsi séquestré pour la durée de l'expérience. Une autre alternative est d'utiliser de l'OGB-AM qui porte un groupement AM lipophile lié à l'indicateur calcique par une liaison ester et peut ainsi pénétrer les cellules. Les estérases cellulaires vont ensuite hydrolyser ce groupement AM et l'OGB est alors séquestré dans les cellules. L'OGB-AM peut ainsi être injecté sous l'ILM pour étudier les réponses de plusieurs RGC autour du site d'injection. L'OGB peut également être électroporé dans les RGC pour étudier les réponses d'un plus grand nombre de cellules (Baden et al. 2016). Différents indicateurs calciques chimiques sont revus par (Paredes et al. 2008).

Pour pouvoir cibler facilement différentes classes de neurones dans la rétine aviaire, on pourrait ensuite utiliser des indicateurs calciques encodés génétiquement ou GECI. Les GECI appartiennent à la catégorie plus large des rapporteurs de l'activité neuronale génétiquement encodés ou GINA. Il existe de nombreux GINA qui permettent de suivre d'autres paramètres physiologiques (Broussard et al. 2014; Lin & Schnitzer 2016). Les GECI sont particulièrement efficaces pour suivre l'activité de nombreux neurones en parallèle quand leur niveau d'expression est bien maîtrisé dans les cellules transfectées. Il existe différents GECI (Rose et al. 2014), parmi lesquels GCaMP6f est théoriquement le seul aujourd'hui à posséder une résolution temporelle suffisante pour enregistrer les réponses spécifiques des différents types rétinien.

Au niveau de l'ingénierie génétique, il faudrait trouver un ou quelques bons promoteurs pour contrôler l'expression de *GCaMP6f* dans les classes de cellules dont on souhaite enregistrer les réponses. Il serait également utile de recoder les couleurs des *MAGIC Markers* qui ne sont actuellement pas compatibles avec GCaMP6f qui présente un spectre d'émission vert difficile à distinguer de celui des protéines cyan et jaune. On pourrait également utiliser une version uniquement nucléaire des transgènes Brainbow pour améliorer encore le SNR de l'imagerie calcique dans le cytoplasme, mais dans ce cas, on ne pourrait imager *a posteriori* la morphologie des cellules en utilisant le marquage Brainbow. Une alternative serait d'utiliser des GECI fluorescents dans d'autres couleurs (Oheim et al. 2014). Cependant, GCaMP6f

paraît actuellement être le seul GECI possédant la résolution temporelle nécessaire à l'enregistrement des signatures spécifiques des types rétiens.

Après avoir commencé ce manuscrit sur le lien entre physiologie et biologie du développement, voici quelques considérations supplémentaires pour boucler la boucle. Dans un article récent, un algorithme de *machine learning* a été nourri avec les données disponibles dans l'atlas Allen sur les données physiologiques et transcriptomiques de différents types de neurones. Cet algorithme est ensuite capable de prédire les marqueurs d'un neurone avec un taux de succès supérieur à 70 % à partir de ses caractéristiques physiologiques (Seo & Lee 2019). On voit donc bien le lien intime entre programme génétique et physiologie des cellules, qui s'influencent mutuellement au cours du développement pour permettre l'émergence des différents types de neurones.

Bibliographie

- Adler R, Canto-Soler MV. 2007. Molecular mechanisms of optic vesicle development: Complexities, ambiguities and controversies. *Dev. Biol.* 305(1):1–13
- Ai HW, Shaner NC, Cheng Z, Tsien RY, Campbell RE. 2007. Exploration of new chromophore structures leads to the identification of improved blue fluorescent proteins. *Biochemistry.* 46(20):5904–10
- Aksu M, Seiradake E. 2018. DIPping into the Fly Visual System. *Neuron.* 100(6):1270–72
- Almeida AD, Boije H, Chow RW, He J, Tham J, et al. 2014. Spectrum of Fates: a new approach to the study of the developing zebrafish retina. *Development.* 141(9):1971–80
- Alt S, Ganguly P, Salbreux G. 2017. Vertex models: From cell mechanics to tissue morphogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372(1720):
- Amberg N, Laukoter S, Hippenmeyer S. 2018. Epigenetic cues modulating the generation of cell-type diversity in the cerebral cortex. *J. Neurochem.* 12–26
- Amini R, Labudina AA, Norden C. 2019. Stochastic single cell migration leads to robust horizontal cell layer formation in the vertebrate retina. *Development.* 146(12):dev173450
- Amini R, Rocha-Martins M, Norden C. 2018. Neuronal migration and lamination in the vertebrate retina. *Front. Neurosci.* 11(JAN):1–16
- Arendt D. 2003. Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int. J. Dev. Biol.* 47(7–8):563–71
- Arendt D, Musser JM, Baker CVH, Bergman A, Cepko C, et al. 2016. The origin and evolution of cell types. *Nat. Rev. Genet.* 17(12):744–57
- Attardo A, Calegari F, Haubensak W, Wilsch-Bräuninger M, Huttner WB. 2008. Live imaging at the onset of cortical neurogenesis reveals differential appearance of the neuronal phenotype in apical versus basal progenitor progeny. *PLoS One.* 3(6):14–18
- Baddeley A, Rubak E, Turner R. 2015. *Spatial Point Patterns : Methodology and Applications with R*
- Baddeley A, Turner R. 2005. spatstat: An R Package for Analyzing Spatial Point Patterns. *J. Stat. Softw.* 12(6):1–42
- Badea TC, Cahill H, Ecker J, Hattar S, Nathans J. 2009. Distinct Roles of Transcription Factors Brn3a and Brn3b in Controlling the Development, Morphology, and Function of Retinal Ganglion Cells. *Neuron.* 61(6):852–64
- Baden T, Berens P, Franke K, Roman-Roson M, Bethge M, Euler. 2016. The functional diversity of mouse retinal ganglion cells. *Nature.* 529(7586):1–21
- Bae JA, Mu S, Kim JS, Turner NL, Tartavull I, et al. 2018. Digital Museum of Retinal Ganglion Cells with Dense Anatomy and Physiology. *Cell.* 173(5):1293–1306.e19
- Balasubramanian R, Bui A, Ding Q, Gan L. 2014. Expression of LIM-homeodomain transcription factors in the developing and mature mouse retina. *Gene Expr. Patterns.* 14(1):1–8
- Balic A, Garcia-Morales C, Vervelde L, Gilhooley H, Sherman A, et al. 2014. Visualisation

- of chicken macrophages using transgenic reporter genes: Insights into the development of the avian macrophage lineage. *Dev.* 141(16):3255–65
- Bassett E a., Wallace V a. 2012. Cell fate determination in the vertebrate retina. *Trends Neurosci.* 35(9):565–73
- Bejarano-Escobar R, Álvarez-Hernán G, Morona R, González A, Martín-Partido G, et al. 2015. Expression and function of the LIM-homeodomain transcription factor Islet-1 in the developing and mature vertebrate retina. *Exp. Eye Res.* 138:22–31
- Blanpain C, Simons BD. 2013. Unravelling stem cell dynamics by lineage tracing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14(8):489–502
- Boije H, Fard SS, Edqvist PH, Hallböök F. 2016. Horizontal cells, the odd ones out in the retina, give insights into development and disease. *Front. Neuroanat.* 10(JUL):1–12
- Boije H, MacDonald RB, Harris W a. 2014. Reconciling competence and transcriptional hierarchies with stochasticity in retinal lineages. *Curr. Opin. Neurobiol.* 27(Figure 2):68–74
- Boije H, Rulands S, Dudczig S, Simons BD, Harris WA. 2015. The Independent Probabilistic Firing of Transcription Factors: A Paradigm for Clonal Variability in the Zebrafish Retina. *Dev. Cell.* 34(5):532–43
- Boudreau-Pinsonneault C, Cayouette M. 2018. Cell lineage tracing in the retina: Could material transfer distort conclusions? *Dev. Dyn.* 247(1):10–17
- Boulina M, Samarajeewa H, Baker JD, Kim MD, Chiba A. 2013. Live imaging of multicolor-labeled cells in *Drosophila*. *Development.* 140(7):1605–13
- Bowmaker JK, Knowles A. 1976. The visual pigments and oil droplets of the chicken retina. *Vis. res.* 17:755–64
- Branda CS, Dymecki SM. 2004. Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev. Cell.* 6(1):7–28
- Bringmann A. 2019. Structure and function of the bird fovea. *J. Vet. Med. Ser. C Anat. Histol. Embryol.* 48(3):177–200
- Briscoe J. 2019. Understanding Pattern Formation in Embryos: Experiment, Theory, and Simulation. *J. Comput. Biol.* 26(7):696–702
- Briscoe J, Small S. 2015. Morphogen rules: Design principles of gradient-mediated embryo patterning. *Dev.* 142(23):3996–4009
- Broussard GJ, Liang R, Tian L. 2014. Monitoring activity in neural circuits with genetically encoded indicators. *Front. Mol. Neurosci.* 7(December):97
- Brzezinski JA, Prasov L, Glaser T. 2012. Math5 defines the ganglion cell competence state in a subpopulation of retinal progenitor cells exiting the cell cycle. *Dev. Biol.* 365(2):395–413
- Buckingham ME, Meilhac SM. 2011. Tracing cells for tracking cell lineage and clonal behavior. *Dev. Cell.* 21(3):394–409

- Buenaventura DF, Ghinia-Tegla MG, Emerson MM. 2018. Fate-restricted retinal progenitor cells adopt a molecular profile and spatial position distinct from multipotent progenitor cells. *Dev. Biol.* 443(1):35–49
- Cai D, Cohen KB, Luo T, Lichtman JW, Sanes JR. 2013. Improved tools for the Brainbow toolbox. *Nat. Methods.* 10(6):540–47
- Cajal SR y. 1893. La rétine des vertébrés. *Cellule*
- Cameron DA, Carney LH. 2000. Cell mosaic patterns in the native and regenerated inner retina of zebrafish: Implications for retinal assembly. *J. Comp. Neurol.* 416(3):356–67
- Cao Y, Sarria I, Fehlhhaber KE, Kamasawa N, Orlandi C, et al. 2015. Mechanism for Selective Synaptic Wiring of Rod Photoreceptors into the Retinal Circuitry and Its Role in Vision. *Neuron.* 87(6):1248–60
- Caygill EE, Brand AH. 2016. The GAL4 system: A versatile system for the manipulation and analysis of gene expression. In *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1478, pp. 33–52. Humana Press, New York, NY
- Centanin L, Wittbrodt J. 2014. Retinal neurogenesis. *Development.* 141(2):241–44
- Cepko C. 2014. Intrinsically different retinal progenitor cells produce specific types of progeny. *Nat. Rev. Neurosci.* 15(9):615–27
- Cepko CL, Ryder E, Austin C, Golden J, Fields-Berry S, Lin J. 2000. Lineage analysis with retroviral vectors. *Methods Enzymol.* 327:118–45
- Chen YP, Bai GS, Wu MF, Chiao CC, Huang YS. 2016. Loss of CPEB3 upregulates MEGF10 to impair mosaic development of ON starburst amacrine cells. *Front. Mol. Neurosci.* 9(OCT2016):1–13
- Chen Z, Li X, Desplan C. 2012. Deterministic or Stochastic Choices in Retinal Neuron Specification. *Neuron.* 75(5):739–42
- Chiodini F, Matter-Sadzinski L, Rodrigues T, Skowronska-Krawczyk D, Brodier L, et al. 2013. A positive feedback loop between ATOH7 and a notch effector regulates cell-cycle progression and neurogenesis in the retina. *Cell Rep.* 3(3):796–807
- Chow RL, Lang RA. 2001. Early Eye Development in Vertebrates. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17(1):255–96
- Clark BS, Stein-O’Brien GL, Shiao F, Cannon GH, Davis-Marcisak E, et al. 2019. Single-Cell RNA-Seq Analysis of Retinal Development Identifies NFI Factors as Regulating Mitotic Exit and Late-Born Cell Specification. *Neuron.* 102(6):1111-1126.e5
- Clavreul S, Abdeladim L, Hernández-Garzón E, Niculescu D, Durand J, et al. 2019. Cortical astrocytes develop in a plastic manner at both clonal and cellular level. *en révision*
- Collins RT, Linker C, Lewis J. 2010. MAZE: A tool for mosaic analysis of gene function in zebrafish. *Nat. Methods.* 7(3):219–23
- Cosmanescu F, Katsamba PS, Sergeeva AP, Ahlsen G, Patel SD, et al. 2018. Neuron-Subtype-Specific Expression, Interaction Affinities, and Specificity Determinants of DIP/Dpr Cell Recognition Proteins. *Neuron.* 100(6):1385-1400.e6

- Creuzet S, Vincent C, Couly G. 2005. Neural crest derivatives in ocular and periocular structures. *Int. J. Dev. Biol.* 49(2-3 SPEC. ISS.):161–71
- D’Orazi FD, Suzuki SC, Wong RO. 2014. Neuronal remodeling in retinal circuit assembly, disassembly, and reassembly. *Trends Neurosci.* 37(10):594–603
- da Silva S, Cepko CL. 2017. Fgf8 Expression and Degradation of Retinoic Acid Are Required for Patterning a High-Acuity Area in the Retina. *Dev. Cell.* 42(1):68-81.e6
- De la Huerta I, Kim IJ, Voinescu PE, Sanes JR. 2012. Direction-selective retinal ganglion cells arise from molecularly specified multipotential progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(43):17663–68
- Del Bene F, Wehman AM, Link BA, Baier H. 2008. Regulation of Neurogenesis by Interkinetic Nuclear Migration through an Apical-Basal Notch Gradient. *Cell.* 134(6):1055–65
- Dhande OS, Stafford BK, Lim J-HA, Huberman AD. 2015. Contributions of Retinal Ganglion Cells to Subcortical Visual Processing and Behaviors. *Annu. Rev. Vis. Sci.* 1(1):291–328
- Ding H, Smith RG, Polog-Polsky A, Diamond JS, Briggman KL. 2016. Species-specific wiring for direction selectivity in the mammalian retina. *Nature.* 535(7610):105–10
- Ding S, Wu X, Li G, Han M, Zhuang Y, Xu T. 2005. Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell.* 122(3):473–83
- Dirian L, Galant S, Coolen M, Chen W, Bedu S, et al. 2014. Spatial Regionalization and Heterochrony in the Formation of Adult Pallial Neural Stem Cells. *Dev. Cell.* 30(2):123–36
- Doh ST, Hao H, Loh SC, Patel T, Tawil HY, et al. 2010. Analysis of retinal cell development in chick embryo by immunohistochemistry and in ovo electroporation techniques. *BMC Dev. Biol.* 10:8
- Duan X, Krishnaswamy A, De La Huerta I, Sanes JR. 2014. Type II cadherins guide assembly of a direction-selective retinal circuit. *Cell.* 158(4):793–807
- Duan X, Qiao M, Bei F, Kim IJ, He Z, Sanes JR. 2015. Subtype-Specific regeneration of retinal ganglion cells following axotomy: Effects of osteopontin and mtor signaling. *Neuron.* 85(6):1244–56
- Duval MG, Allison WT. 2018. Photoreceptor progenitors depend upon coordination of gdf6a, thrβ, and tbx2b to generate precise populations of cone photoreceptor subtypes. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 59(15):6089–6101
- Dyer MA, Cepko CL. 2001. The p57Kip2 the cyclin kinase inhibitor is expressed by a restricted set of amacrine cells in the rodent retina. *J. Comp. Neurol.* 429(4):601–14
- Eglen SJ. 2012. Cellular spacing: analysis and modelling of retinal mosaics. *Comput. Syst. Neurobiol.* 365–85
- Eglen SJ, Raven MA, Tamrazian E, Reese BE. 2003. Dopaminergic Amacrine Cells in the Inner Nuclear Layer and Ganglion Cell Layer Comprise a Single Functional Retinal Mosaic. *J. Comp. Neurol.* 466(3):343–55

- Eglen SJ, van Ooyen A, Willshaw DJ. 2000. Lateral cell movement driven by dendritic interactions is sufficient to form retinal mosaics. *Netw. Comput. Neural Syst.* 11(1):103–18
- Eglen SJ, Willshaw DJ. 2002. Influence of cell fate mechanisms upon retinal mosaic formation: A modelling study. *Development.* 129(23):5399–5408
- Ehrlich D. 1981. Regional specialization of the chick retina as revealed by the size and density of neurons in the ganglion cell layer. *J. Comp. Neurol.* 195:643–57
- Eldred KC, Hadyniak SE, Hussey KA, Brenerman B, Zhang PW, et al. 2018. Thyroid hormone signaling specifies cone subtypes in human retinal organoids. *Science (80-.).* 362(6411):
- Elliott J, Jolicoeur C, Ramamurthy V, Cayouette M. 2008. Ikaros Confers Early Temporal Competence to Mouse Retinal Progenitor Cells. *Neuron.* 60(1):26–39
- Ellis JH, Richards DE, Rogers JH. 1991. Calretinin and calbindin in the retina of the developing chick. *Cell Tissue Res.* 264(2):197–208
- Euler T, Haverkamp S, Schubert T, Baden T. 2014. Retinal bipolar cells: elementary building blocks of vision. *Nat. Rev. Neurosci.* 15(8):507–19
- Farhadifar R, Röper JC, Aigouy B, Eaton S, Jülicher F. 2007. The Influence of Cell Mechanics, Cell-Cell Interactions, and Proliferation on Epithelial Packing. *Curr. Biol.* 17(24):2095–2104
- Fekete DM, Perez-Miguelsanz J, Ryder EF, Cepko CL. 1994. Clonal analysis in the chicken retina reveals tangential dispersion of clonally related cells.
- Felker A, Nieuwenhuize S, Dolbois A, Blazkova K, Hess C, et al. 2016. In Vivo Performance and Properties of Tamoxifen Metabolites for CreERT2 Control. *PLoS One.* 11(4):e0152989
- Feng L, Xie ZH, Ding Q, Xie X, Libby RT, Gan L. 2010. MATH5 controls the acquisition of multiple retinal cell fates. *Mol. Brain.* 3(1):1–16
- Fields-Berry SC, Halliday AL, Cepko CL. 1992. A recombinant retrovirus encoding alkaline phosphatase confirms clonal boundary assignment in lineage analysis of murine retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89(2):693–97
- Firmino J, Rocancourt D, Saadaoui M, Moreau C, Gros J. 2016. Cell Division Drives Epithelial Cell Rearrangements during Gastrulation in Chick. *Dev. Cell.* 36(3):249–61
- Fischer AJ, Zelinka C, Scott MA. 2010. Heterogeneity of glia in the retina and optic nerve of birds and mammals. *PLoS One.* 5(6):
- Fletcher BS, Lim RW, Varnum BC, Kujubu D a, Koski R a, Herschman HR. 1991. Structure and expression of TIS21, a primary response gene induced by growth factors and tumor promoters. *J. Biol. Chem.* 266(22):14511–18
- Fosser NS, Ronco L, Bejarano A, Paganelli AR, Ríos H. 2013. Calbindin-D28k and calretinin in chicken inner retina during postnatal development and neuroplasticity by dim red light. *Dev. Neurobiol.* 73(7):530–42

- Franke K, Berens P, Schubert T, Bethge M, Euler T, Baden T. 2017. Inhibition decorrelates visual feature representations in the inner retina. *Nature*. 542(7642):439–44
- Franze K, Grosche J, Skatchkov SN, Schinkinger S, Foja C, et al. 2007. Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(20):8287–92
- Fraser MJ, Ciszczon T, Elick T, Bauser C. 1996. Precise excision of TTAA-specific lepidopteran transposons piggyBac (IFP2) and tagalong (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from two species of Lepidoptera. *Insect Mol. Biol.* 5(2):141–51
- Fuentealba LC, Rompani SB, Parraguez JI, Obernier K, Romero R, et al. 2015. Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell*. 161(7):1644–55
- Fuhrmann S. 2010. *Eye Morphogenesis and Patterning of the Optic Vesicle*, Vol. 93. Elsevier Inc.
- Gabitto MI, Pakman A, Bikoff JB, Abbott LF, Jessell TM, Paninski L. 2016. Bayesian Sparse Regression Analysis Documents the Diversity of Spinal Inhibitory Interneurons. *Cell*. 165(1):220–33
- Galli-Resta L, Novelli E. 2000. The effects of natural cell loss on the regularity of the retinal cholinergic arrays. *J. Neurosci.* 20(3):1–5
- Gao P, Postiglione MP, Krieger TG, Hernandez L, Wang C, et al. 2014. Deterministic progenitor behavior and unitary production of neurons in the neocortex. *Cell*. 159(4):775–88
- Ghigo C, Mondor I, Jorquera A, Nowak NJ, Wienert S, et al. 2013. Multicolor fate mapping of langerhans cell homeostasis. *J. Exp. Med.* 210(9):1657–64
- Giudice Q Lo, Leleu M, Fabre PJ. 2018. Transcriptional logic of cell fate specification and axon guidance in early born retinal neurons revealed by single-cell mRNA profiling. . 1–20
- Goedhart J, Von Stetten D, Noirclerc-Savoye M, Lelimousin M, Joosen L, et al. 2012. Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat. Commun.* 3(1):751
- Goldowitz D, Rice DS, Williams RW. 1996. Clonal architecture of the mouse retina. *Prog. Brain Res.* 108:3–15
- Gomes FL a F, Zhang G, Carbonell F, Correa J a, Harris W a, et al. 2011. Reconstruction of rat retinal progenitor cell lineages in vitro reveals a surprising degree of stochasticity in cell fate decisions. *Development*. 138(2):227–35
- Gong S, Zheng C, Doughty ML, Losos K, Didkovsky N, et al. 2003. A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature*. 425(6961):917–25
- Guerrero P, Perez-Carrasco R, Zagorski M, Page D, Kicheva A, et al. 2019. Neuronal differentiation affects tissue mechanics and progenitor arrangement in the vertebrate neuroepithelium. *bioRxiv*
- Guillot C, Lecuit T. 2013. Mechanics of Epithelial Tissue Homeostasis and Morphogenesis.

Science (80-.). 340(6137):1185–89

Gupta V, Poss KD. 2012. Clonally dominant cardiomyocytes direct heart morphogenesis. *Nature*. 484(7395):479–84

Ha BP, Surzenko N, Beier KT, Punzo C, Trimarchi JM. 2012. Transcription factor Olig2 defines subpopulations of retinal progenitor cells biased toward specific cell fates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109(20):7882–87

Hamburger V, Hamilton HL. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88(1):49–92

Hämmerle B, Ulin E, Guimera J, Becker W, Guillemot F, Tejedor FJ. 2011. Transient expression of Mnb/dyrk1a couples cell cycle exit and differentiation of neuronal precursors by inducing p27KIP1 expression and suppressing NOTCH signaling. *Development*. 138(12):2543–54

Hardwick LJ a, Philpott A. 2014. Nervous decision-making: To divide or differentiate. *Trends Genet.* 30(6):254–61

Hart NS. 2001. Variations in cone photoreceptor abundance and the visual ecology of birds. *J. Comp. Physiol. - A Sensory, Neural, Behav. Physiol.* 187(9):685–97

Haubensak W, Attardo A, Denk W, Huttner WB. 2004. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(9):3196–3201

Haubold C, Schiegg M, Kreshuk A, Berg S, Koethe U, Hamprecht FA. 2016. Segmenting and tracking multiple dividing targets using ilastik. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 219:199–229

He J, Zhang G, Almeida AD, Cayouette M, Simons BD, Harris W a. 2012. How Variable Clones Build an Invariant Retina. *Neuron*. 75(5):786–98

He L, Li Y, Li Y, Pu W, Huang X, et al. 2017. Enhancing the precision of genetic lineage tracing using dual recombinases. *Nat. Med.* 23(12):1488–98

Helmstaedter M, Briggman KL, Turaga SC, Jain V, Seung HS, Denk W. 2013. Connectomic reconstruction of the inner plexiform layer in the mouse retina. *Nature*. 500(7461):168–74

Henner A, Ventura PB, Jiang Y, Zong H. 2013. MADM-ML, a Mouse Genetic Mosaic System with Increased Clonal Efficiency. *PLoS One*. 8(10):e77672

Hernandez J, Matter-Sadzinski L, Skowronska-Krawczyk D, Chiodini F, Alliod C, et al. 2007. Highly conserved sequences mediate the dynamic interplay of basic helix-loop-helix proteins regulating retinogenesis. *J. Biol. Chem.* 282(52):37894–905

Holt CE, Bertsch TW, Ellis HM, Harris WA. 1988. Cellular determination in the xenopus retina is independent of lineage and birth date. *Neuron*. 1(1):15–26

Hosseini HS, Taber LA. 2018. How mechanical forces shape the developing eye. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 137:25–36

Huang S, Moody SA. 1995. Asymmetrical blastomere origin and spatial domains of dopamine

- and neuropeptide Y amacrine subtypes in *Xenopus* tadpole retina. *J. Comp. Neurol.* 360(3):442–53
- Huang S, Moody SA. 1997. Three types of serotonin-containing amacrine cells in tadpole retina have distinct clonal origins. *J. Comp. Neurol.* 387(1):42–52
- Iacopetti P, Michelini M, Stuckmann I, Oback B, Aaku-Saraste E, Huttner WB. 1999. Expression of the antiproliferative gene TIS21 at the onset of neurogenesis identifies single neuroepithelial cells that switch from proliferative to neuron-generating division. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96(8):4639–44
- Ikegaya Y, Le Bon-Jego M, Yuste R. 2005. Large-scale imaging of cortical network activity with calcium indicators. *Neurosci. Res.* 52(2):132–38
- Inoue F, Kircher M, Martin B, Cooper GM, Witten DM, et al. 2017. A systematic comparison reveals substantial differences in chromosomal versus episomal encoding of enhancer activity. *Genome Res.* 27(1):38–52
- Inoue M, Kamachi Y, Matsunami H, Imada K, Uchikawa M, Kondoh H. 2007. PAX6 and SOX2-dependent regulation of the Sox2 enhancer N-3 involved in embryonic visual system development. *Genes to Cells.* 12(9):1049–61
- Jadhav AP, Cho SH, Cepko CL. 2006. Notch activity permits retinal cells to progress through multiple progenitor states and acquire a stem cell property. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(50):18998–3
- Jadhav AP, Roesch K, Cepko CL. 2009. Development and neurogenic potential of Müller glial cells in the vertebrate retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 28(4):249–62
- Jefferis GSXE, Livet J. 2012. Sparse and combinatorial neuron labelling. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22(1):101–10
- Jiao Y, Lau T, Hatzikirou H, Meyer-Hermann M, Corbo JC, Torquato S. 2014. Avian photoreceptor patterns represent a disordered hyperuniform solution to a multiscale packing problem. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* 89(2):1–13
- Jorstad L, Wilken MS, Grimes WN, Wohl SG, Vandenbosch LS, et al. 2017. Stimulation of functional neuronal regeneration from Müller glia in adult mice. *Nat. Publ. Gr.* 548(7665):103–7
- Jusuf PR, Almeida AD, Randlett O, Joubin K, Poggi L, Harris WA. 2011. Origin and Determination of Inhibitory Cell Lineages in the Vertebrate Retina. *J. Neurosci.* 31(7):2549–62
- Kamaid A, Giraldez F. 2008. Btg1 and Btg2 gene expression during early chick development. *Dev. Dyn.* 237(8):2158–69
- Kanter I, Kalisky T. 2015. Single cell transcriptomics: methods and applications. *Front. Oncol.* 5(March):53
- Kawakami K. 2007. Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biol.* 8 Suppl 1(Suppl 1):S7
- Kawakami K, Imanaka K, Itoh M, Taira M. 2004a. Excision of the Tol2 transposable element

- of the medaka fish *Oryzias latipes* in *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Gene*. 338(1):93–98
- Kawakami K, Takeda H, Kawakami N, Kobayashi M, Matsuda N, Mishina M. 2004b. A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. *Dev. Cell*. 7(1):133–44
- Kay JN, Chu MW, Sanes JR. 2012. MEGF10 and MEGF11 mediate homotypic interactions required for mosaic spacing of retinal neurons. *Nature*. 483(7390):465–69
- Ke M-T, Nakai Y, Fujimoto S, Takayama R, Yoshida S, et al. 2016. Super-Resolution Mapping of Neuronal Circuitry With an Index-Optimized Clearing Agent. *Cell Rep*. 14(11):2718–32
- Keeley PW, Whitney IE, Madsen NR, St. John AJ, Borhanian S, et al. 2014. Independent genomic control of neuronal number across retinal cell types. *Dev. Cell*. 30(1):103–9
- Kelsey G, Stegle O, Reik W. 2017. Single-cell epigenomics: Recording the past and predicting the future. *Science (80-.)*. 358:69–75
- Kim IB, Oh SJ, Chun MH. 2000. Neuronal nitric oxide synthase immunoreactive neurons in the mammalian retina. *Microsc. Res. Tech*. 50(2):112–23
- Kim IJ, Zhang Y, Yamagata M, Meister M, Sanes JR. 2008. Molecular identification of a retinal cell type that responds to upward motion. *Nature*. 452(7186):478–82
- Kise Y, Schmucker D. 2013. Role of self-avoidance in neuronal wiring. *Curr. Opin. Neurobiol*. 23(6):983–89
- Kishi JY, Lapan SW, Beliveau BJ, West ER, Zhu A, et al. 2019. SABER amplifies FISH: enhanced multiplexed imaging of RNA and DNA in cells and tissues. *Nat. Methods*
- Kosodo Y, Röper K, Haubensak W, Marzesco A-M, Corbeil D, Huttner WB. 2004. Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. *EMBO J*. 23(11):2314–24
- Kostadinov D, Sanes JR. 2015. Protocadherin-dependent dendritic selfavoidance regulates neural connectivity and circuit function. *Elife*. 4(JULY2015):1–23
- Kowalchuk AM, Maurer KA, Shoja-Taheri F, Brown NL. 2018. Requirements for Neurogenin2 during mouse postnatal retinal neurogenesis. *Dev. Biol*. 442(2):220–35
- Kram YA, Mantey S, Corbo JC. 2010. Avian cone photoreceptors tile the retina as five independent, self-organizing mosaics. *PLoS One*. 5(2):
- Krishnaswamy A, Yamagata M, Duan X, Hong YK, Sanes JR. 2015. Sidekick 2 directs formation of a retinal circuit that detects differential motion. *Nature*. 524(7566):466–70
- Kunst M, Laurell E, Mokayes N, Kramer A, Kubo F, et al. 2019. A Cellular-Resolution Atlas of the Larval Zebrafish Brain. *Neuron*. 103(1):21–38.e5
- La Manno G, Soldatov R, Zeisel A, Braun E, Hochgerner H, et al. 2018. RNA velocity of single cells. *Nature*. 560(7719):494–98
- Lachke SA, Maas RL. 2010. Building the developmental oculome: Systems biology in

- vertebrate eye development and disease. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2(3):305–23
- Lacoste A, Berenshteyn F, Brivanlou AH. 2009. An Efficient and Reversible Transposable System for Gene Delivery and Lineage-Specific Differentiation in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 5(3):332–42
- Lancaster MA. 2018. An Electric Take on Neural Fate and Cortical Development. *Dev. Cell.* 48(1):1–2
- Lee G, Saito I. 1998. Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene.* 216(1):55–65
- Legland D, Arganda-Carreras I, Andrey P. 2016. MorphoLibJ: Integrated library and plugins for mathematical morphology with ImageJ. *Bioinformatics.* 32(22):3532–34
- Lewis AA, Mahoney JT, Wilson N, Brockerhoff SE. 2015. Identification of amacrine subtypes that express the atypical cadherin celsr3. *Exp. Eye Res.* 130:51–57
- Li J, Gallemore RP, Dmitriev A, Steinberg RH. 1993. Light-Dependent Hydration of the Space Surrounding Photoreceptors in Chick Retina. . 35(6):2700–2711
- Li S, Sukeena JM, Simmons AB, Hansen EJ, Nuhn RE, et al. 2015. Dscam promotes refinement in the mouse retina through cell death and restriction of exploring dendrites. *J. Neurosci.* 35(14):5640–54
- Lichtman JW, Livet J, Sanes JR. 2008. A technicolour approach to the connectome. *Nat. Rev. Neurosci.* 9(6):417–22
- Lin B, Wang SW, Masland RH. 2004. Retinal ganglion cell type, size, and spacing can be specified independent of homotypic dendritic contacts. *Neuron.* 43(4):475–85
- Lin MZ, Schnitzer MJ. 2016. Genetically encoded indicators of neuronal activity. *Nat. Neurosci.* 19(9):1142–53
- Liu X, Zhou Y, Gong HQ, Liang PJ. 2007. Contribution of the GABAergic pathway(s) to the correlated activities of chicken retinal ganglion cells. *Brain Res.* 1177(1):37–46
- Livesey FJ, Cepko CL. 2001. Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nat. Rev. Neurosci.* 2(2):109–18
- Livet J, Weissman TA, Kang H, Draft RW, Lu J, et al. 2007. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature.* 450(7166):56–62
- Loulier K, Barry R, Mahou P, Franc Y Le, Supatto W, et al. 2014. Multiplex Cell and Lineage Tracking with Combinatorial Labels. *Neuron.* 81(3):505–20
- Macdonald J, Taylor L, Sherman A, Kawakami K, Takahashi Y, et al. 2012. Efficient genetic modification and germ-line transmission of primordial germ cells using piggyBac and Tol2 transposons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109(23):E1466–72
- MacLean JN, Yuste R. 2005. A practical guide: imaging action potentials with calcium indicators

- Maher BJ, Maher BJ, Loturco JJ. 2014. PiggyBac transposon-mediated cellular transgenesis in mammalian forebrain by in utero electroporation. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2014(7):741–49
- Marcon L, Sharpe J. 2012. Turing patterns in development: What about the horse part? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22(6):578–84
- Masland RH. 2012. The Neuronal Organization of the Retina. *Neuron.* 76(2):266–80
- Mata NL, Radu RA, Clemmons RS, Travis GH. 2002. Isomerization and oxidation of vitamin A in cone-dominant retinas: A novel pathway for visual-pigment regeneration in daylight. *Neuron.* 36(1):69–80
- Matsuda T, Cepko CL. 2007. Controlled expression of transgenes introduced by in vivo electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(3):1027–32
- Matter-Sadzinski L, Matter JM, Ong MT, Hernandez J, Ballivet M. 2001. Specification of neurotransmitter receptor identity in developing retina: the chick ATH5 promoter integrates the positive and negative effects of several bHLH proteins. *Development.* 128(2):217–31
- McGrew MJ, Sherman A, Ellard FM, Lillico SG, Gilhooley HJ, et al. 2004. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep.* 5(7):728–33
- McKenna A, Findlay G, Gagnon JA, Horwitz M, Schier AFF, Shendure J. 2016. Whole organism lineage tracing by combinatorial and cumulative genome editing. *bioRxiv.* 7907(May):052712
- Mey J, Thanos S. 2000. Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 32(2–3):343–79
- Moiseyev G, Takahashi Y, Chen Y, Kim S, Ma JX. 2008. RPE65 from cone-dominant chicken is a more efficient isomerohydrolase compared with that from rod-dominant species. *J. Biol. Chem.* 283(13):8110–17
- Moody SA, Chow I, Huang S. 2000. Intrinsic bias and lineage restriction in the phenotype determination of dopamine and neuropeptide Y amacrine cells. *J. Neurosci.* 20(9):3244–53
- Muniz A, Villazana-Espinoza ET, Hatch AL, Trevino SG, Allen DM, Tsin ATC. 2007. A novel cone visual cycle in the cone-dominated retina. *Exp. Eye Res.* 85(2):175–84
- Murtaugh LC, Stanger BZ, Kwan KM, Melton DA. 2003. Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100(25):14920–25
- Nakamura H, O’Leary DD. 1989. Inaccuracies in initial growth and arborization of chick retinotectal axons followed by course corrections and axon remodeling to develop topographic order. *J. Neurosci.* 9(11):3776–95
- Nelson BR, Hartman BH, Ray C a., Hayashi T, Bermingham-McDonogh O, Reh T a. 2009. Acheate-scute like 1 (Ascl1) is required for normal delta-like (Dll) gene expression and notch signaling during retinal development. *Dev. Dyn.* 238(9):2163–78

- Nern A, Pfeiffer BD, Rubin GM. 2015. Optimized tools for multicolor stochastic labeling reveal diverse stereotyped cell arrangements in the fly visual system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112(22):E2967–76
- Neumann T, Ziegler C, Blau A. 2008. Multielectrode array recordings reveal physiological diversity of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the chick embryo. *Brain Res.* 1207:120–27
- Nguyen PD, Currie PD. 2018. Guidelines and best practices in successfully using Zebrow for lineage tracing multiple cells within tissues. *Methods.* 150(July):63–67
- Nilsson D-E. 2013. Eye evolution and its functional basis. *Vis. Neurosci.* 30(1–2):5–20
- Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene.* 108(2):193–99
- Nomura T, Ohtaka-Maruyama C, Yamashita W, Wakamatsu Y, Murakami Y, et al. 2016. The evolution of basal progenitors in the developing non-mammalian brain. *Development.* 143(1):66–74
- Novelli E, Resta V, Galli-Resta L. 2005. Mechanisms controlling the formation of retinal mosaics. *Prog. Brain Res.* 147(SPEC. ISS.):141–53
- Oheim M, van 't Hoff M, Feltz A, Zamaleeva A, Mallet JM, Collot M. 2014. New red-fluorescent calcium indicators for optogenetics, photoactivation and multi-color imaging. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1843(10):2284–2306
- Okawa H, Della Santina L, Schwartz GW, Rieke F, Wong ROL. 2014. Interplay of cell-autonomous and nonautonomous mechanisms tailors synaptic connectivity of converging axons in vivo. *Neuron.* 82(1):125–37
- Ortiz-Álvarez G, Daclin M, Shihavuddin A, Lansade P, Fortoul A, et al. 2019. Adult Neural Stem Cells and Multiciliated Ependymal Cells Share a Common Lineage Regulated by the Geminin Family Members. *Neuron.* 102(1):159-172.e7
- Osterhout JA, El-Danaf RN, Nguyen PL, Huberman AD. 2014. Birthdate and outgrowth timing predict cellular mechanisms of axon target matching in the developing visual pathway. *Cell Rep.* 8(4):1006–17
- Owens MT, Feldheim DA, Stryker MP, Triplett JW. 2015. Stochastic Interaction between Neural Activity and Molecular Cues in the Formation of Topographic Maps. *Neuron.* 87(6):1261–73
- Pan YA, Freundlich T, Weissman TA, Schoppik D, Cindy Wang X, et al. 2013. Zebrow: Multispectral cell labeling for cell tracing and lineage analysis in zebrafish. *Dev.* 140(13):2835–46
- Pan YA, Livet J, Sanes JR, Lichtman JW, Schier AF. 2011. Multicolor brainbow imaging in Zebrafish. *Cold Spring Harb. Protoc.* 6(1):37–44
- Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD. 2008. Chemical calcium indicators. *Methods.* 46(3):143–51
- Peng Y-R, Shekhar K, Yan W, Herrmann D, Sappington A, et al. 2019. Molecular

- Classification and Comparative Taxonomics of Foveal and Peripheral Cells in Primate Retina. *Cell*. 176(5):1222-1237.e22
- Peng YR, Tran NM, Krishnaswamy A, Kostadinov D, Martersteck EM, Sanes JR. 2017. Satb1 Regulates Contactin 5 to Pattern Dendrites of a Mammalian Retinal Ganglion Cell. *Neuron*. 95(4):869-883.e6
- Pérez Saturnino A, Lust K, Wittbrodt J. 2018. Notch signalling patterns retinal composition by regulating atoh7 during post-embryonic growth. *Development*. 145(21):dev169698
- Perli SD, Cui CH, Lu TK. 2016. Continuous Genetic Recording with Self-Targeting CRISPR-Cas in Human Cells. *bioRxiv*
- Perry M, Konstantinides N, Pinto-Teixeira F, Desplan C. 2017. Generation and Evolution of Neural Cell Types and Circuits: Insights from the Drosophila Visual System. *Annu. Rev. Genet.* 51(1):501–27
- Petit AC, Legué E, Nicolas JF. 2005. Methods in clonal analysis and applications. *Reprod. Nutr. Dev.* 45:321–39
- Piatigorsky J, Kozmik Z. 2004. Cubozoan jellyfish: An evo/devo model for eyes and other sensory systems. *Int. J. Dev. Biol.* 48(8–9):719–29
- Pierfelice T, Alberi L, Gaiano N. 2011. Notch in the Vertebrate Nervous System: An Old Dog with New Tricks. *Neuron*. 69(5):840–55
- Pinto-Teixeira F, Koo C, Rossi AM, Neric N, Bertet C, et al. 2018. Development of Concurrent Retinotopic Maps in the Fly Motion Detection Circuit. *Cell*. 173(2):485-498.e11
- Poggi L, Vitorino M, Masai I, Harris WA. 2005. Influences on neural lineage and mode of division in the zebrafish retina in vivo. *J. Cell Biol.* 171(6):991–99
- Pontes-Quero S, Heredia L, Casquero-García V, Fernández-Chacón M, Luo W, et al. 2017. Dual ifgMosaic: A Versatile Method for Multispectral and Combinatorial Mosaic Gene-Function Analysis. *Cell*. 170(4):800-814.e18
- Pounds S, Dyer MA. 2008. Statistical analysis of data from retroviral clonal experiments in the developing retina. *Brain Res.* 1192:178–85
- Prada C, Medina JJ, López R, Génis-Gálvez JM, Prada F a. 1992. Development of retinal displaced ganglion cells in the chick: neurogenesis and morphogenesis. *J. Neurosci.* 12(10):3781–88
- Prada C, Puga J, Pérez-Méndez L, López R, Ramírez G. 1991. Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. *Eur. J. Neurosci.* 3(11):1187
- R Development Core Team R. 2019. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*
- Raj B, Gagnon JA, Schier AF. 2018. Large-scale reconstruction of cell lineages using single-cell readout of transcriptomes and CRISPR–Cas9 barcodes by scGESTALT. *Nat. Protoc.* 13(11):2685–2713
- Raven MA, Eglen SJ, Ohab JJ, Reese BE. 2003. Determinants of the exclusion zone in

- dopaminergic amacrine cell mosaics. *J. Comp. Neurol.* 461(1):123–36
- Raven MA, Stagg SB, Reese BE. 2005. Regularity and packing of the horizontal cell mosaic in different strains of mice. *Vis. Neurosci.* 22(4):461–68
- Ravi S, Ahn D, Greschner M, Chichilnisky EJ, Field GD. 2018. Pathway-specific asymmetries between on and off visual signals. *J. Neurosci.* 38(45):9728–40
- Reese BE. 2012. Retinal Mosaics: Pattern Formation Driven by Local Interactions between Homotypic Neighbors. *Front. Neural Circuits.* 6(May):24
- Reese BE, Galli-Resta L. 2002. The role of tangential dispersion in retinal mosaic formation. *Prog. Retin. Eye Res.* 21(2):153–68
- Reese BE, Harvey a R, Tan SS. 1995. Radial and tangential dispersion patterns in the mouse retina are cell-class specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92(7):2494–98
- Reese BE, Keeley PW. 2014. Design principles and developmental mechanisms underlying retinal mosaics. *Biol. Rev.* n/a-n/a
- Reese BE, Necessary BD, Tam PPL, Faulkner-Jones B, Tan SS. 1999. Clonal expansion and cell dispersion in the developing mouse retina. *Eur. J. Neurosci.* 11(8):2965–78
- Reese BE, Tan SS. 1998. Clonal boundary analysis in the developing retina using X-inactivation transgenic mosaic mice. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9(3):285–92
- Regehr WG, Tank DW. 1991. Selective fura-2 loading of presynaptic terminals and nerve cell processes by local perfusion in mammalian brain slice. *J. Neurosci. Methods.* 37(2):111–19
- Reiss Y, Layer PG, Kröger S. 1997. Butyrylcholinesterase-positive cells of the developing chicken retina that are non-cholinergic and GABA-positive. *Dev. Brain Res.* 100(1):62–72
- Rheume BA, Jereen A, Bolisetty M, Sajid MS, Yang Y, et al. 2018. Single cell transcriptome profiling of retinal ganglion cells identifies cellular subtypes. *Nat. Commun.* 9(1):
- Richier B, Salecker I. 2015. Versatile genetic paintbrushes: Brainbow technologies. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 4(2):161–80
- Rinkevich Y, Lindau P, Ueno H, Longaker MT, Weissman IL. 2011. Germ-layer and lineage-restricted stem/progenitors regenerate the mouse digit tip. *Nature.* 476(7361):409–14
- Rios AC, Fu NY, Lindeman GJ, Visvader JE. 2014. In situ identification of bipotent stem cells in the mammary gland. *Nature.* 506(7488):322–27
- Ritchey ER, Bongini RE, Code KA, Zelinka C, Petersen-Jones S, Fischer AJ. 2010. The pattern of expression of guanine nucleotide-binding protein $\beta 3$ in the retina is conserved across vertebrate species. *Neuroscience.* 169(3):1376–91
- Rizzo MA, Springer GH, Granada B, Piston DW. 2004. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat. Biotechnol.* 22(4):445–49
- Rockhill RL, Euler T, Masland RH. 2000. Spatial order within but not between types of retinal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97(5):2303–7

- Rodieck RW. 1991. The density recovery profile: a method for the analysis of points in the plane applicable to retinal studies. *Vis. Neurosci.* 6(2):95–111
- Rompani SB, Cepko CL. 2008. Retinal progenitor cells can produce restricted subsets of horizontal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105(1):192–97
- Rosa JM, Morrie RD, Baertsch HC, Feller MB. 2016. Contributions of rod and cone pathways to retinal direction selectivity through development. *J. Neurosci.* 36(37):9683–95
- Rose T, Goltstein PM, Portugues R, Griesbeck O. 2014. Putting a finishing touch on GECIs. *Front. Mol. Neurosci.* 7(November):88
- Rousso DL, Qiao M, Kagan RD, Yamagata M, Palmiter RD, Sanes JR. 2016. Two Pairs of ON and OFF Retinal Ganglion Cells Are Defined by Intersectional Patterns of Transcription Factor Expression. *Cell Rep.* 15(9):1930–44
- Roy E, Neufeld Z, Cerone L, Wong HY, Hodgson S, et al. 2016. Bimodal behaviour of interfollicular epidermal progenitors regulated by hair follicle position and cycling. *EMBO J.* 35(24):2658–70
- Roy E, Neufeld Z, Livet J, Khosrotehrani K. 2014. Understanding clonal dynamics in homeostasis and injury through multicolour lineage tracing. *Stem Cells.* 1–11
- Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, et al. 2017. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics.* 18(1):
- Rulands S, Iglesias-Gonzalez AB, Boije H. 2018. Deterministic fate assignment of Müller glia cells in the zebrafish retina suggests a clonal backbone during development. *Eur. J. Neurosci.* 48(12):3597–3605
- Rulands S, Simons BD. 2016. Tracing cellular dynamics in tissue development, maintenance and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 43:38–45
- Saade M, Gutiérrez-Vallejo I, LeDréau G, Rabadán MA, Miguez D, et al. 2013. Sonic hedgehog signaling switches the mode of division in the developing nervous system. *Cell Rep.* 4(3):492–503
- Sakaguchi R, Leiwe MN, Imai T. 2018. Bright multicolor labeling of neuronal circuits with fluorescent proteins and chemical tags. *Elife.* 7:1–28
- Sanes JR, Masland RH. 2014. The Types of Retinal Ganglion Cells: Current Status and Implications for Neuronal Classification. *Annu. Rev. Neurosci.* 38(1):150421150146009
- Sato T, Yoneyama T, Matsumoto N, Somei K, Suzuki TA, Tazawa Y. 1985. Osmotic pressure of the interstitial fluid obtained from neonatal chick eyes and its variation under light and dark adaptation. *Doc. Ophthalmol.* 61(1):79–89
- Sato Y, Kasai T, Nakagawa S, Tanabe K, Watanabe T, et al. 2007. Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos. *Dev. Biol.* 305(2):616–24
- Schepers AG, Snippert HJ, Stange DE, Van Den Born M, Van Es JH, et al. 2012. Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science (80-.).* 337(6095):730–35

- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, et al. 2012. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis
- Seo I, Lee H. 2019. Predicting transgenic markers of a neuron by electrophysiological properties using machine learning. *Brain Res. Bull.* 150(April):102–10
- Seung HS, Sümbül U. 2014. Neuronal cell types and connectivity: Lessons from the retina. *Neuron.* 83(6):1262–72
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE, Tsien RY. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22(12):1567–72
- Shekhar K, Lapan SW, Whitney IE, Tran NM, Macosko EZ, et al. 2016. Comprehensive Classification of Retinal Bipolar Neurons by Single-Cell Transcriptomics. *Cell.* 166(5):1308-1323.e30
- Shi M, Kumar SR, Motajo O, Kretschmer F, Mu X, Badea TC. 2013. Genetic Interactions between Brn3 Transcription Factors in Retinal Ganglion Cell Type Specification. *PLoS One.* 8(10):
- Shi X, Barchini J, Ledesma HA, Koren D, Jin Y, et al. 2017. Retinal origin of direction selectivity in the superior colliculus. *Nat. Neurosci.* 20(4):
- Siebert S, Cabuy E, Scherf BG, Kohler H, Panda S, et al. 2012. Transcriptional code and disease map for adult retinal cell types. *Nat Neurosci.* 15(3):487–95, S1-2
- Snippert HJ, van der Flier LG, Sato T, van Es JH, van den Born M, et al. 2010. Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell.* 143(1):134–44
- Sommer C, Straehle C, Kothe U, Hamprecht FA. 2011. Ilastik: Interactive learning and segmentation toolkit. *Proc. - Int. Symp. Biomed. Imaging.* (September 2014):230–33
- Spanjaard B, Hu B, Mitic N, Olivares-Chauvet P, Janjuha S, et al. 2018. Simultaneous lineage tracing and cell-type identification using CrIsPr-Cas9-induced genetic scars. *Nat. Biotechnol.* 36(5):469–73
- Stenkamp DL, Powers MK, Carney LH, Cameron DA. 2001. Evidence for two distinct mechanisms evidence for neurogenesis and cellular pattern formation in regenerated goldfish retinas. *J. Comp. Neurol.* 431(4):363–81
- Sterratt DC, Lyngholm D, Willshaw DJ, Thompson ID. 2013. Standard Anatomical and Visual Space for the Mouse Retina: Computational Reconstruction and Transformation of Flattened Retinae with the Retistruct Package. *PLoS Comput. Biol.* 9(2):
- Stett A, Barth W, Weiss S, Haemmerle H, Zrenner E. 2000. Electrical multisite stimulation of the isolated chicken retina. *Vision Res.* 40(13):1785–95
- Sümbül U, Song S, McCulloch K, Becker M, Lin B, et al. 2014. A genetic and computational approach to structurally classify neuronal types. *Nat. Commun.* 5:
- Sun SX. 2015. Stochastic Models for Population Dynamics. *bioRxiv*
- Suzuki IK, Gacquer D, Van Heurck R, Kumar D, Wojno M, et al. 2018. Human-Specific

- NOTCH2NL Genes Expand Cortical Neurogenesis through Delta/Notch Regulation. *Cell*. 173(6):1370-1384.e16
- Suzuki SC, Bleckert A, Williams PR, Takechi M, Kawamura S, Wong ROL. 2013. Cone photoreceptor types in zebrafish are generated by symmetric terminal divisions of dedicated precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110(37):15109–14
- Sweeney NT, James KN, Nistorica A, Lorig-Roach RM, Feldheim DA. 2017. Expression of transcription factors divides retinal ganglion cells into distinct classes. *J. Comp. Neurol.* 520(Sfb 655):633–55
- Tabansky I, Lenarcic A, Draft RW, Loulier K, Keskin DB, et al. 2013. Developmental bias in cleavage-stage mouse blastomeres. *Curr. Biol.* 23(1):21–31
- Takemura S. 2015. Connectome of the fly visual circuitry. *Microscopy*. 64(1):37–44
- Tang X, Gao J, Jia X, Zhao W, Zhang Y, et al. 2017. Bipotent progenitors as embryonic origin of retinal stem cells. *J. Cell Biol.* 216(6):1833–47
- Tarchini B, Jolicoeur C, Cayouette M. 2012. In vivo evidence for unbiased ikaros retinal lineages using an ikaros-cre mouse line driving clonal recombination. *Dev. Dyn.* 241(12):1973–85
- Telley L, Agirman G, Prados J, Amberg N, Fièvre S, et al. 2019. Temporal patterning of apical progenitors and their daughter neurons in the developing neocortex. *Science (80-.).* 364(6440):eaav2522
- Telley L, Govindan S, Prados J, Stevant I, Nef S, et al. 2016. Sequential transcriptional waves direct the differentiation of newborn neurons in the mouse neocortex. *Science (80-.).* 351(6280):1443–46
- Thanos S, Mey J. 2001. Development of the visual system of the chick II. Mechanisms of axonal guidance. *Brain Res. Rev.* 35(3):205–45
- Thu CA, Chen W V., Rubinstein R, Chevee M, Wolcott HN, et al. 2014. Single-cell identity generated by combinatorial homophilic interactions between α , β , and γ protocadherins. *Cell*. 158(5):1045–59
- Tozer S, Baek C, Fischer E, Goiaime R, Morin X. 2017. Differential Routing of Mindbomb1 via Centriolar Satellites Regulates Asymmetric Divisions of Neural Progenitors. *Neuron*. 93(3):542-551.e4
- Trevino SG, Villazana-Espinoza ET, Muniz A, Tsin ATC. 2005. Retinoid cycles in the cone-dominated chicken retina. *J. Exp. Biol.* 208(Pt 21):4151–57
- Trimarchi JM, Stadler MB, Cepko CL. 2008. Individual retinal progenitor cells display extensive heterogeneity of gene expression. *PLoS One*. 3(2):
- Turner DL, Snyder EY, Cepko CL. 1990. Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron*. 4(6):833–45
- Tyler MJ, Cameron DA. 2007. Cellular pattern formation during retinal regeneration: A role for homotypic control of cell fate acquisition. *Vision Res.* 47(4):501–11
- Tyler MJ, Carney LH, Cameron DA. 2005. Control of cellular pattern formation in the

- vertebrate inner retina by homotypic regulation of cell-fate decisions. *J. Neurosci.* 25(18):4565–76
- Valenciano AI, Boya P, De La Rosa EJ. 2009. Early neural cell death: Numbers and cues from the developing neuroretina. *Int. J. Dev. Biol.* 53(8–10):1515–28
- Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC. 2016. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 51:1–40
- Vergara MN, Canto-Soler MV. 2012. Rediscovering the chick embryo as a model to study retinal development. *Neural Dev.* 7(1):22
- Viets K, Eldred KC, Johnston RJ. 2016. Mechanisms of Photoreceptor Patterning in Vertebrates and Invertebrates. *Trends Genet.* 32(10):638–59
- Visser JJ, Cheng Y, Perry SC, Chastain AB, Parsa B, et al. 2015. An extracellular biochemical screen reveals that FLRTs and Unc5s mediate neuronal subtype recognition in the retina. *Elife.* 4(December2015):
- Vitorino M, Jusuf PR, Maurus D, Kimura Y, Higashijima SI, Harris WA. 2009. Vsx2 in the zebrafish retina: Restricted lineages through derepression. *Neural Dev.* 4(1):
- Vlasits AL, Euler T, Franke K. 2019. Function first: classifying cell types and circuits of the retina. *Curr. Opin. Neurobiol.* 56:8–15
- Voinescu PE, Kay JN, Sanes JR. 2009. Birthdays of retinal amacrine cell subtypes are systematically related to their molecular identity and soma position. *J. Comp. Neurol.* 517(5):737–50
- Wai MSM, Lorke DE, Kung LS, Yew DT. 2006. Morphogenesis of the different types of photoreceptors of the chicken (*Gallus domesticus*) retina and the effect of amblyopia in neonatal chicken. *Microsc. Res. Tech.* 69(2):99–107
- Wang J, O’Sullivan ML, Mukherjee D, Puñal VM, Farsiu S, Kay JN. 2017. Anatomy and spatial organization of Müller glia in mouse retina. *J. Comp. Neurol.* 525(8):1759–77
- Wang SW, Kim BS, Ding K, Wang H, Sun D, et al. 2001. Requirement for math5 in the development of retinal ganglion cells. *Genes Dev.* 15(1):24–29
- Wang X, Allen WE, Wright MA, Sylwestrak EL, Samusik N, et al. 2018. Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. *Science (80-.).* 361(6400):
- Wässle H, Puller C, Müller F, Haverkamp S. 2009. Cone contacts, mosaics, and territories of bipolar cells in the mouse retina. *J. Neurosci.* 29(1):106–17
- Watanabe S, Sanuki R, Sugita Y, Imai W, Yamazaki R, et al. 2015. Prdm13 regulates subtype specification of retinal amacrine interneurons and modulates visual sensitivity. *J. Neurosci.* 35(20):8004–20
- Weinstein JA, Regev A, Zhang F. 2019. DNA Microscopy: Optics-free Spatio-genetic Imaging by a Stand-Alone Chemical Reaction. *Cell.* 178(1):229–241.e16
- Weissman T a., Sanes JR, Lichtman JW, Livet J. 2011. Generating and imaging multicolor Brainbow mice. *Cold Spring Harb. Protoc.* 6(7):763–69

- Weissman TA, Pan YA. 2014. Brainbow: New resources and emerging biological applications for multicolor genetic labeling and analysis. *Genetics*. 199(2):293–306
- Whitney IE, Raven MA, Ciobanu DC, Poché RA, Ding Q, et al. 2011. Genetic modulation of horizontal cell number in the mouse retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108(23):9697–9702
- Wickham H. 2009. *Ggplot2 : Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer
- Williams PR, Morgan JL, Kerschensteiner D, Wong ROL. 2013. In vitro imaging of retinal whole mounts. *Cold Spring Harb. Protoc.* 8(1):20–27
- Williams RW, Goldowitz D. 1992. Structure of clonal and polyclonal cell arrays in chimeric mouse retina. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89(4):1184–88
- Wong WT, Sanes JR, Wong RO. 1998. Developmentally regulated spontaneous activity in the embryonic chick retina. *J. Neurosci.* 18(21):8839–52
- Wortel JF, Rugenbrick H, Nuboer JFW. 1986. The photopic spectral sensitivity of the dorsal and ventral retinæ of the chicken. *J Comp Physiol A.* 160:151–54
- Xiang M. 2013. Intrinsic control of mammalian retinogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 70(14):2519–32
- Xu S, Xiao Q, Cosmanescu F, Sergeeva AP, Yoo J, et al. 2018. Interactions between the Ig-Superfamily Proteins DIP- α and Dpr6/10 Regulate Assembly of Neural Circuits. *Neuron*. 100(6):1369-1384.e6
- Yang B, Treweek JB, Kulkarni RP, Deverman BE, Chen CK, et al. 2014. Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing. *Cell*. 158(4):945–58
- Yoshida A, Yamaguchi Y, Nonomura K, Kawakami K, Takahashi Y, Miura M. 2010. Simultaneous expression of different transgenes in neurons and glia by combining in utero electroporation with the Tol2 transposon-mediated gene transfer system. *Genes to Cells*. 15(5):501–12
- Zacharias DA, Violin JD, Newton AC, Tsien RY. 2002. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science (80-.)*. 296(5569):913–16
- Zeisel A, Hochgerner H, Lönnerberg P, Johnsson A, Memic F, et al. 2018. Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. *Cell*. 174(4):999-1014.e22
- Zeng H, Sanes JR. 2017. Neuronal cell-type classification: Challenges, opportunities and the path forward. *Nat. Rev. Neurosci.* 18(9):530–46
- Zhang SSM, Fu XY, Barnstable CJ. 2002. Molecular aspects of vertebrate retinal development. *Mol. Neurobiol.* 26(2–3):137–52
- Zhou Y, Chen A-H, Gong H-Q, Liang P-J. 2005. Color information encoded by the spatiotemporal patterns of light response in ganglion cells of chick retina. *Brain Res.* 1059(1):1–6
- Zhou Y, Liu X, Liang PJ. 2007. The dual-peak light response of ganglion cells in chicken

retina. *Brain Res.* 1138(1):104–10

Ziller MJ, Edri R, Yaffe Y, Gifford C a, Xing J, et al. 2015. Dissecting neural differentiation regulatory networks through epigenetic footprinting. *Nature.* 518(7539):355–59

Annexes

Catégories	0-1	1-200	200-400	>400
Effectifs mod	3349	1375	1378	898
Effectifs obs	39	13	10	8

Table S1 - Tableau de répartition utilisé pour le test de X^2 pour la condition Parv

Catégories	0-1	1-200	200-300	300-400	400-500	>500
Effectifs mod	778	605	941	1359	1148	1869
Effectifs obs	11	9	10	11	11	15

Table S2 - Tableau de répartition utilisé pour le test de X^2 pour la condition 5-HT

Catégories	0-1	1-1500	1500-2500	2500-3500	>3500
Effectifs mod	102	300	1525	3293	1580
Effectifs obs	1	14	23	16	14

Table S3 - Tableau de répartition utilisé pour le test de X^2 pour la condition Isl1

***Direct readout of neural stem cell transgenesis with an
integration-coupled gene expression switch***

Takuma Kumamoto¹, Franck Maurinot^{1†}, Raphaëlle Barry^{1†}, Célia Vaslin², Sandrine Vandormael-Pournin^{3,4}, Mickaël Le¹, Marion Lerat¹, Michel Cohen-Tannoudji^{3,4}, Alexandra Rebsam², Karine Loulier¹, Stéphane Nédelec², Samuel Tozer¹ and Jean Livet^{1,5*}

¹Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, 75012 Paris, France.

² Sorbonne Université, INSERM UMR-S 1270, Institut du Fer à Moulin, 75005 Paris, France.

³Early Mammalian Development and Stem Cell Biology, Department of Developmental & Stem Cell Biology, Institut Pasteur, 75015, Paris, France.

⁴CNRS UMR 3738, Institut Pasteur, 75015, Paris, France.

⁵Lead contact.

†these authors contributed equally

*Correspondence: jean.livet@inserm.fr

SUMMARY

Stable genomic integration of exogenous transgenes is critical for neurodevelopmental and neural stem cell studies. Despite the emergence of tools driving genomic insertion at high rates with DNA vectors, transgenesis procedures remain fundamentally hindered by the impossibility to distinguish integrated transgenes from residual episomes. Here, we introduce a novel genetic switch termed iOn that triggers gene expression upon insertion in the host genome, enabling simple, rapid and faithful identification of integration events following transfection with naked plasmids accepting large cargoes. In vitro, iOn permits rapid drug-free stable transgenesis of mouse and human pluripotent stem cells with multiple vectors. In vivo, we demonstrate accurate cell lineage tracing, assessment of regulatory elements and mosaic analysis of gene function in somatic transgenesis experiments that reveal new aspects of neural progenitor potentialities and interactions. These results establish iOn as an efficient and widely applicable strategy to report transgenesis and accelerate genetic engineering in cultured systems and model organisms.

INTRODUCTION

Gene transfer approaches enabling stable genomic integration and expression of exogenous transgenes in host cells or organisms are central in biology. Constant progress in integrative vector systems facilitate their implementation for a growing range of purposes, such as investigation of gene function and regulation (Akhtar et al., 2013), genetic screens (Doench, 2018), stem cell engineering (Tewary et al., 2018), cell based therapies (Hirsch et al., 2017) and emerging synthetic biology applications (Black et al., 2017; Ebrahimkhani and Ebisuya, 2019). Neurobiology is one of the fields which has been the most profoundly impacted by these approaches. In cultured systems, additive transgenesis is widely used to derive cells homogenously expressing one or more genes of interest, a process instrumental in efforts to direct pluripotent stem cells towards specific neuronal lineages, decipher the mechanisms regulating their differentiation and harness these cells to model neural pathologies (e.g. (Kondo et al., 2017; Nehme et al., 2018; Yang et al., 2017)). In vivo, somatic transgenesis approaches that directly target neural progenitors in vivo have acquired major importance for neurodevelopmental studies by enabling to permanently mark these cells and trace their lineage. Seminal studies have taken advantage of retroviral vectors to characterize the neuronal and glial descent of embryonic neural progenitors in model animals (Noctor et al., 2001; Price et al., 1987; Yu et al., 2012). The location of these progenitors along the lumen of the neural tube also makes them accessible to integrative schemes based on DNA electroporation applicable to trace neural cell lineage (Chen and Loturco, 2012; Loulier et al., 2014), target specific genes and mark their product (Mikuni et al., 2016; Suzuki et al., 2016), or even perform in situ screens for genes involved in neurodevelopmental processes (Lu et al., 2018). Postmitotic neurons can also be directly targeted with lentiviral vectors (Parr-Brownlie et al.,

2015) or recent AAV-based strategies (Nishiyama et al., 2017).

Genomic integration at the highest possible rate is essential in all the above applications. Viral vectors are still broadly used to this effect, but their production is time and resource consuming and they are inherently limited in cargo capacity. Fast and convenient to produce, naked DNA vectors have become a tool of choice for gene transfer, combined with transposases or programmable endonucleases (Ivics et al., 2009; Suzuki et al., 2016), the former ones providing higher efficiency essential for the integration of large transgenes. However, stable transgenesis with classic DNA vectors faces a universal problem: the identification of genome-integration events after transfection is hampered by the presence of residual non-integrated (episomal) transgene copies. In cultured cells, week-long delays are required to eliminate these episomes, usually in presence of drugs, with inherent risks of genetic or epigenetic drift (Liang and Zhang, 2013; Merkle et al., 2017), severely limiting the applicability and throughput of stable transgenesis compared to transient expression approaches. In vivo, transient episomal expression may confound the interpretation of somatic transgenesis experiments, because the past history of transgene expression in a population of cells may not be accurately reflected by the markers they harbor: as episomal transgenes are progressively lost through cell division, they may alter the behavior of progenitors while being undetectable in their descent. This essentially precludes the development of reliable functional mosaic analysis schemes based on exogenous DNA vectors applicable to probe neural stem cell regulation, until now only possible by resorting to complex genetic schemes (Pontes-Quero et al., 2017; Zong et al., 2005). Moreover, in vitro as well as in vivo, episomes may cause leakage from cell type-specific promoters (Inoue et al., 2017) and the burst of marker expression that follows transfection may have harmful effects on cell behavior, identity and viability (Batard et al., 2001).

Here, we introduce an integration-coupled On (iOn) gene expression switch through which

genomic insertion of an initially silent transgene triggers its expression. We present several implementations of this concept that efficiently couple transcriptional or translational gene activation to genomic integration. We demonstrate its advantages in vitro for highly efficient establishment of stable mouse and human pluripotent stem cell lines expressing multiple transgenes. In vivo, somatic transfection with iOn is a powerful alternative to additive transgenesis to drive constitutive or conditional expression of reporters and effectors. This enabled us to determine the clonal output of progenitor subtypes in the developing retina and to uncover a homeostatic control of neurogenesis in the embryonic neural tube. These results establish iOn as an efficient strategy for direct readout of transgenesis applicable to accelerate and facilitate genetic manipulations in neurodevelopmental and neural stem cell studies.

RESULTS

Design and validation of an integration-coupled gene expression switch

To create the iOn switch ([Figure 1](#)), we took advantage of the piggyBac transposition system (Fraser et al., 1996), currently one of the most efficient tool for genomic integration of exogenous DNA (Ding et al., 2005), characterized by its very large cargo capacity (Li et al., 2011) and precise cut-and-paste mechanism mediating traceless transposon excision. In classic transposon vectors ([Figure 1A, left](#)), the transgene, framed by two antiparallel-oriented terminal repeats recognized by the piggyBac transposase, is readily active prior to excision from the donor plasmid. We reasoned that placing the terminal repeats in parallel rather than antiparallel orientation would create a situation in which transposase-mediated insertion in the host genome is accompanied by a rearrangement exploitable to trigger gene expression ([Figure](#)

1A, right).

We first designed transcriptional versions of iOn in which a promoter (Prom) and gene of interest (GOI), initially placed in opposite orientation, are reunited in a functional configuration by transposition (Figures 1A, middle, and S1). We denote this configuration $^{iOn}Prom \propto GOI$, by opposition to a classic transposon driving constitutive expression noted $^{PB}Prom::GOI$. We tested different iOn vector designs using the broadly active CAG promoter and a red fluorescent protein (RFP) as GOI, which we assayed by transfection in HEK293 cells in presence or absence of piggyBac transposase (PBase) (Figure S1). 3 days after transfection, PBase-dependent RFP expression was observed with all tested constructs, validating the iOn switch concept. We selected the configuration with highest signal to noise ratio (Figure S1C). This $^{iOn}CAG \propto RFP$ construct yielded efficient RFP expression with minimal background transcription in absence of PBase (0.4%, Figure 1B, middle). While this faint leakiness may be tolerated in most applications, we nevertheless sought to suppress it by designing a “Leak-proof iOn” (LiOn) switch in which both transcription and translation are blocked in absence of transposase. In LiOn vectors, the GOI open reading frame (ORF) is initially interrupted after the translational start and reconstituted upon PBase action, the piggyBac excision footprint (TTAA) being incorporated at a silent or neutral position (Figure 1A, bottom right). A vector based on this design (hereafter denoted $^{LiOn}Prom \propto GOI$) showed undetectable leakiness in absence of transposase (Figure 1B, right). Time-course experiments comparing the two types of iOn vectors with classic piggyBac-based and non-integrative plasmids showed that the iOn and LiOn switches achieve long-term GOI expression without the transient expression burst associated with vectors active in episomal form (Figure 1C). Instead, GOI expression gradually builds up, plateaus within a few days and remains in a narrower range compared to a classic transposon (Figure 1C and Figure S2A,B), a feature of high interest to reduce variability and improve protein

localization in transfection assays. Indeed in HEK293 cells transfected with a LiOn vector expressing a farnesylated GFP (GFP-Kras), near-uniform membrane expression was observed three days after transfection, while signal from a classic transposon showed frequent clustering and overflowing of GFP from the membrane compartment (Figure 1D). To confirm that the switch drives the expected transgene rearrangement, we derived clones from iOn CAG ∞ RFP-expressing cells in which we sequenced the junction between the promoter and GOI. All sequences demonstrated reunion of the two transgene elements with base pair-precision (Figure 1E, n=6). Moreover, analysis of >500 clones showed that 95.78% (± 0.73 SEM) remained RFP-positive 10 days after sorting, indicating highly efficient integration of the transgene in the genome of founder cells and maintenance of its expression over the long term (Figure 1F). By contrast, a classic iOn CAG::RFP vector yielded only 55.18% (± 5.07 SEM) of RFP-positive clones. Similarly, in mouse ES cells, fluorescence-based clonal selection with the above $LiOn$ CAG ∞ GFP-Kras vector demonstrated a high enrichment in integrative events compared to a classic transposon (Figure S2C). Thus, the dependence of the iOn switch on transposition enables efficient coupling of transgene activation and genomic integration. Importantly, short and long-term viability with iOn vectors were comparable to that of classic transposons (Figure S2D,E), and the switch was active in all cells tested, including HeLa and 3T3 (Figure S2F) as well as human pluripotent stem cells (see below). These results establish iOn as a tool for highly efficient drug-free transgenesis through which genomic expression of GOIs can be assessed directly after transfection without interfering episomal expression.

High efficiency multiplexed stable transfection with iOn vectors

Having validated the iOn switch concept, we sought to further test and extend its range of applications in cultured cells (Figure 2). Stable transfection with multiple independent

transgenes is challenging with standard DNA vectors due to false positives resulting from episomal expression and the difficulty of combining orthogonal drug selection systems. The high enrichment for integrative events achieved with iOn bypasses these issues. To simultaneously identify multiple integration events, we created LiOn vectors expressing green and near-infrared fluorescent proteins (FPs), forming a trichromatic set together with the abovementioned $^{LiOn}CAG\infty RFP$ (Figure 2A and Figure S3A). Co-transfection of the three vectors in HEK293 cells resulted in varied FP combinations, revealing activity of multiple transgenes in a large fraction of cells (Figure 2B). Strikingly, sorting and expansion of triple-fluorescent cells yielded a vast majority (80%) of clones co-expressing all three FPs 10 days after sorting, compared to only about 20% when using classic transposons (Figure 2C and Figure S3B,C), demonstrating the superior efficiency of iOn-based multiplexed transgenesis. In human induced pluripotent stem (iPS) cells, clones co-expressing all three $^{LiOn}CAG\infty FP$ vectors similarly maintained their expression at near homogenous levels over multiple passages (Figure 2D). The three-color LiOn transgenes also drove long-term expression during iPS cells differentiation towards the neural lineage, with FP combinations providing a readout of clonal relationships (Figure 2E). Thus, iOn provides an efficient route for one-shot multiplexed transgenesis in cell culture models.

Additive somatic transgenesis and cell lineage tracing with iOn

We next assessed the iOn switch in vivo (Figure 3). By efficiently coupling transgene integration and expression, iOn vectors create a situation akin to additive transgenesis through simple transfection. We tested the applicability of this strategy for somatic cell transgenesis in various assays in the developing vertebrate nervous system, where embryonic electroporation provides access to neural progenitors. In the mouse cerebral cortex, electroporation of a classic episomal

vector ($CAG::GFP$) only labeled neurons born at the time of the electroporation (E12) that migrated in intermediate layers, due to its rapid dilution in dividing progenitors (Figure 3A and S4A). In striking contrast, an $iOnCAG\infty RFP$ vector homogenously marked electroporated progenitors and all their radially-migrating derivatives, including late born upper-layer neurons and astrocytes, in a strict PBase-dependent manner. Further tests in the embryonic chicken spinal cord confirmed that iOn expression in progenitor cells, first detected one day after electroporation, was maintained in their descent (Figure 3B and S4B,C). Importantly, it avoided the strong and irregular labeling of isolated neurons polluting patterns obtained with classic transposons and episomes, likely due to inheritance of multiple non-integrated copies in cells born shortly after transfection (Figure 3B). Similar to the above two models, iOn vector electroporation in the mouse retina at the start of neurogenesis successfully labeled all retinal layers, while episomes only marked early born retinal ganglion cells (Figure 3C). In addition, combining iOn vectors expressing different colors enabled to further resolve the lineage relationships of labeled cells (Figure S4D). In the chick retina, retinal pigmented epithelium and spinal cord, FP combinations generated by the trichromatic $LiOnCAG\infty FP$ vectors efficiently contrasted groups of cells that matched known clonal patterns (Fekete et al., 1994; Leber and Sanes, 1995) (Figure 3D and S4E).

Functional mosaic analysis with iOn

Beyond lineage tracing, the iOn strategy offers a mean to create sustained experimental perturbations of specific cell signaling pathways (Figure 4). To test this possibility, we assembled a LiOn vector co-expressing RFP and the intracellular domain of the Notch receptor (NICD), a well-known regulator of neural progenitor fate (Pierfelice et al., 2011) (Figure 4A). Electroporation of this plasmid in the embryonic chick spinal cord produced the effects

expected for Notch pathway activation (Hammerle et al., 2011): marked reduction of neurogenesis and expansion of progenitors, compared to a $^{LiOn}CAG\infty GFP$ control vector (Figure 4A, B, Figure S5). Remarkably, these effects were still manifest 4 days after electroporation and were also augmented with respect to a transient perturbation. This experimental paradigm provided us with a unique opportunity to investigate the non-cell autonomous effects of an extended maintenance of neural stem cells (Figure 4C). To this aim, we generated color-coded mosaics by co-electroporating NICD-expressing (red) and control (green) iOn vectors, in which we measured the neurogenic output of GFP^+/RFP^- (unperturbed) progenitors 4 days after the electroporation. Of note, such mosaic analysis cannot be conclusively undertaken with classic integrative vectors active in episomal form since cells unlabeled at the time of the analysis may have transiently expressed the transgene earlier on. Surprisingly, in the iOn mosaics, we observed that unperturbed spinal progenitors generated significantly expanded numbers of progeny (+314%, $p < 0.005$) compared to a control situation (Figure 4C). This reveals that neural stem cells of the embryonic spinal cord can modulate their output and compensate in a homeostatic manner for a reduction of neurogenic activity of their neighbors.

Conditional control of transgene expression in somatic transfection experiments

Finally, iOn vectors are also of interest to assay and exploit transcriptional regulatory elements in a genomic configuration without the need to establish transgenic cell or animal lines. Cre/lox conditional labeling, widely applied in transgenic mice to target specific cell types, has so far been incompatible with somatic transfection approaches due to leakage from episomes. We devised a LiOn vector that reconstitutes an interrupted Cre recombinase gene upon PBase action (Figure 5A, left). Strikingly, this $^{LiOn}CMV\infty Cre$ plasmid presented no detectable leakiness in absence of transposase when transfected in cells expressing a *floxed* reporter transgene, but

efficiently triggered Cre expression and recombination upon PBase action (Figure 5A, right). We applied this LiOn Cre//ox switch to trace the fate of a subset of retinal progenitor cells (RPCs) defined by expression of the *Atoh7* transcription factor. At the population level, *Atoh7*⁺ RPCs are known to be biased towards the generation of ganglion cells for which they are essential (Wang et al., 2001), but also generate much larger numbers of photoreceptor, horizontal and amacrine cells (Brzezinski et al., 2012; Feng et al., 2010). How this is accounted for at the individual progenitor level is unclear. *Atoh7* regulatory sequences (Skowronska-Krawczyk et al., 2009), validated in separate experiments (Figure S6A), were incorporated in a LiOn Cre vector. Electroporation of this ^{LiOn}*Atoh7* ∞ Cre vector at early stages of chick retinogenesis (E1.5) drove expression in progenies restricted to the outer, amacrine and ganglion layers of the retina at E8, while bipolar cells located in the inner nuclear layer were not labeled (Figure 5B). This demonstrated tight control of Cre production by the *Atoh7* element during retinal development and confirmed that chicken *Atoh7*⁺ progenitors are biased towards specific fates. To determine the potency of individual *Atoh7*⁺ progenitors, we then combined the ^{LiOn}*Atoh7* ∞ Cre vector with stochastic multicolor lineage reporters encoded by Tol2 *Cytbow* and *Nucbow* transposons (Loulie et al., 2014) (Figure 5C). This approach marked groups of retinal cells organized as columns (Figure 5C, left), within which FP combinations further delineated clones whose cell type composition could be assigned based on layer position and morphology. Strikingly at E8, these *Atoh7*⁺-derived clones mostly comprised only a single ganglion cell, but frequently corresponded to pairs of nearby cells of a same type among photoreceptors and amacrine cells (Figure 5C, Figure S6B), thus indicating that individual *Atoh7*⁺ progenitors generate an important fraction of these two types of neurons (at least 43.6 $\pm$ 4.44%, and 36.4 $\pm$ 7.38%, respectively) through terminal symmetric division that result in identical fates.

DISCUSSION

We introduce a novel expression strategy that efficiently couples transgene activation to integration in the genome of host cells. iOn vectors rely on an unconventional arrangement of their elements to reconstitute a split transcriptional unit by DNA transposition. By canceling expression from non-integrated transgenes, the iOn switch solves two general problems associated with stable transfection using DNA vectors: the impossibility to identify transgenic cells directly after transfection due to episomes, and the adverse effects of episomal expression, including leakiness (Inoue et al., 2017), toxicity (Batard et al., 2001) and risks of genetic and epigenetic drift during selection (Liang and Zhang, 2013). In effect, iOn provides most of the advantages of retro- and lentiviral vectors without their cargo restriction, while offering the ease of use of DNA vectors and the capability of traceless excision of the piggyBac system (Fraser et al., 1996). Effective in all cell types and species tested here (human, mouse and chick), iOn can easily be adapted to different GOIs and promoters. For this purpose, maps of all plasmids built for this study, including a CAG-driven iOn vector equipped with a multicloning site, are presented in [Table S1](#). The dependence of the iOn switch on transposition makes it ideally suited to report stable transgenesis in varied contexts ([Figure 6](#)). In cultured cells, the iOn switch essentially eliminates the need to select integration events through multiple rounds of cell division in stable transfection assays, making them as simple and rapid as transient approaches. As demonstrated here ([Figures 1 and 2](#)), its applications include rapid drug-free identification and sorting of stable integrants expressing one or multiple transgenes. In many uses, short term transfection experiments with iOn vectors will provide information equivalent to stable cell lines concerning gene expression, regulation and function. We anticipate that this will simplify and accelerate genetic screening procedures based on

transposons (Kawakami et al., 2017). In vivo ([Figures 3 and 4](#)), transfection with iOn vectors can substitute for additive transgenesis in most if not all of its applications, with more accurate readout compared to previous somatic transgenesis approaches that can be polluted by expression from episomal vectors (Chen et al., 2014; Loulier et al., 2014). In particular, somatic transfection with iOn vectors provides a very efficient mean to track cell lineage in any organ accessible to electroporation, making them an ideal tool for studies in non-genetically tractable models. iOn also opens a simple route for functional mosaic analysis in vertebrate animals, normally requiring complex, time-consuming genetic manipulations (Pontes-Quero et al., 2017; Zong et al., 2005). In such experiments, the coupling of transgene integration and expression achieved with iOn ensures that marker expression in a cell reflects that of its entire lineage. This enabled us to create sustained mosaic perturbations of neurogenesis that reveal an intriguing homeostatic interplay among progenitors of the embryonic neural tube, capable of significantly influencing their output and reminiscent of that observed in some peripheral organs (Sharma et al., 2017; Stanger et al., 2007).

We also demonstrate that accurate cell-type specific Cre//ox recombination, an approach until now largely restricted to transgenic animal lines, can be achieved using electroporated iOn transgenes. This enabled us to trace in vivo the lineage of individual retinal progenitors defined by expression of the transcription factor Atoh7, revealing frequent terminal divisions that generate neurons of a same class, reminiscent of those observed with mouse cortical intermediate progenitors or *Drosophila* ganglion mother cells (Holguera and Desplan, 2018; Mihalas and Hevner, 2018). Such lineage pattern was particularly frequent for photoreceptors and amacrine cells, suggesting that progenitors restricted to generate these two cell types may exist in the chicken retina, in complement of those previously described for horizontal cells (Rompani and Cepko, 2008). Interestingly, terminal division patterns have also been observed

with mouse retinal progenitors defined by expression of another bHLH transcription factor (Hafler et al., 2012), albeit in that case frequently generating distinct types of neurons. We hypothesize that, as observed in the mammalian cortex (Hevner, 2019), symmetric-fated terminal divisions observed in the chick retina could participate in establishing an appropriate balance among its different classes of neurons.

In conclusion, iOn represents a versatile expression strategy to report DNA vector integration that opens new avenues to engineer cells in cultured systems and directly probe the fate and regulation of progenitor cells in vivo, in the nervous system as well as in other organs accessible to transfection.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank X. Morin and G. Orioux for scientific discussions, X. Nicol for the Kras sequence, J.-M. Matter for the *Atoh7* promoter, C. Marcelle for the NICD-expressing plasmid, and all members of the Livet lab for assistance. We thank L. Riancho and P.-H. Commère from the Saint-Antoine and Institut Pasteur cytometry facilities, A. Potey, C. Condroyer, S. Fouquet and Institut de la Vision core facilities. This work was funded by fellowships from the Uehara memorial and Naito foundations to T. K., the French ministry of research to F.M. and C.V., by the European Research Council (ERC-CoG n° 649117), and by Agence Nationale de la Recherche (contracts ANR-10-LABX-65, ANR-10-LABX-73-01 and ANR-15-CE13-0010-02). S.N. was funded by ATIP/Avenir and Association Française contre les Myopathies and A.R. by Genespoir.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.L., R.B. and T.K. conceived the iOn and LiOn switches. Initial experiments, R.B.; in vitro and chick spinal cord experiments, T.K.; retina experiments, F.M. and A.R.; cortical electroporation, T.K. and K.L.; iPS cell experiments, C.V. and S.N.; ES cell experiments, M.C.T. and S.V.-P.; cell culture and assistance with cloning, M.Le. and M.Lerat.; data analysis, T.K. and S.T.; manuscript redaction, T.K., S.T. and J.L. with input from all other authors.

DECLARATION OF INTERESTS

J.L., T.K., R.B., F.M., S.T., K.L., and M.Le. have filed a patent application related to the technology described in this manuscript.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Principle and validation of the iOn switch

(A) Principle of gene transfer with classic transposon (left) and iOn vectors (right). While the former allow GOI expression from episomes, that from iOn vector is conditioned by transposase action which reunites either the promoter (Prom) and GOI (transcriptional switch) or 5' and 3' portions of the GOI (translational “LiOn” switch). 5' and 3': transposon terminal repeats; pA: transcription terminators; TTAA: PB transposition footprint.

(B) Validation in HEK293 cells 3 days after transfection with a classic transposon ($^{PB}CAG::RFP$, left) and iOn (middle) or LiOn vectors (right). Top: epifluorescence images. Bottom: representative cytometry plots from cells transfected with PB/iOn vectors (red) vs. control cells (grey).

(C) Time-course analysis of RFP expression with episomal, classic transposon and iOn/LiOn vectors. Values and error bars represent the mean and s.e.m. of four replicates.

(D) Localization of a membrane-GFP (GFP-Kras) expressed from a classic transposon (left) or LiOn vector (right) 3 days after transfection in HEK293 cells.

(E) Clones established by sorting $^{iOn}CAG\infty RFP$ -transfected cells display the sequence expected for precise junction between promoter and GOI.

(F) Cells sorted based on $^{iOn}CAG\infty RFP$ expression yield a high proportion of RFP-positive clones compared to $^{PB}CAG::RFP$. Values and error bars represent the mean and s.e.m. of 3 separate experiments. 1078, 620 and 504 clones were assessed for $^{PB}CAG::RFP$ transfection without and with PBase and $^{iOn}CAG\infty RFP$, respectively ($p < 0.0001$ with χ^2 test).

See also [Figures S1 and S2](#).

Figure 2. Highly efficient multiplexed stable transfection with iOn vectors

(A) Sequence design of LiOn plasmids expressing three distinct FPs: mRFP1, EGFP or IRFP670.

(B) 3 days after co-transfection of the three *LiOn* *CAG∞FP* plasmids in HEK293 cells,

PBase-dependent expression is observed at similar levels for all FPs.

(C) Cell sorting of triple-labeled cells 2 days after transfection with the LiOn vectors yields a majority of clones co-expressing the three FPs, but only a minority with classic transposons (mean and s.e.m. of three separate experiments; 158, 104 and 87 clones were assessed for each condition). χ^2 test indicated significant difference between the three situations ($p < 0.0001$).

(D) Example of human iPS cell colony derived from cells co-transfected with the three-color *LiOn* *CAG∞FP* vectors, grown 45 days. All cells co-express the three FPs.

(E) Co-transfection of the three-color *LiOn* *CAG∞FP* vectors during human iPS cell neuronal differentiation yields varied FP combinations reflecting their clonal organization. Inset: *LiOn* *CAG∞RFP* expression in iPS cells immunostained with the neuronal marker Tuj1 (green).

See also [Figures S3](#).

Figure 3. Cell lineage tracing and conditional expression by additive somatic transgenesis with iOn

(A) Fate mapping in the mouse cerebral cortex. Left: co-electroporation of an *iOn* *CAG∞RFP* vector with PBase during neurogenesis (E12.5) yields streams of neurons migrating radially from the ventricular surface at E18.5, while an episome (*CAG::GFP*) only marks those born shortly after electroporation. No red labeling is observed in absence of PBase (inset). CP, cortical plate. Right: quantification of labeled cells confirms that iOn-labeled cells (RFP, RFP/GFP) occupy all cortical layers, while most cells bearing episomal labeling settle in intermediate layers.

(B) Longitudinal confocal views through E6 chick spinal cords electroporated at E2 with a classic transposon (top) or iOn vector (bottom) together with a control episome (*CAG::GFP*). The iOn vector homogenously labels radially-migrating cells while the classic transposon also strongly labels isolated neurons, similar to the episomal vector.

(C) Lineage tracing. ^{LiOn}*CAG∞GFP* electroporation with PBase in the embryonic mouse retina during neurogenesis (E13) labels all retinal layers at P6, while expression from an episome (*CAG::dsRed2*) only marks ganglion cells, born shortly after electroporation (ONL, INL, GCL: outer nuclear, inner nuclear and ganglion cell layers).

(D) Multicolor clonal tracking. Radial view of a portion of neural retina (top) and en-face view of the bipolar cell layer (BC, bottom), and retinal pigmented epithelium (RPE, bottom) from an E8 chicken embryo electroporated with triple-color LiOn vectors at E1.5. FP combinations identify clones.

See also [Figures S4](#).

Figure 4. Functional mosaic analysis by somatic transgenesis and summary of iOn applications

(A) Top, longitudinal confocal views through E5 chick spinal cords 3 days after electroporation of a LiOn vector expressing the Notch intracellular domain (^{LiOn}*CAG∞RFP-2A-NICD*), compared to transient NICD overexpression (*CAG::NICD-IRES-GFP*) or control (^{LiOn}*CAG∞GFP*). VZ: ventricular zone. Bottom, representative transverse section of E5 chick spinal cords electroporated with control (^{LiOn}*CAG∞GFP*, green) and NICD-expressing LiOn vectors (^{LiOn}*CAG∞RFP-2A-NICD*, red), immunostained for neuronal marker HuC/D (blue). Graph shows the percentage of HuC/D neurons among transfected cells with sustained vs. transient NICD expression (*CAG::NICD*) and control (^{LiOn}*CAG∞RFP*). Values and error bars show mean and s.e.m. from distinct embryos. A Kruskal-Wallis test indicated significant difference between

control and $^{LiOn}CAG\infty NICD$ ($p < 0.01$).

(B) Longitudinal view through an E6 spinal cord co-electroporated with control ($^{LiOn}CAG\infty GFP$, green) and NICD-expressing LiOn vectors ($^{LiOn}CAG\infty RFP-2A-NICD$, red). Green cells migrate radially while most red cells remain at the ventricular surface (dotted line).

(C) Non-cell autonomous effects of NICD expression. Left, E6 chick spinal cord transverse sections co-electroporated at E2 with a green control LiOn vector and a $^{LiOn}CAG\infty RFP$ (left) or $^{LiOn}CAG\infty RFP-2A-NICD$ plasmid (right). Middle, quantification of the ratio of GFP+/RFP- and RFP+ neurons and ventricular zone cells. Values and error bars represent mean and s.e.m. from distinct embryos ($n \geq 5$). A Mann-Whitney test indicates significant difference between control and $^{LiOn}CAG\infty NICD$ ($p < 0.005$). Right, summary. Increased neurogenic output from green cells in NICD-perturbed condition reveals a homeostatic interactions among progenitors.

See also [Figures S5](#).

Figure 5. Intersectional Cre/lox recombination and analysis of the output of genetically identified neural progenitors with iOn

(A) Cre/lox conditional expression. Left, LiOn vector in which full translation of Cre, initially blocked, is activated by PBase; inset: Cre-FLAG immunodetection after transfection of $^{LiOn}CMV\infty Cre$ and PBase in HEK-RY cells stably expressing a CAG::RY reporter switching from RFP to YFP expression under Cre action. Right, strict PBase-dependent recombination is observed 3 days after $^{LiOn}CMV\infty Cre$ transfection in HEK-RY cells (CAG::mTurquoise2: transfection control). Graph shows mean and s.e.m. of replicates from 3 distinct experiments.

(B) Radial view through an E8 chick retina co-electroporated at E1.5 with a Cre-expressing LiOn vector driven by *Atoh7* regulatory sequences ($^{LiOn}Atoh7\infty Cre$) and a $^{Tol2}CAG::RY$ transposon. Restricted recombination in the retinal ganglion (RGL) and outer nuclear (ONL) layers is

observed. INL: inner nuclear layer.

(C) Multicolor clonal analysis of Atoh7⁺ progenitor output. Optical sections and radial views of an E8 chick retina electroporated at E1.5 with *^{LiOn}Atoh7 ∞ Cre* along with genome-integrating multicolor reporters (*^{Tol2}CAG::Nucbow* and *^{Tol2}CAG::Cytbow*). Left: 3D view of a retinal column containing labeled neurons. Middle: Four retinal columns in which clonal pairs or sister cells of a same type can be identified based on expression of specific color marker combinations (arrowheads). Some cells not included in same-type pairs are also observed (asterisks). Column 1 corresponds to that shown in 3D in left panel. Right: quantification of the number of cells belonging to 1, 2, 3 or 4-cell clones within labeled photoreceptor (PR), horizontal (HC), amacrine (AC) and ganglion cells (RGC) in individual columns confirms a bias of Atoh7⁺ retinal progenitors that generate PRs and ACs towards terminal symmetric division patterns. Graph shows mean and s.e.m. of 14 columns reconstructed from 2 distinct embryos.

See also [Figures S6](#).

Figure 6. Summary of iOn potential applications

iOn vectors enable fast and reliable analysis of genome integrative events shortly after transfection both in vitro (top) and in vivo (bottom).

STAR METHODS

CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Jean Livet (jean.livet@inserm.fr).

EXPERIMENTAL MODELS AND SUBJECT DETAILS

Cultured cells

Human embryonic kidney (HEK293T), HeLa and 3T3 cells were cultured in 10% fetal bovine serum in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM, Life technologies).

Human induced pluripotent stem cells (iPS line WTSli008-A, EBiSC, UK) were cultured in E8 medium (Life technologies) on Geltrex coating (Life technologies) and passaged with EDTA.

Mouse ES cells (C57BL/6 x 129/Sv, line KH2) (Beard et al., 2006) were cultured on primary embryonic fibroblasts feeder cells.

Mice

Swiss strain females (Janvier labs) were housed in a 12 hr light/12 hr dark cycle with free access to food, and animal procedures were carried out in accordance with institutional guidelines.

Animal protocols were approved by the Charles Darwin animal experimentation ethical board (CEEACD/N°5). The date of the vaginal plug was recorded as embryonic day (E) 0.5 and the date of birth as postnatal day (P) 0.

Chicken embryos

JA57 chicken fertilized eggs were provided by EARL Morizeau (8 rue du Moulin, 28190 Dangers, France) and incubated at 38 °C for the appropriate time in a FIEM incubator (Italy).

METHOD DETAILS

DNA constructs. A schematized map of the plasmids designed for this study can be found in **Table S1**, along with restriction sites available to exchange GOIs and promoters. All iOn and control piggyBac vectors were assembled in a pUC57-mini plasmid backbone (Genscript Inc) using a combination of DNA synthesis (Genscript Inc), Gibson assembly (NEB) and standard restriction and ligation-based cloning. PCR for Gibson assembly was performed using CloneAmp HiFi PCR Premix (Clontech) and Q5 high-fidelity DNA polymerase (NEB). We used minimal piggyBac 5' and 3' TRs (Meir et al., 2011), with an additional 3 bp from the wild type transposon in the 3' TR as in Loulier et al., 2014. We drove GOI expression with the strong eukaryotic CAG (Niwa et al., 1991) and CMV promoters as well as a 2145 bp fragment regulating expression of the chicken *Atoh7* gene (Skowronska-Krawczyk et al., 2009). GOIs were followed by a bovine growth hormone transcriptional terminator (pA1). In the final iOn vector design, a rabbit beta globin transcription terminator (pA2) was added upstream of the PB 3'TR to prevent cryptic episomal transcription. FPs used as GOI included RFP (mRFP1, Campbell et al., 2002), GFP (EGFP, Clontech) and IRFP (IRFP670, Shcherbakova and Verkhusha, 2013). In LiOn vectors, FP ORFs were split near the N terminus (Nt) in two opposite-oriented fragments that become reunited by transposition with incorporation of the TTAA footprint as indicated in [Figure 2A](#). In the ^{LiOn}CMV ∞ Cre vector, the Cre recombinase ORF was separated in Nt and Ct portions as in (Jullien, 2003), with incorporation of the TTAA footprint at a silent position (Leu104) and addition of a FLAG epitope (DYKDDDDK) at the Ct of the protein. To limit expression of the Cre Nt fragment prior to transposition, its coding sequence was positioned in frame (through the PB 5' TR) with a PEST degron (Li et al., 1998) followed by a translational stop. The membrane-restricted GFP was generated by adding a short Kras tethering sequence (Averaimo et al., 2016) at the Ct end of EGFP using annealed oligonucleotides. To assay Cre activity, we

designed a *floxed* reporter ($^{Tol2}CAG::loxP-mCherry-loxP-EYFP$, abbreviated as $^{Tol2}CAG::RY$) in which expression switches from mCherry to EYFP upon recombination, framed with *Tol2* transposition endfeet to enable genomic integration. The $^{LiOn}CAG\infty RFP-2A-NICD$ vector was assembled by introducing a P2A cleavage sequence between the RFP and NICD ORFs to enable their co-expression. As non-integrative control vectors, we used a $CAG::NICD-IRES-GFP$ plasmid (Rios et al., 2011). Other plasmids used in this study included *CMV*-driven vectors expressing Cre, mTurquoise2 (Goedhart et al., 2012) and IRFP670 (Shcherbakova and Verkhusha, 2013) as well as *CAG*-driven vectors producing EGFP, mCerulean, dsRed2 (Clontech), the *Tol2* transposase (Kawakami and Noda, 2004) and an optimized piggyBac transposase (hyPBase (Yusa et al., 2011)).

HEK293, HeLa and NIH 3T3 cell culture experiments. *iOn* and piggyBac plasmids were transfected in human HEK293, HeLa or mouse NIH 3T3 cells using cationic lipids. Except when otherwise noted, 1×10^5 cells/well were plated in a 24-well dish and transfected at day 1 with 100 ng *iOn* vector with or without 20 ng of PBase-expressing plasmid ($CAG::hyPBase$) using 0.7 μ l of Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen). For triple-color labeling experiments, we used 100 ng/well of each $^{LiOn}CAG\infty FP$ plasmid and 60 ng of PBase vector. To validate the $^{LiOn}CMV\infty Cre$ transgene, 50 ng of the corresponding plasmid was co-transfected with 10 ng of PBase vector in a HEK293 cell line stably expressing the $^{Tol2}CAG::RY$ reporter. This line was established by successive use of *Tol2* transposition, drug selection with G418 (300 μ g/ml, Sigma) and picking of RFP-positive clones. In some experiments, 50 ng of non-integrative plasmid expressing an FP marker distinct from the *iOn* vector ($CMV::mTurquoise2$, $CMV::IRFP$ or $CAG::GFP$) were applied as transfection control. For FACS analysis, transfections were performed in 6-cm dishes with scaled up concentrations. HEK293 cell viability after *iOn*

plasmids transfection was assessed by dye exclusion with Trypan blue solution (0.4%, Sigma). FP expression was either assayed by flow cytometry, epifluorescence or confocal microscopy, or an Arrayscan high-content system (Thermo Fisher Scientific) (see below). For fixed observations, cells grown on 13 mm coverslips coated with collagen (50 µg/ml, Sigma) were immersed in 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffer saline (PBS) (Antigenfix, Diapath), rinsed in PBS and mounted in glycerol-based Vectashield mounting medium supplemented with DAPI (Vector labs). All images are representative of at least 3 independent experiments.

FACS analysis and selection of HEK293 clones. For FACS analysis, HEK293 cells grown on 6-cm dishes were dissociated three days after transfection, stained with DAPI and analyzed on a MoFlo Astrios cell sorter (Beckman Coulter) using the following laser lines: 405 nm (DAPI), 488 nm (GFP), 561 nm (RFP), 640 nm (IRFP). 10000 cells were analyzed for each condition; non-fluorescent controls were prepared from mock-transfected cells stained with DAPI. For clonal experiments, HEK293 cells were sorted as single cells two days after transfection. Selection windows were chosen to include most of the FP-positive population and exclude negative cells. For 3-color cell sorting, we first selected live dissociated cells and subsequently selected RFP+, IRFP+ cells within the GFP+ population. Cells were then plated as single cells in 96-well plates and grown for 7-10 days in 200 µL of 10% FBS/DMEM medium mixed 1:1 with filtrated HEK293-conditioned medium. FP expression was assayed by epifluorescence microscopy or Arrayscan High-Content imaging (see below). Some positive clones were expanded in larger dishes for sequencing. To this aim, genomic DNA was isolated from a confluent 3.5- or 10-cm dish with the Nucleospin Tissue Kit (Macherey-Nagel). The rearranged region between the promoter and GOIs (500-600 bp) was amplified using CloneAmp HiFi PCR premix (Clontech) followed by Sanger sequencing (Genewiz, UK).

Human iPS cell transfection and differentiation. For iOn labeling of differentiating iPS cells, colonies were dissociated with Accutase (Life Technologies) and replated in 96-well plates coated with poly-L-ornithine (20 µg/ml, Sigma P4957) and laminin (3 µg/ml, Sigma 23017-015). On day 2, cells were transfected with Dreamfect (OZBioscience) according to the manufacturer's instructions. Cells were then differentiated as spinal motor neurons, fixed on day 14 with 4% PFA and stained with Tuj1 antibody as previously done (Maury et al., 2015). For iPS line generation, WTSli008-A iPS cells were plated and transfected with Lipofectamine Stem Cell reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Transfected cells were isolated by manual or EDTA passages, and homogeneous colonies were obtained 18 days after transfection (4 passages).

Mouse ES cell transfection and clone selection. KH2 ES cells were transfected with *^{LiOn}CAG∞GFP-Kras* and *CAG::hyPBase* plasmids (4 to 1 weight ratio) using Lipofectamine 2000 reagent. 48 hrs after transfection, GFP-positives cells (1.5%) were sorted using an Astrios MoFlo EQ cell sorter and plated at low density (10³ cells/ 10-cm dish) on feeder cells. After eight days, GFP-positives clones were picked under a fluorescent stereomicroscope (Zeiss Discovery V20).

Mouse and chicken embryonic electroporation. *In utero* and *in ovo* electroporation in mouse and chicken embryos were performed as previously described (Loulie et al., 2014; Rebsam et al., 2009). A DNA mix containing 1-1.2 µg/µl of iOn vector, 0.5-1.2 µg/µl of non-integrative control plasmid and 0.2 µg/µl of *CAG::hyPBase* plasmid supplemented with fast green dye was injected with a glass capillary pipette into one lateral ventricle or eye of E12.5 or E14.5 mice, or the optic cup or central spinal cord canal of E1.5 or E2 chick embryos, respectively. For multicolor labeling, the mix contained 1 µg/µl of each *^{LiOn}CAG∞FP* vector and 0.6 µg/µl of PBase vector. Embryos were left to develop until sacrifice. Tissues were fixed in 4% PFA. Postnatal

mouse brains were sectioned at 200- μ m thickness with a vibrating microtome (VT1000, Leica), while mouse retinas, chick E6 spinal cords and E6-E8 retinas were flat-mounted on glass slides. Samples were mounted in Vectashield medium and imaged with epifluorescence or confocal fluorescence microscopy.

Immunostaining. For cell cultures: HEK293 cells plated on glass coverslips or iPS cells were fixed with 4% PFA, followed by washing in PBS and a 20-60 min blocking step at room temperature. Blocking solution for HEK293 and iPS cells respectively contained 10% normal goat serum (Sigma) or fetal bovine serum (Eurobio) and 0.5% or 0.2% Triton X-100 (Sigma). Cells were then incubated overnight at 4°C with primary antibody diluted in blocking solution (rabbit anti-FLAG, Sigma, 1:250 or mouse anti-Tuj1, Biolegend 1:500). After washing in PBS and incubation with secondary antibody (Alexa 647 anti-goat IgG 1:500, or Alexa 488 anti-goat IgG, 1:1000, Invitrogen) for 1 hr at room temperature, cells were washed again prior to mounting in Vectashield medium. For chicken spinal cords sections: embryos fixed for 1 hr in 4% PFA were equilibrated in 30% sucrose and embedded in TissueTek (Sakura), frozen on dry ice and stored at -80°C prior to cryostat sectioning (Microm HM560, 14 μ m sections). After equilibration at room temperature, sections were washed in PBS before blocking in PBS-0.1% Triton-10% normal donkey serum (NDS) and overnight incubation with primary antibody (1:50, anti-HuC/D, Molecular Probes) in PBS-0.1% Triton-1% NDS. Following PBS washes, slides were incubated 1 hr with secondary antibody (Alexa 647 donkey anti-mouse, Invitrogen, 1:500) in the above buffer, washed and mounted with Vectashield medium.

Fluorescence imaging and image analysis. Epifluorescence images were collected with a 10 x 0.6 NA or 20 x 0.7 NA objective on a Leica DM6000 microscope equipped with a VT1000 camera and separate filter cubes for GFP, RFP and IRFP. Confocal image stacks were acquired with 20 x

0.8 NA oil and 40 x 1.25 NA silicone objectives on an Olympus FV1000 microscope, using 440, 488, 515, 560, and 633 nm laser lines to excite CFP, GFP, YFP, RFP and IRFP/Alexa 647, respectively. For analysis with Arrayscan (Thermo Fisher Scientific), cells grown in 24- or 96-well plates were fixed 15 min with 4% PFA and stained with 300 nM DAPI prior imaging with the following laser lines: 386 nm (DAPI), 485 nm (GFP), 570 nm (RFP), and 650 nm (IRFP). Images of live ES cell clones were acquired using an EVOS FL auto inverted microscope (Life Technologies). Image analysis was performed with Fiji (Schindelin et al., 2012) and Imaris. Levels were uniformly adjusted across images with Adobe Photoshop.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis. The number of samples analyzed is indicated in the figure legends.

Statistical analyses were performed using R or GraphPad Prism software. Significance was assessed using χ^2 (Figure 1F, 2C, S2C and S2E) and Kruskal-Wallis (one-way ANOVA on ranks) tests (Figure 4A and S6B), and non-parametric Mann-Whitney U test (Figure 4C). Data represent mean $\pm$ SEM, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

FACS analysis

10000 cells were analyzed for each condition; non-fluorescent controls were prepared from mock-transfected cells stained with DAPI.

DATA AVAILABILITY

Detailed maps and sequences of all plasmids developed for this study are available upon request. iOn vectors will be deposited at the Addgene public plasmid repository prior to acceptance of the manuscript.

SUPPLEMENTARY INFORMATION TITLES AND LEGENDS

Figure S1. Design and test of transgene configurations for transposition-dependent GOI expression, related to Figure 1

(A, B) Top: two types of iOn transgene configurations (type 1, A and type 2, B) are possible depending on the positioning and relative orientation of the promoter and GOI. Bottom: test of the two configurations using CAG as promoter and RFP as GOI. 3 days after transfection in HEK293 cells, PBase-dependent expression is observed with both transgenes, with only weak leakiness in absence of PBase (arrowheads).

(C, D) Top: two alternative designs of iOn switch (option A, C and option B, D) are possible depending on the positioning of the 5' and 3' transposon TRs. Schemes present the two alternatives on a type 1 configuration. A transcription terminator (pA2) is also positioned upstream of the GOI to reduce transcriptional leakiness prior to transposition. Bottom: test of the two configurations in HEK293 cells. PBase-dependent expression is observed with both transgenes, with reduced background expression compared to (A). The configuration presenting highest signal to background ratio shown in C (type 1Ap, hereafter denominated $iOnCAG\infty RFP$), was selected for subsequent experiments.

Figure S2. iOn vector expression in cultured cells, related to Figure 1

(A) Time-course of $iOnCAG\infty RFP$ expression by epifluorescence imaging 1, 2, and 3 days after transfection in HEK293 cells in presence of PBase.

(B) Comparison of expression levels from individual cells transfected with episomal ($CAG::RFP$), classic transposon ($iOnCAG\infty RFP + PBase$) and iOn vectors ($iOnCAG\infty RFP + PBase$ and $LiOnCAG\infty RFP + PBase$). Measures acquired 3 days after transfection on a high-content imaging

platform.

(C) Top: mouse ES cell clones grown for 8 and 18 days after sorting based on expression of a LiOn vector encoding a membrane-bound GFP ($^{LiOn}CAG\infty GFP-Kras$ transfected 2 days prior to sorting). Left: low magnification picture showing GFP-positive and negative ES cell clones. Right: higher magnification of a positive clone showing membrane localization of GFP in all cells of the clone. Bottom: Compared to a classic transposon vector ($^{PB}CAG::GFP-Kras$), cells sorted based on $^{LiOn}CAG\infty GFP-Kras$ expression result in a higher yield of GFP-positive clones. Values and error bars represent the mean and s.e.m of four distinct replicates (dots). A χ^2 test indicated a significant difference between the two situations ($p < 0.001$).

(D) Assessment of cell viability by Trypan blue staining 2 days after HEK293 cells transfection with iOn and control vectors. >95% survival is observed in all conditions.

(E) Survival at 10 days of clones established from single RFP-positive cell sorted after transfection with $^{PB}CAG::RFP$ and $^{iOn}CAG\infty RFP$ in presence of PBase (measurements from the experiment presented in Fig. 1F). A χ^2 test indicated non-significant difference between the two situations.

(F) PBase-dependent expression from a $^{iOn}CAG\infty RFP$ vector in HeLa and NIH 3T3 cells 3 days after transfection in presence and absence of PBase (top: epifluorescence imaging, bottom: FACS analysis).

Figure S3. Multiplex transgenesis with iOn vectors, related to Figure 2

(A) Validation of three $^{LiOn}CAG\infty FP$ vectors respectively expressing RFP (top), EGFP (middle) and IRFP (bottom) in a PBase-dependent manner. HEK293 cells were imaged 3 days after transfection. Signal from LiOn vectors is encoded in red, while that of episomal vectors used as transfection control is shown in green (blue: DAPI staining).

(B) Analysis and sorting of triple-labeled cells co-expressing the three $^{LiOn}CAG\infty RFP$ (GFP/RFP/IRFP) vectors. HEK293 cells were analyzed 2 days after transfection. Top: FACS analysis of single channels (colored plots) from triple-transfected cells compared to cells transfected with a non-fluorescent plasmid (grey). Bottom: parameters for single cell sorting. Within the GFP positive population (47.3%, bottom left), RFP/IRFP double-positive cells (38.4%, bottom right) were selected and plated as single cells.

(C) Examples of clones co-expressing the three $^{LiOn}CAG\infty FP$ vectors.

Figure S4. Application of iOn vectors in the vertebrate central nervous system, related to Figure 3

(A) At P10, astrocytes are also labeled with $^{iOn}CAG\infty RFP$ but not with a $CAG::GFP$ plasmid electroporated at E13.5, demonstrating long term integration and expression of the iOn vector in neural progenitors and in their neuronal and glial descent (insets show enlarged view of boxed area, arrowheads point to protoplasmic astrocytes).

(B) Validation of the iOn switch in vivo in the embryonic chicken spinal cord at E6. An episomal plasmid ($CAG::Cerulean$, green) is found in isolated neurons born shortly after electroporation, while the iOn vector (red) labels radial clones of neurons migrating from the ventricular surface with the presence of PBase (top), but not the absence of PBase (bottom).

(C) Time-course expression of $^{iOn}CAG\infty RFP$ with PBase by epifluorescence imaging 1, 2, and 3 days after electroporation in the embryonic chick spinal cord (whole mount views).

(D) Top: Combinatorial expression of 3 FPs can generate several distinct color labels. Bottom: Expression of these labels in neurogenic progenitors can be used to resolve individual clones.

(E) Wide-field epifluorescence (top) and confocal views (bottom) from an E6 chick spinal cord electroporated at E2 with triple color LiOn mix (GFP/RFP/IRFP) and PBase. FP combinations

identify and resolve different clones of neural cells migrating radially from the ventricular surface (arrowheads).

Figure S5. Long term perturbation of neural development by somatic transgenesis with iOn vectors, related to Figure 4

Comparison of the effects obtained in neural progenitors by expressing the Notch intracellular domain (NICD) from LiOn (left) and episomal vectors (middle) relative to a control situation (right). Panels show longitudinal views through whole-mount embryonic chicken spinal cord preparations 3 days after electroporation, oriented such that the ventricular surface lines the bottom of the image. NICD-expressing plasmids were co-electroporated with non-perturbing plasmids as control. Permanent expression of NICD with LiOn ($^{LiOn}CAG\infty RFP-2A-NICD$, left) leads to an almost complete blockade of neuronal differentiation and radial migration (compare RFP signal with control $^{LiOn}CAG\infty GFP$ expression). Transient NICD expression ($CAG::NICD-IRES-GFP$, middle) only results in partial effects compared with control ($^{LiOn}CAG\infty GFP/RFP$, right).

Figure S6. Validation of Atoh7-driven expression with the LiOn strategy and quantification of the composition of Atoh7-derived clones, related to Figure 5

(A) View across the retina of an E6 chicken embryo, during the peak of RGC production and before the start of PR genesis, 5 days after electroporation of a $^{LiOn}Atoh7\infty RFP$ vector. Transgene expression is most prominent in the RGC (RGL) and outer nuclear (ONL) layers, while in intermediate layers only a fraction of labeled cells are visible, likely migrating towards the RGL at this intermediate stage (arrowheads). (B) Quantification of the percentage of Atoh7-derived retinal neurons belonging to 1, 2, 3 or 4-cell clones within labeled photoreceptor (PR), horizontal (HC), amacrine (AC) and ganglion cells (RGC) found in individual columns

examined in Figure 5C. Graph shows mean and s.e.m. of 14 columns reconstructed from 2 distinct embryos. A Kruskal-Wallis test indicated significant difference between RGCs vs. PRs and HCs clonal category distributions ($p < 0.001$).

Table S1. List and schematic map of the transgenes designed for this study

All constructs were assembled in a pUC57-mini plasmid backbone. Restriction sites available to exchange GOIs and promoters are indicated. An iOn vector equipped with a multi-cloning site was also designed to facilitate cloning of varied GOIs. pA1, pA2, pA3: bGH, rabbit beta-globin and SV40 transcription terminators. P: PEST degradation signal.

REFERENCES

- Akhtar, W., Jong, J. De, Pindyurin, A. V, Pagie, L., Meuleman, W., Ridder, J. De, Berns, A., Wessels, L.F.A., Lohuizen, M. Van, and Steensel, B. Van (2013). Resource Chromatin Position Effects Assayed by Thousands of Reporters Integrated in Parallel. *Cell* 154, 914–927.
- 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, 1–12.
- Batard, P., Jordan, M., and Wurm, F. (2001). Transfer of high copy number plasmid into mammalian cells by calcium phosphate transfection. *Gene* 270, 61–68.
- Beard, C., Hochedlinger, K., Plath, K., Wutz, A., and Jaenisch, R. (2006). Efficient method to generate single-copy transgenic mice by site-specific integration in embryonic stem cells. *Genesis* 44, 23–28.
- Black, J.B., Perez-Pinera, P., and Gersbach, C.A. (2017). Mammalian Synthetic Biology: Engineering Biological Systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 19, 249–277.
- Brzezinski, J.A., Prasov, L., and Glaser, T. (2012). Math5 defines the ganglion cell competence state in a subpopulation of retinal progenitor cells exiting the cell cycle. *Dev. Biol.* 365, 395–413.
- Campbell, R.E., Tour, O., Palmer, A.E., Steinbach, P.A., Baird, G.S., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y. (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 7877–7882.
- Chen, F., and Loturco, J. (2012). A method for stable transgenesis of radial glia lineage in rat neocortex by piggyBac mediated transposition. *J Neurosci Methods* 207, 172–180.
- Chen, F., Maher, B.J., and LoTurco, J.J. (2014). piggyBac transposon-mediated cellular transgenesis in mammalian forebrain by in utero electroporation. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2014, 741–749.
- Ding, S., Wu, X., Li, G., Han, M., Zhuang, Y., and Xu, T. (2005). Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell* 122, 473–483.
- Doench, J.G. (2018). Am I ready for CRISPR ? A user’s guide to genetic screens. *Nat. Rev. Genet.* 19, 67–80.
- Ebrahimkhani, M.R., and Ebisuya, M. (2019). Synthetic developmental biology: build and control multicellular systems. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 52, 9–15.

- Fekete, D.M., Perez-Miguelsanz, J., Ryder, E.F., and Cepko, C.L. (1994). Clonal analysis in the chicken retina reveals tangential dispersion of clonally related cells. *Dev Biol* 166, 666–682.
- Feng, L., Xie, Z., Ding, Q., Xie, X., Libby, R.T., and Gan, L. (2010). MATH5 controls the acquisition of multiple retinal cell fates. *Mol. Brain* 3, 1–16.
- Fraser, M.J., Ciszczon, T., Elick, T., and Bauser, C. (1996). Precise excision of TTAA-specific lepidopteran transposons piggyBac (IFP2) and tagalong (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from two species of Lepidoptera. *Insect Mol. Biol.* 5, 141–151.
- Goedhart, J., von Stetten, D., Noirclerc-Savoye, M., Lelimosin, M., Joosen, L., Hink, M.A., van Weeren, L., Gadella, T.W.J., and Royant, A. (2012). Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat. Commun.* 3, 751.
- Hafler, B.P., Surzenko, N., Beier, K.T., Punzo, C., Trimarchi, J.M., Kong, J.H., and Cepko, C.L. (2012). Transcription factor Olig2 defines subpopulations of retinal progenitor cells biased toward specific cell fates. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 7882–7887.
- Hammerle, B., Ulin, E., Guimera, J., Becker, W., Guillemot, F., and Tejedor, F.J. (2011). Transient expression of Mnb/Dyrk1a couples cell cycle exit and differentiation of neuronal precursors by inducing p27KIP1 expression and suppressing NOTCH signaling. *Development* 138, 2543–2554.
- Hevner, R.F. (2019). Intermediate progenitors and Tbr2 in cortical development. *J. Anat.*
- Hirsch, T., Rothoeft, T., Teig, N., Bauer, J.W., Pellegrini, G., De Rosa, L., Scaglione, D., Reichelt, J., Klausegger, A., Kneisz, D., et al. (2017). Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature* 551, 327–332.
- Holguera, I., and Desplan, C. (2018). Neuronal specification in space and time. *Science* 362, 176–180.
- Inoue, F., Kircher, M., Martin, B., Cooper, G.M., Witten, D.M., Mcmanus, M.T., Ahituv, N., and Shendure, J. (2017). A systematic comparison reveals substantial differences in chromosomal versus episomal encoding of enhancer activity. *Genome Res.* 27, 38–52.
- Ivics, Z., Li, M.A., Mátés, L., Boeke, J.D., Nagy, A., Bradley, A., and Izsvák, Z. (2009). Transposon-mediated genome manipulation in vertebrates. *Nat. Methods* 6, 415–422.
- Jullien, N. (2003). Regulation of Cre recombinase by ligand-induced complementation of inactive fragments. *Nucleic Acids Res.* 31, e131.
- Kawakami, K., and Noda, T. (2004). Transposition of the Tol2 Element, an Ac-Like Element from the Japanese Medaka Fish *Oryzias latipes*, in Mouse Embryonic Stem Cells. *Genetics* 166, 895–

899.

Kawakami, K., Largaespada, D.A., and Ivics, Z. (2017). Transposons As Tools for Functional Genomics in Vertebrate Models. *Trends Genet.* 33, 784–801.

Kondo, T., Imamura, K., Funayama, M., Tsukita, K., Miyake, M., Ohta, A., Woltjen, K., Nakagawa, M., Asada, T., Arai, T., et al. (2017). iPSC-Based Compound Screening and In Vitro Trials Identify a Synergistic Anti-amyloid beta Combination for Alzheimer's Disease. *Cell Rep.* 21, 2304–2312.

Leber, S.M., and Sanes, J.R. (1995). Migratory paths of neurons and glia in the embryonic chick spinal cord. *J Neurosci* 15, 1236–1248.

Li, M.A., Turner, D.J., Ning, Z., Yusa, K., Liang, Q., Eckert, S., Rad, L., Fitzgerald, T.W., Craig, N.L., and Bradley, A. (2011). Mobilization of giant piggyBac transposons in the mouse genome. *Nucleic Acids Res.* 39, e148.

Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Duong, T., Fan, C., Huang, C., Kain, S.R., and Jiang, X. (1998). Generation of Destabilized Green Fluorescent Protein as a Transcription Reporter Generation of Destabilized Green Fluorescent Protein as a Transcription Reporter. *J. Biol. Chem.* 273, 34970–34975.

Liang, G., and Zhang, Y. (2013). Perspective Genetic and Epigenetic Variations in iPSCs : Potential Causes and Implications for Application. *Stem Cell* 13, 149–159.

Loulier, K., Barry, R., Mahou, P., Le Franc, Y., Supatto, W., Matho, K.S.S.K.S.K.S.S., Ieng, S., Fouquet, S., Dupin, E., Benosman, R., et al. (2014). Multiplex Cell and Lineage Tracking with Combinatorial Labels. *Neuron* 81, 505–520.

Lu, I., Chen, C., Tung, C., Chen, H., Pan, J., Chang, C., Cheng, J., Chen, Y., Wang, C., Huang, C., et al. (2018). Identification of genes associated with cortical malformation using a transposon-mediated somatic mutagenesis screen in mice. *Nat. Commun.* 9, 2498.

Maury, Y., Côme, J., Piskorowski, R.A., Salah-Mohellibi, N., Chevaleyre, V., Peschanski, M., Martinat, C., and Nedelec, S. (2015). Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. *Nat. Biotechnol.* 33, 89–96.

Meir, Y.J.J., Weirauch, M.T., Yang, H.S., Chung, P.C., Yu, R.K., and Wu, S.C.Y. (2011). Genome-wide target profiling of piggyBac and Tol2 in HEK 293: Pros and cons for gene discovery and gene therapy. *BMC Biotechnol.* 11, 28.

Merkle, F.T., Ghosh, S., Kamitaki, N., and Mitchell, J. (2017). Human pluripotent stem cells recurrently acquire and expand dominant negative P53 mutations. *Nature* 545, 229–233.

- Mihalas, A.B., and Hevner, R.F. (2018). Clonal analysis reveals laminar fate multipotency and daughter cell apoptosis of mouse cortical intermediate progenitors. *Development* 145.
- Mikuni, T., Nishiyama, J., Sun, Y., Kamasawa, N., and Yasuda, R. (2016). High-Throughput, High-Resolution Mapping of Protein Localization in Mammalian Brain by In Vivo Genome Editing. *Cell* 165, 1803–1817.
- Nehme, R., Zuccaro, E., Ghosh, S.D., Zhanyan, F., Li, C., Sherwood, J.L., Pietilainen, O., Feng, G., and Eggan, K. (2018). Combining NGN2 Programming with Developmental Patterning Generates Human Excitatory Neurons with NMDAR-Mediated Synaptic Transmission Resource Combining NGN2 Programming with Developmental Patterning Generates Human Excitatory Neurons with NMDAR-Mediated. *CellReports* 23, 2509–2523.
- Nishiyama, J., Mikuni, T., and Yasuda, R. (2017). Virus-Mediated Genome Editing via Homology-Directed Repair in Mitotic and Postmitotic Cells in Mammalian Brain. *Neuron* 96, 755-768.e5.
- Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193–199.
- Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Dammerman, R.S., and Kriegstein, A.R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409, 714–720.
- Parr-Brownlie, L.C., Bosch-Bouju, C., Schoderboeck, L., Sizemore, R.J., Abraham, W.C., and Hughes, S.M. (2015). Lentiviral vectors as tools to understand central nervous system biology in mammalian model organisms. *Front. Mol. Neurosci.* 8, 14.
- Pierfelice, T., Alberi, L., and Gaiano, N. (2011). Notch in the vertebrate nervous system: an old dog with new tricks. *Neuron* 69, 840–855.
- Pontes-Quero, S., Heredia, L., Casquero-García, V., Fernández-Chacón, M., Luo, W., Hermoso, A., Bansal, M., Garcia-Gonzalez, I., Sanchez-Muñoz, M.S., Perea, J.R., et al. (2017). Dual ifgMosaic: A Versatile Method for Multispectral and Combinatorial Mosaic Gene-Function Analysis. *Cell* 170, 800--814.e18.
- Price, J., Turner, D., and Cepko, C. (1987). Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 156–160.
- Rebsam, A., Petros, T.J., and Mason, C.A. (2009). Switching retinogeniculate axon laterality leads to normal targeting but abnormal eye-specific segregation that is activity dependent. *J. Neurosci.* 29, 14855–14863.
- Rios, A.C., Serralbo, O., Salgado, D., and Marcelle, C. (2011). Neural crest regulates myogenesis

through the transient activation of NOTCH. *Nature* 473, 532–535.

Rompani, S.B., and Cepko, C.L. (2008). Retinal progenitor cells can produce restricted subsets of horizontal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 192–197.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682.

Sharma, B., Ho, L., Ford, G.H., Quertermous, T., Reversade, B., Red-horse, K., Sharma, B., Ho, L., Ford, G.H., Chen, H.I., et al. (2017). Alternative Progenitor Cells Compensate to Rebuild the Coronary Vasculature in Elabela - and Apj - Deficient Hearts. *Dev. Cell* 42, 655–666.

Shcherbakova, D.M., and Verkhusha, V. V. (2013). Near-infrared fluorescent proteins for multicolor in vivo imaging. *Nat. Methods* 10, 751–754.

Skowronska-Krawczyk, D., Chiodini, F., Ebeling, M., Alliod, C., Kundzewicz, A., Castro, D., Ballivet, M., Guillemot, F., Matter-Sadzinski, L., and Matter, J.-M. (2009). Conserved regulatory sequences in *Atoh7* mediate non-conserved regulatory responses in retina ontogenesis. *Development* 136, 3767–3777.

Stanger, B.Z., Tanaka, A.J., and Melton, D.A. (2007). Organ size is limited by the number of embryonic progenitor cells in the pancreas but not the liver. *Nature* 445, 886–891.

Suzuki, K., Tsunekawa, Y., Hernandez-Benitez, R., Wu, J., Zhu, J., Kim, E.J., Hatanaka, F., Yamamoto, M., Araoka, T., Li, Z., et al. (2016). In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature* 540, 144–149.

Tewary, M., Shakiba, N., and Zandstra, P.W. (2018). Stem cell bioengineering: building from stem cell biology. *Nat. Rev. Genet.* 19, 595–614.

Wang, S.W., Kim, B.S., Ding, K., Wang, H., Sun, D., Johnson, R.L., Klein, W.H., and Gan, L. (2001). Requirement for *math5* in the development of retinal ganglion cells. *Genes Dev* 15, 24–29.

Yang, N., Chanda, S., Marro, S., Ng, Y.-H.Y.-H., Janas, J.J.A., Haag, D., Ang, C.E., Tang, Y., Flores, Q., Mall, M., et al. (2017). Generation of pure GABAergic neurons by transcription factor programming. *Nat. Methods* 14, 621–628.

Yu, Y.C., He, S., Chen, S., Fu, Y., Brown, K.N., Yao, X.H., Ma, J., Gao, K.P., Sosinsky, G.E., Huang, K., et al. (2012). Preferential electrical coupling regulates neocortical lineage-dependent microcircuit assembly. *Nature* 486, 113–117.

Yusa, K., Zhou, L., Li, M.A., Bradley, A., and Craig, N.L. (2011). A hyperactive piggyBac

transposase for mammalian applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 1531–1536.

Zong, H., Espinosa, J.S., Su, H.H., Muzumdar, M.D., and Luo, L. (2005). Mosaic analysis with double markers in mice. *Cell* *121*, 479–492.

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Mouse anti-Tuj1	Biolegend	MMS-435P. RRID: AB_2728521
Rabbit anti-FLAG	Sigma	F7425. RRID:AB_439687
Mouse anti-HuC/D (clone 16A11)	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-21271. RRID:AB_221448
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Lipofectamine 2000	Invitrogen	11668027
paraformaldehyde (Antigenfix)	Diapath	F/P0014
phosphate buffer saline	Sigma	
Vectashield	Vector labs	H-1000. RRID:AB_2336789
Vectashield with DAPI	Vector labs	H-1200. RRID:AB_2336790
Trypan Blue	Sigma	T8154
DAPI	Sigma	D9542
Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM)	Life technologies	
E8 medium	Life technologies	A1517001
Geltrex™ LDEV-Free, hESC-Qualified, Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix	Life technologies	A1413302
Accutase	Life technologies	A1110501
poly-L-ornithine	Sigma	P4957
Laminin	Sigma	23017-015
Neurobasal Medium	Life technologies	21103049
Advanced DMEM/F-12	Life technologies	12634028
B-27™ Supplement (50X), minus vitamin A	Life technologies	12587010
N-2 Supplement (100X)	Life technologies	17502048
2-Mercaptoethanol (50 mM)	Life technologies	31350010
GlutaMAX™ Supplement	Life technologies	35050061
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Life technologies	15140122
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (100ml)	Life technologies	31985062
Dreamfect	OZBioscience	DF40500
Lipofectamine Stem Cell	Invitrogen	STEM00001
Normal goat serum	Sigma	G9023
Fetal Bovine Serum	Eurobio	CVFSVF00 01*
Fetal Bovine Serum	Gibco	10270-098
Normal donkey serum	Jackson ImmunoResearch	617-000-121
Critical Commercial Assays		
CloneAmp HiFi PCR Premix	Clontech	639298
Q5 high-fidelity DNA polymerase	NEB	M0491S
NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix	NEB	E2621S

Nucleospin Tissue Kit	Macherey-Nagel	740952.50
Experimental Models: Cell Lines		
HEK 293 cells	ATCC	1573
HeLa cells	ATCC	CCL-2
NIH 3T3 cells	ATCC	1658
HEK RY reporter cells	This paper	N/A
hiPS cells: WTSli008-A	EBiSC	RRID:CVCL_AH70
ES cells: KH2	Beard et al., 2006	N/A
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse	JANVIER LABS	Swiss
Chicken fertilized eggs	EARL Morizeau	JA57
Recombinant DNA		
<i>PB(1A)CAG∞RFP</i>	This paper	N/A
<i>PB(1B)CAG∞RFP</i>	This paper	N/A
<i>PB(2A)CAG∞RFP</i>	This paper	N/A
<i>iOnCAG∞RFP</i>	This paper	N/A
<i>iOnCAG∞MCS</i>	This paper	N/A
<i>LiOnCAG∞GFP</i>	This paper	N/A
<i>LiOnCAG∞RFP</i>	This paper	N/A
<i>LiOnCAG∞IRFP</i>	This paper	N/A
<i>PB CAG::GFP</i>	This paper	N/A
<i>PB CAG::RFP</i>	This paper	N/A
<i>PB CAG::IRFP</i>	This paper	N/A
<i>LiOnCAG∞GFP-Kras</i>	This paper	N/A
<i>LiOnCMV∞Cre</i>	This paper	N/A
<i>LiOnCAG∞RFP-2A-NICD</i>	This paper	N/A
<i>LiOnAtoh7∞Cre</i>	This paper	N/A
<i>LiOnAtoh7∞RFP</i>	This paper	N/A
<i>Tol2CAG::RY</i>	This paper	N/A
Software and Algorithms		
ImageJ	NIH	https://imagej.nih.gov/ij/ . RRID: SCR_003070;
Imaris	Bitplane	http://www.bitplane.com/Imaris/Imaris . RRID: SCR_007370
Adobe Photoshop	Adobe	http://www.adobe.com/fr/products/photoshop . RRID: SCR_014199
Adobe Illustrator	Adobe	https://www.adobe.com/fr/products/illustrator . RRID:SCR_010279
R Project for Statistical Computing	The R Foundation	https://www.r-project.org/ . RRID:SCR_001905
Metamorph software	Molecular Devices	https://www.moleculardevices.com/Products/ RRID: SCR_002368

GraphPad prism	GraphPad Software	https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/ . RRID:SCR_002798
Other		
Arrayscan high-content system	Thermo Fisher Scientific	Arrayscan
FACS	Beckman Coulter	MoFlo Astrios cell sorter
FACS	Beckman Coulter	Astrios MoFlo EQ cell sorter
Sanger sequencing	Genewiz	N/A
Zeiss Discovery V20	Zwiss	V20
vibrating microtome	Leica	VT1000
Cryostat	Thermo Fisher Scientific	Microm HM560
Confocal microscope	Olympus	FV1000
Epifluorescence microscope	Leica	DM6000
EVOS FL auto inverted microscope	Life technologies	AMAFD1000
Inverted automated microscope	Zeiss	Celldiscoverer 7

Figure 1

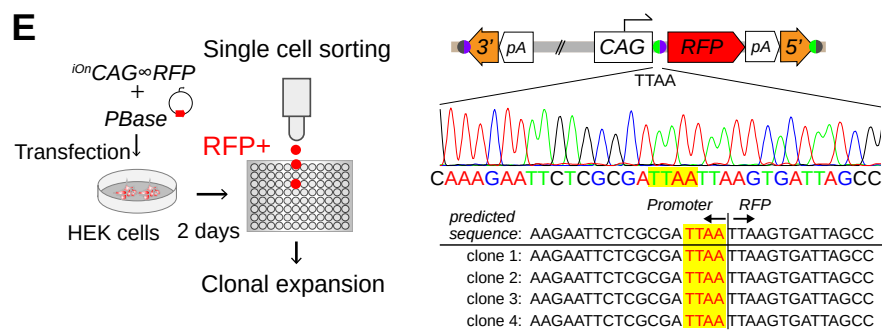
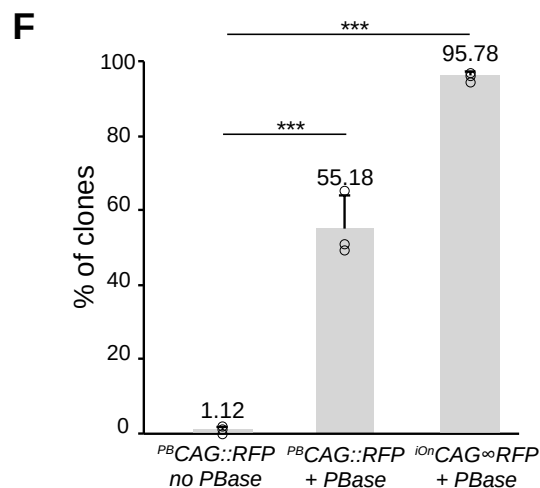
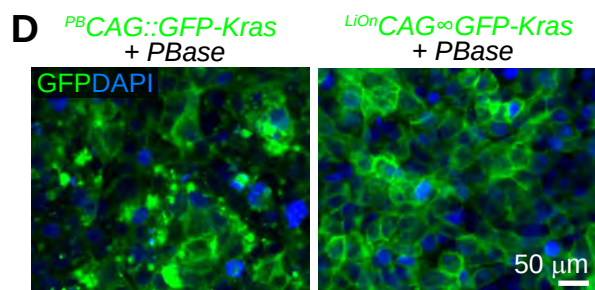


Figure 2

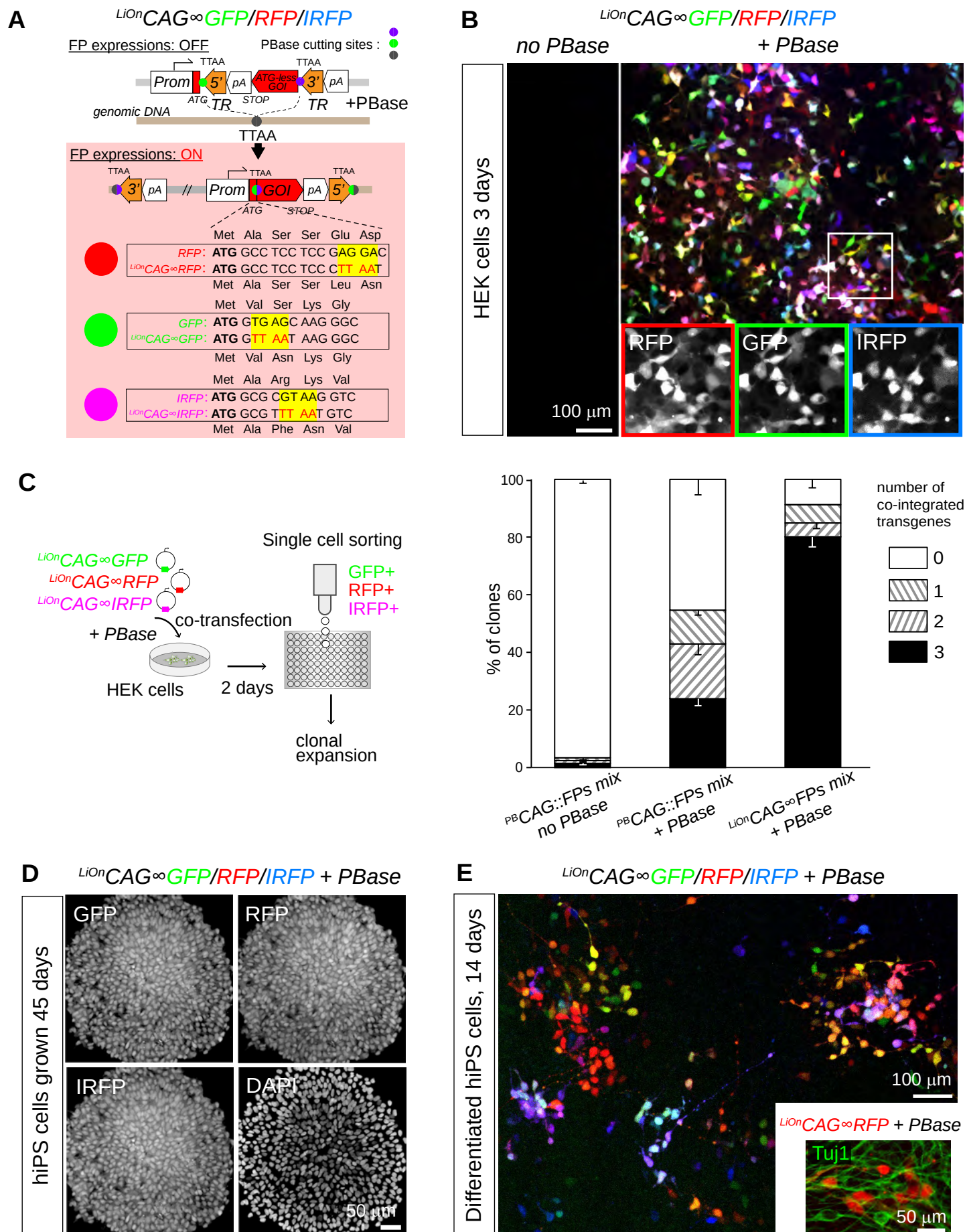


Figure 3

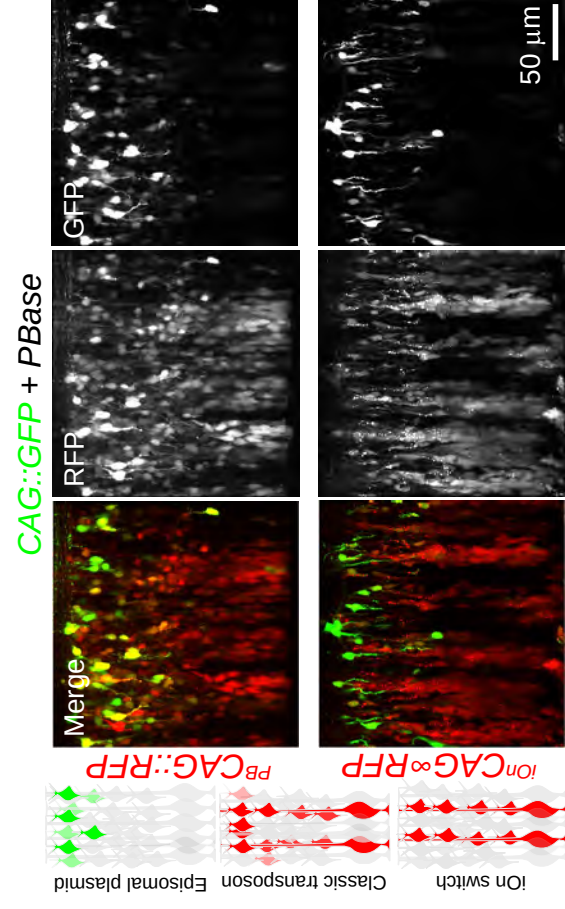
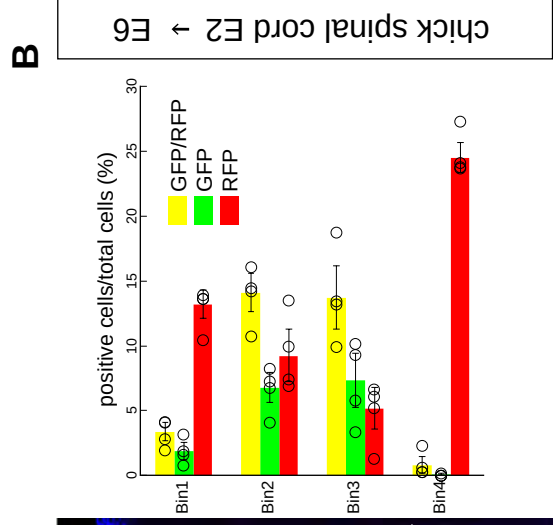
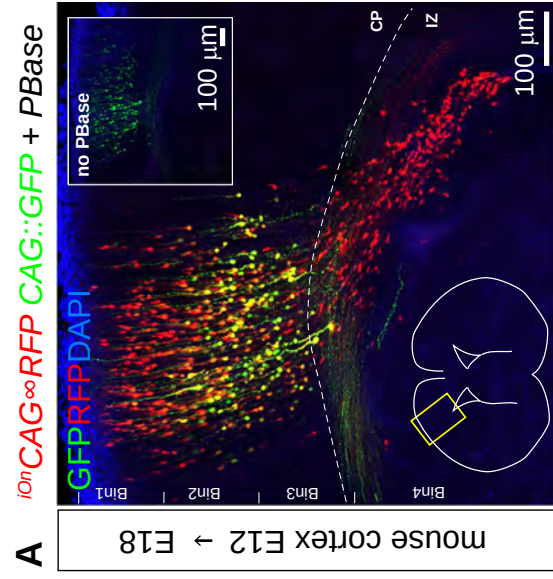
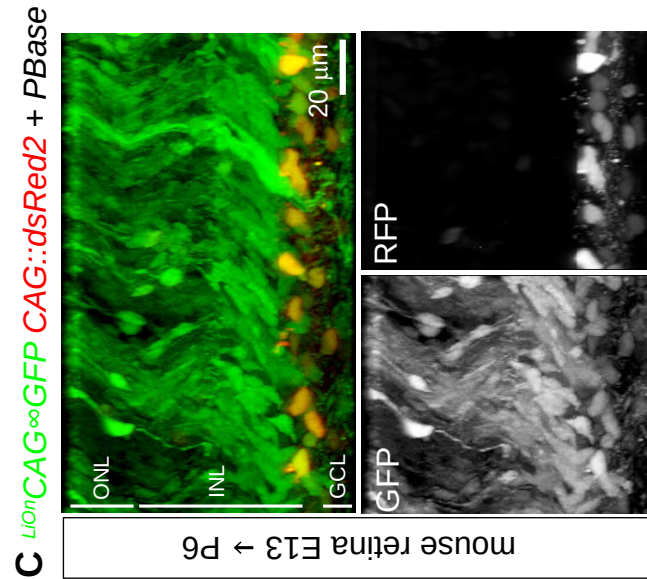


Figure 3



D

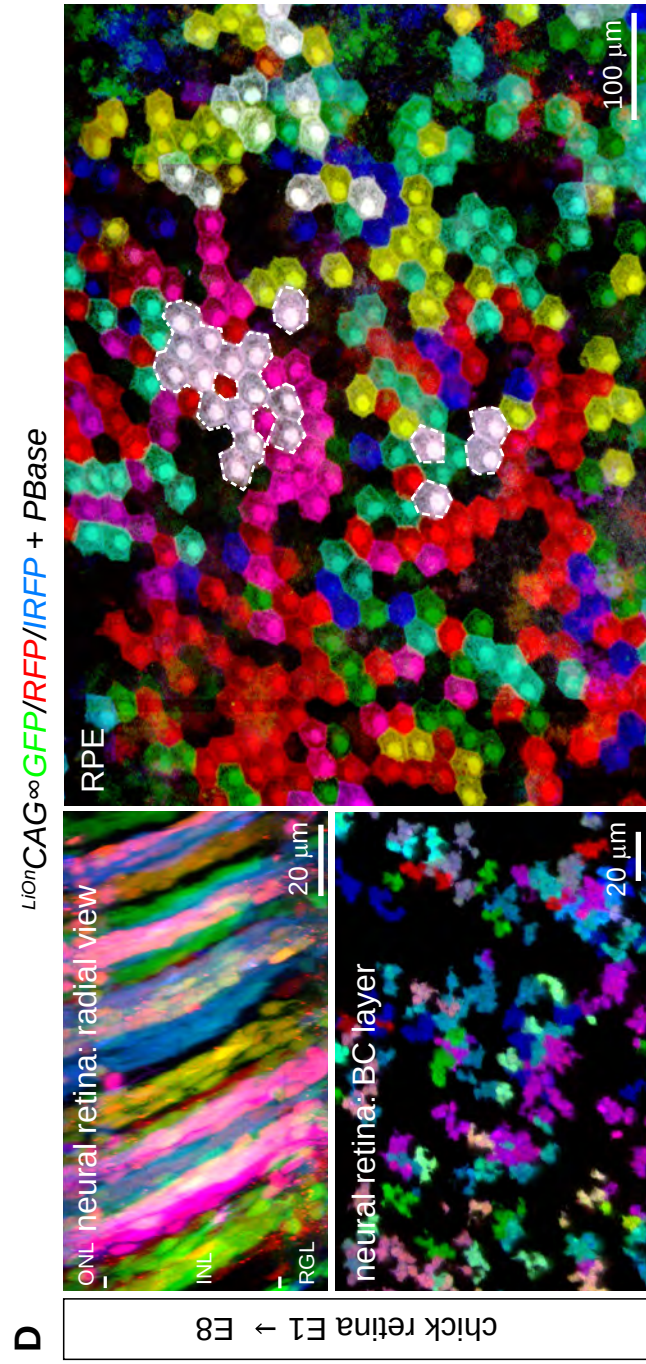


Figure 4

Figure 4

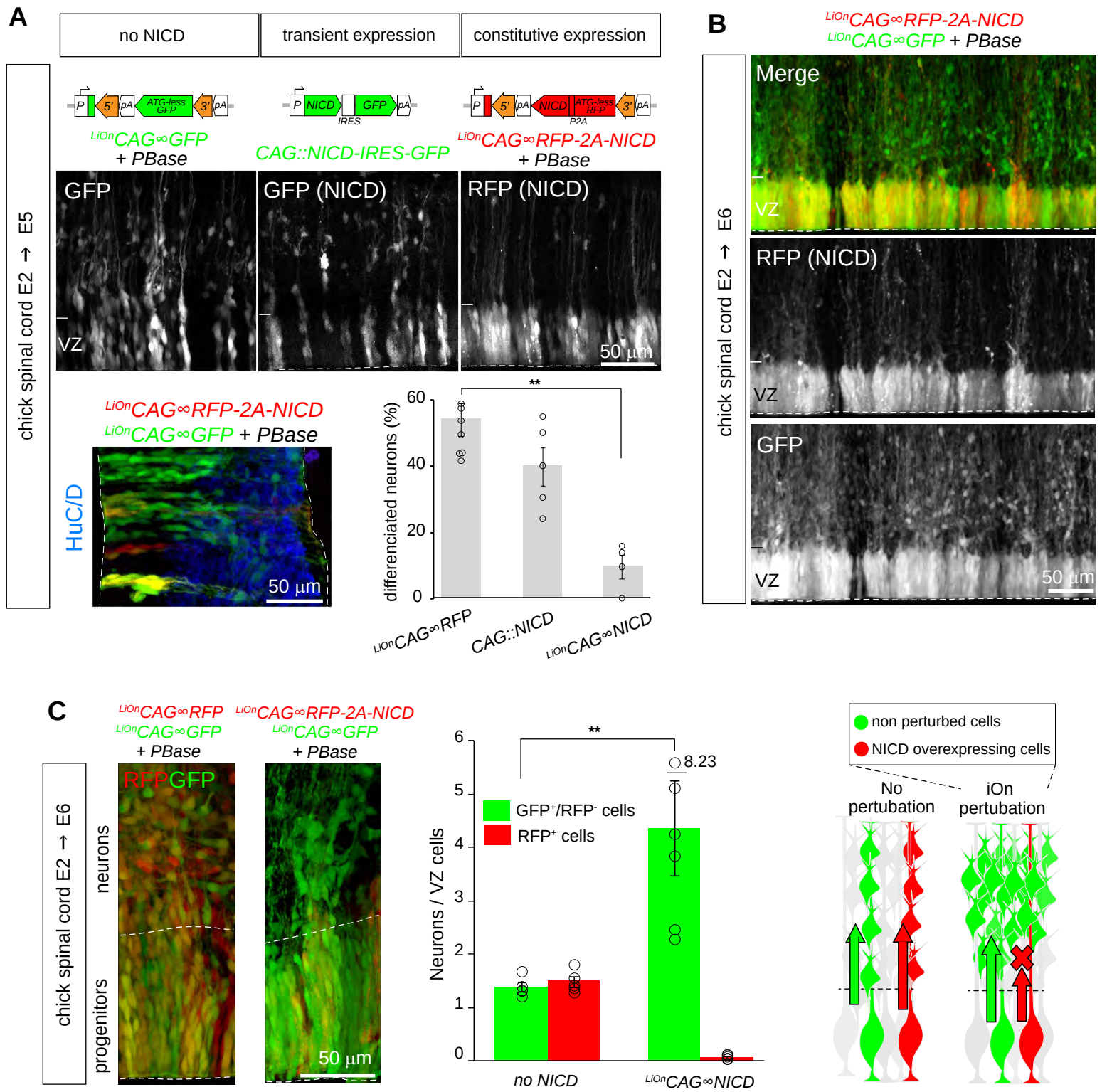
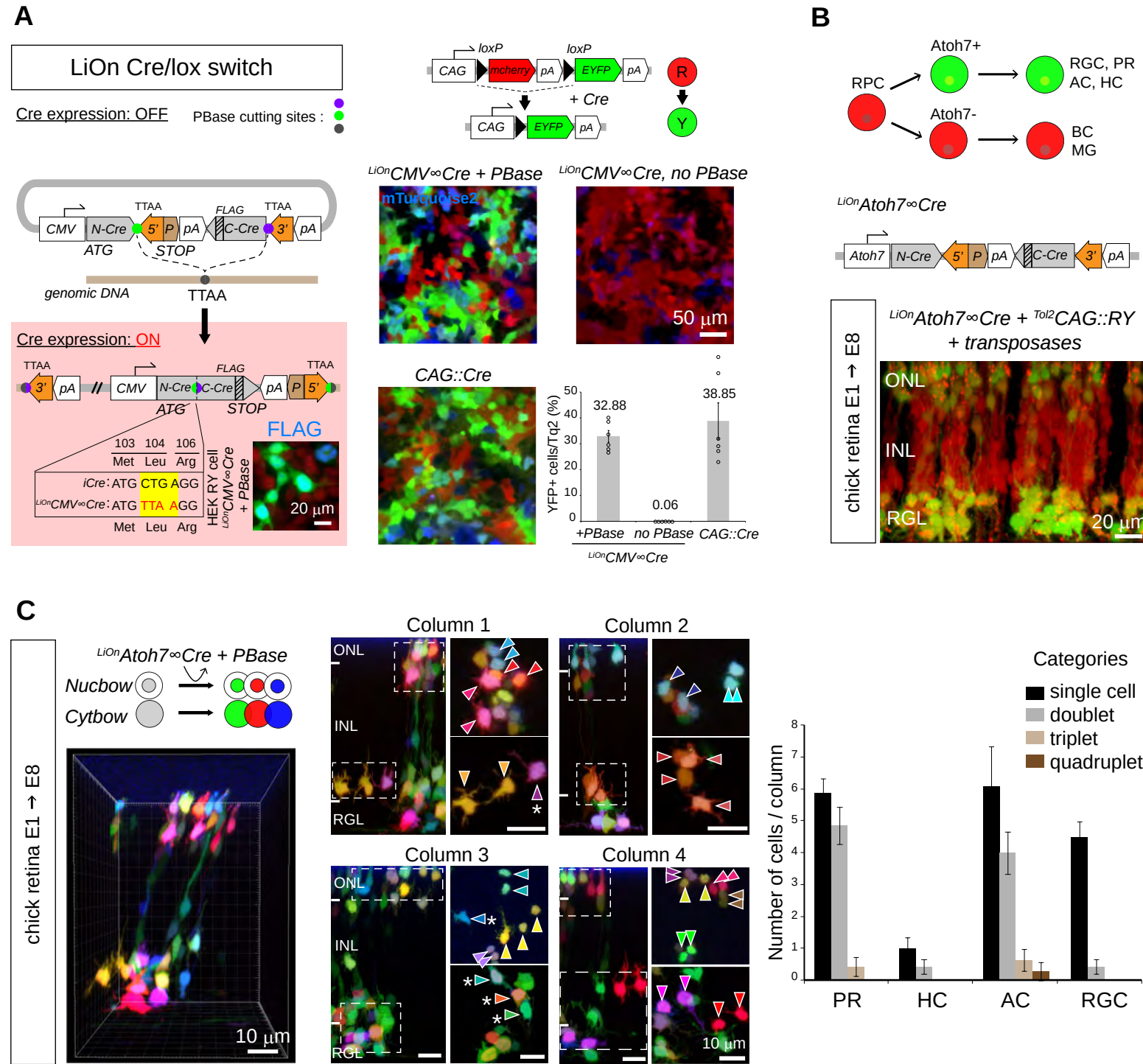
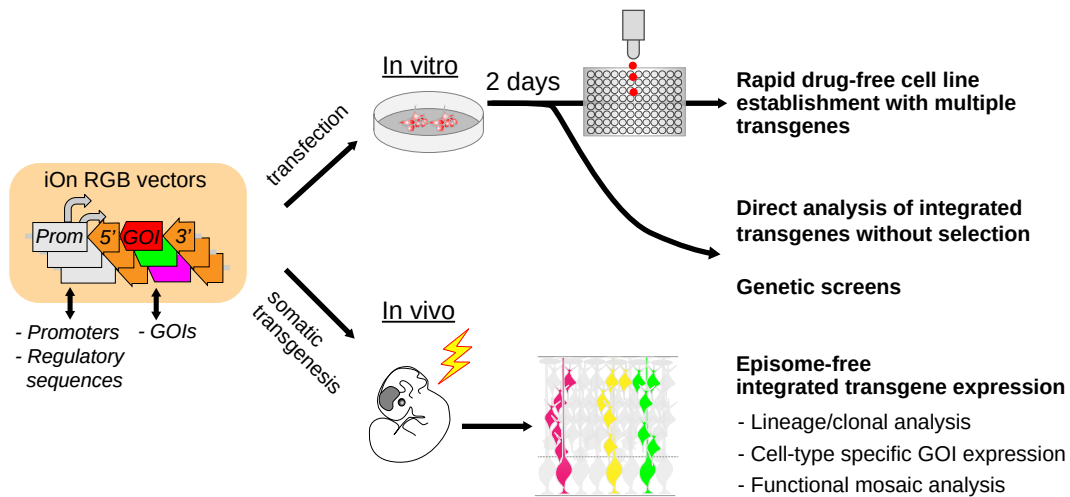


Figure 5

Figure 5





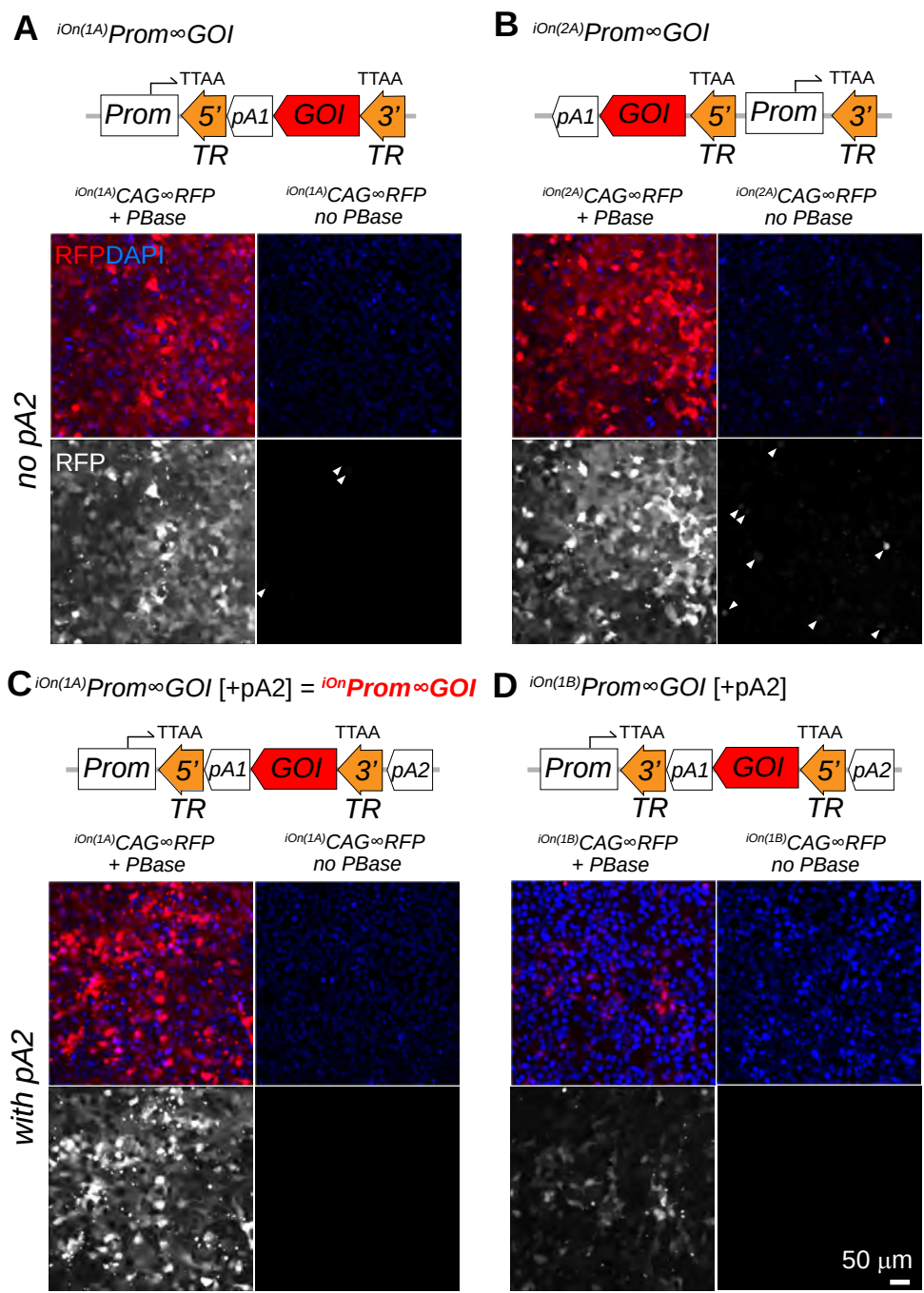


Figure S1. Design and test of transgene configurations for transposition-dependent GOI expression, related to Figure 1

(A, B) Top: two types of iOn transgene configurations (type 1, A and type 2, B) are possible depending on the positioning and relative orientation of the promoter and GOI. Bottom: test of the two configurations using *CAG* as promoter and *RFP* as GOI. 3 days after transfection in HEK293 cells, PBbase-dependent expression is observed with both transgenes, with only weak leakiness in absence of PBbase (arrowheads). (C, D) Top: two alternative designs of iOn switch (option A, C and option B, D) are possible depending on the positioning of the 5' and 3' transposon TRs. Schemes present the two alternatives on a type 1 configuration. A transcription terminator (pA2) is also positioned upstream of the GOI to reduce transcriptional leakiness prior to transposition. Bottom: test of the two configurations in HEK293 cells. PBbase-dependent expression is observed with both transgenes, with reduced background expression compared to (A). The configuration presenting highest signal to background ratio shown in C (type 1Ap, C, hereafter denominated $^{PB}CAG^{\infty}RFP$), was selected for subsequent experiments.

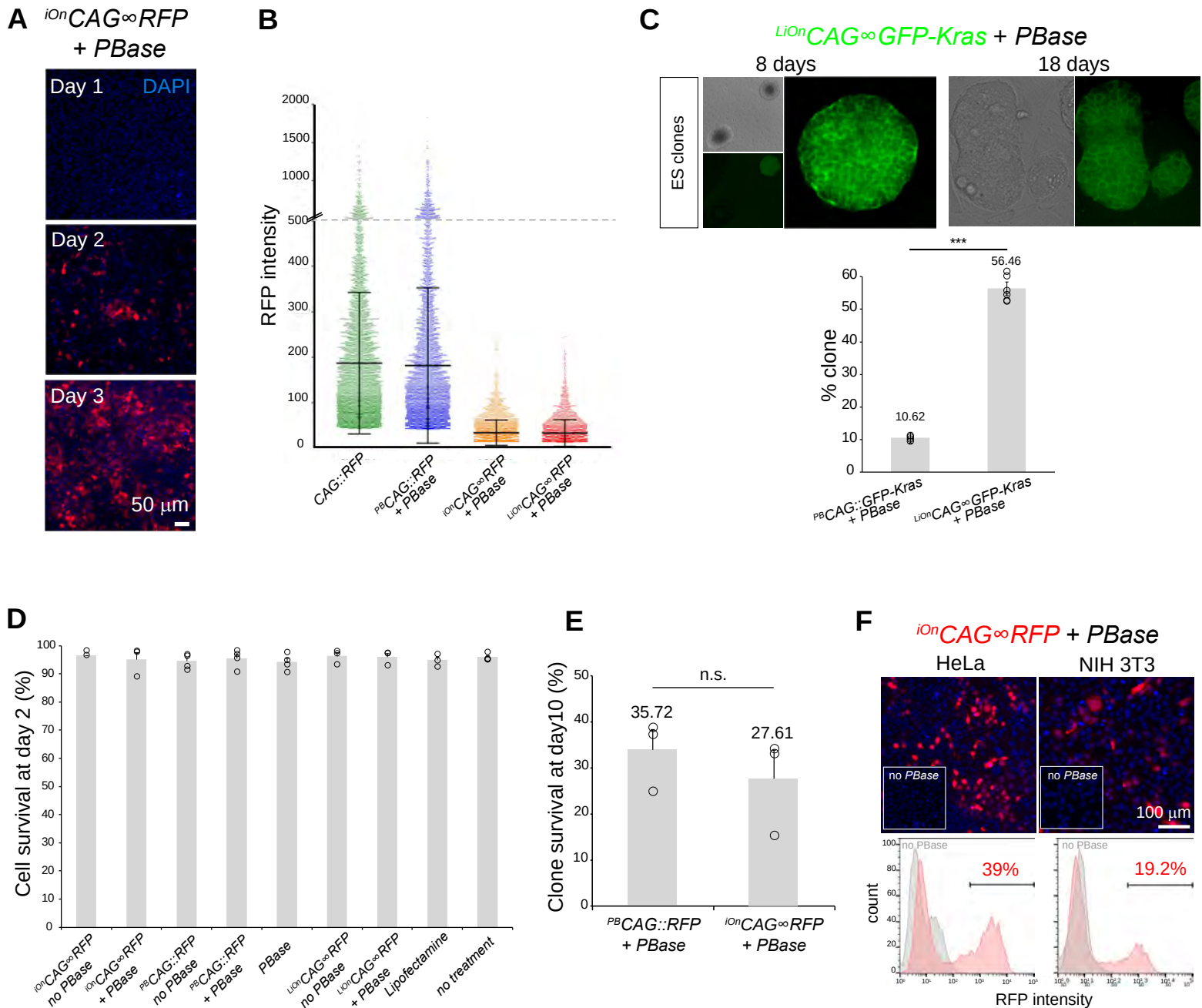


Figure S2. iOn vector expression in cultured cells, related to Figure 1

(A) Time-course of $iOnCAG^{\infty}RFP$ expression by epifluorescence imaging 1, 2, and 3 days after transfection in HEK293 cells in presence of PBase. (B) Comparison of expression levels from individual cells transfected with episomal ($CAG::RFP$), classic transposon ($iOnCAG^{\infty}RFP + PBase$) and iOn vectors ($iOnCAG^{\infty}RFP + PBase$ and $LiOnCAG^{\infty}RFP + PBase$). Measures acquired 3 days after transfection on a high-content imaging platform. (C) Top: mouse ES cell clones grown for 8 and 18 days after sorting based on expression of a LiOn vector encoding a membrane-bound GFP ($LiOnCAG^{\infty}GFP-Kras$ transfected 2 days prior to sorting). Left: low magnification picture showing GFP-positive and negative ES cell clones. Right: higher magnification of a positive clone showing membrane localization of GFP in all cells of the clone. Bottom: Compared to a classic transposon vector ($PBAG::GFP-Kras$), cells sorted based on $LiOnCAG^{\infty}GFP-Kras$ expression result in a higher yield of GFP-positive clones. Values and error bars represent the mean and s.e.m or four distinct replicates (dots). A χ^2 test indicated a significant difference between the two situations ($p < 0.001$). (D) Assessment of cell viability by Trypan blue assay 2 days after HEK293 cells transfection with iOn and control vectors. $>95\%$ survival is observed in all conditions. (E) Survival at 10 days of clones established from single RFP-positive cell sorted after transfection with $PBAG::RFP$ and $iOnCAG^{\infty}RFP$ in presence of PBase (measurements from the experiment presented in Fig. 1F). A χ^2 test indicated non-significant difference between the two situations. (F) PBase-dependent expression from a $iOnCAG^{\infty}RFP$ vector in HeLa and NIH 3T3 cells 3 days after transfection in presence and absence of PBase (top: epifluorescence imaging, bottom: FACS analysis).

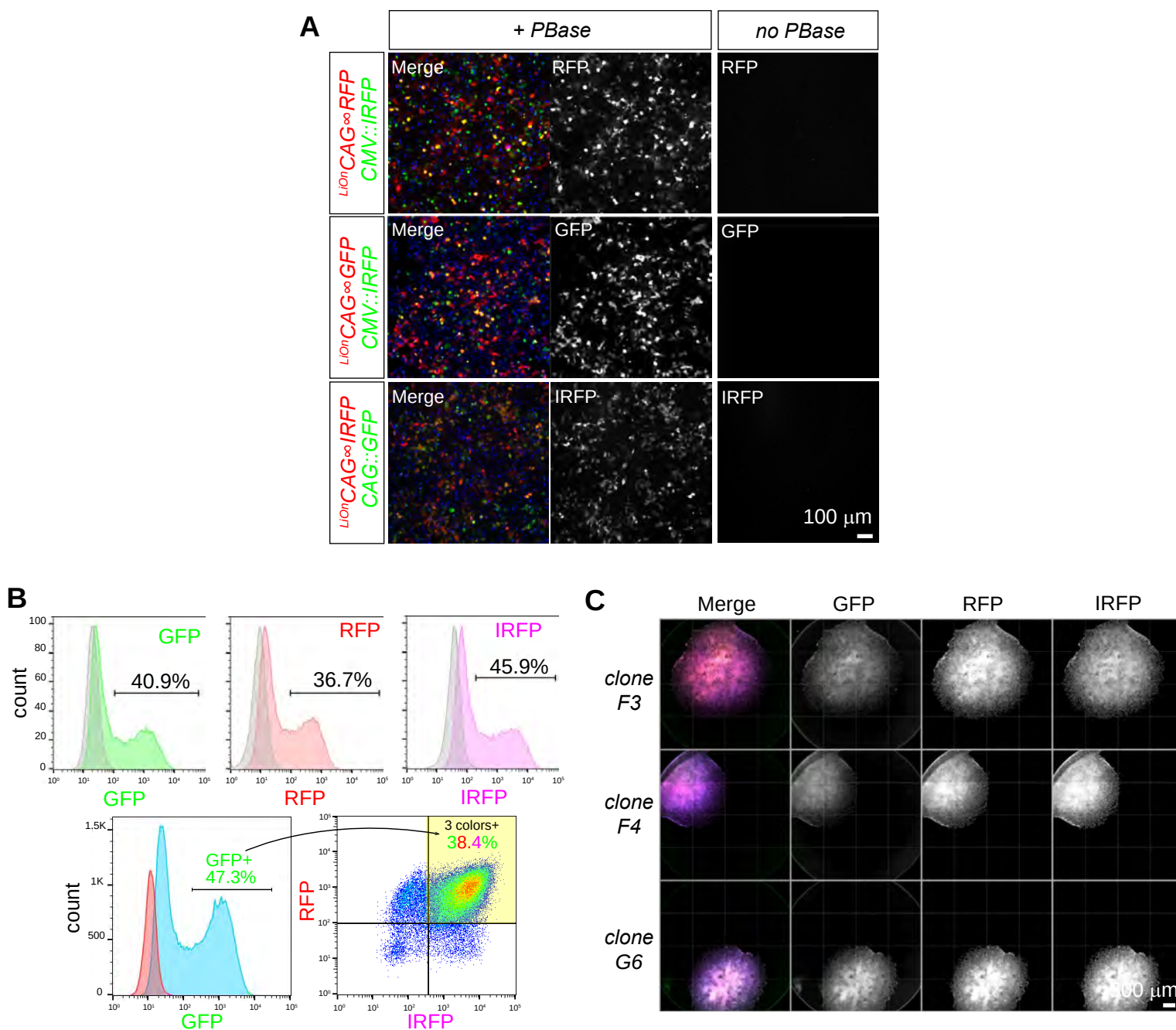


Figure S3. Multiplex transgenesis with iOn vectors, related to Figure 2

(A) Validation of three $LiOnCAG^{\infty}FP$ vectors respectively expressing RFP (top), EGFP (middle) and IRFP (bottom) in a PBase-dependent manner. HEK293 cells were imaged 3 days after transfection. Signal from LiOn vectors is encoded in red, while that of episomal vectors used as transfection control is shown in green (blue: DAPI staining). (B) Analysis and sorting of triple-labeled cells co-expressing the three $LiOnCAG^{\infty}RFP$ (GFP/RFP/IRFP) vectors. HEK293 cells were analyzed 2 days after transfection. Top: FACS analysis of single channels (colored plots) from triple-transfected cells compared to cells transfected with a non-fluorescent plasmid (grey). Bottom: parameters for single cell sorting. Within the GFP positive population (47.3%, bottom left), RFP/IRFP double-positive cells (38.4%, bottom right) were selected and plated as single cells. (C) Examples of clones co-expressing the three $LiOnCAG^{\infty}FP$ vectors.

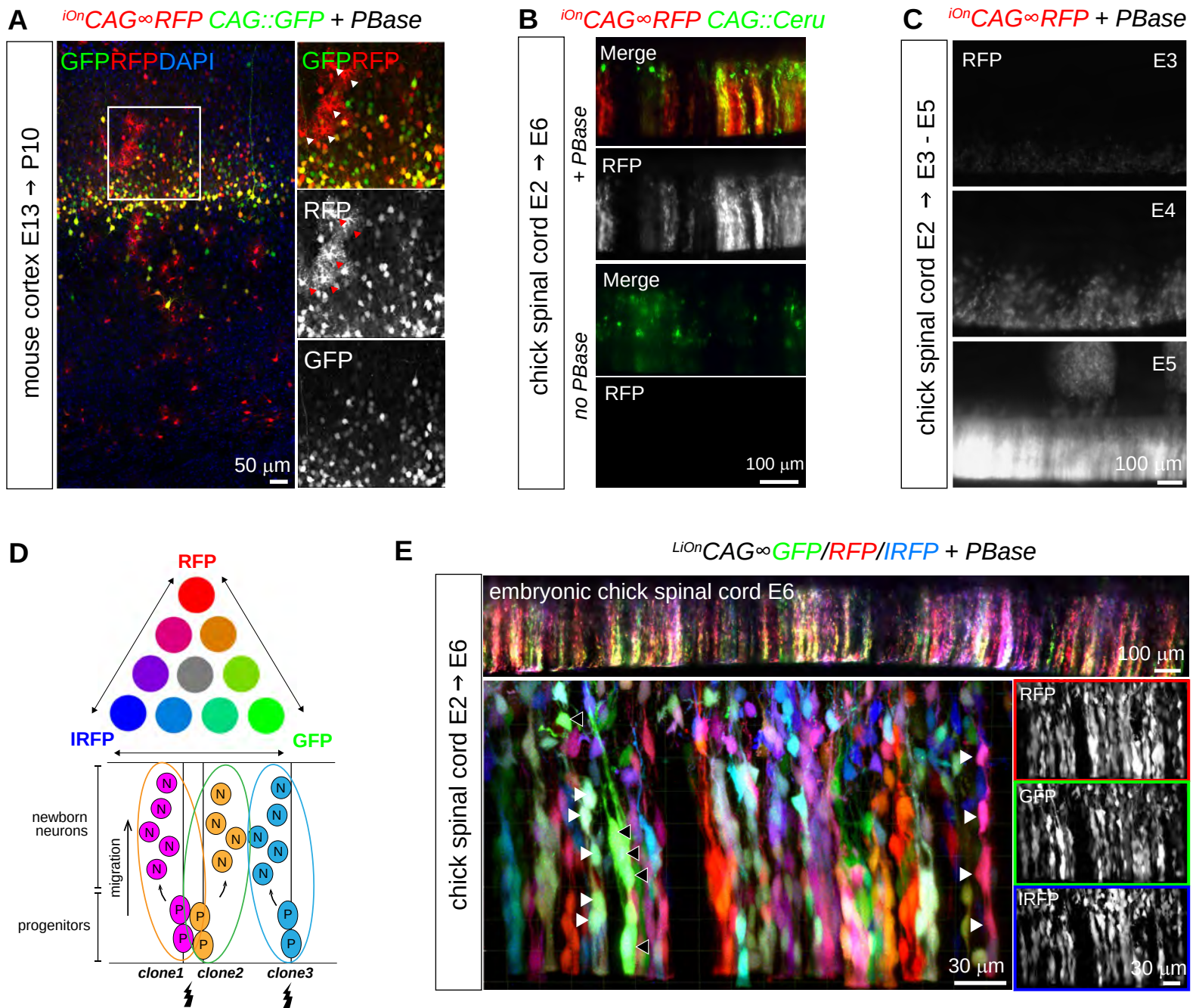


Figure S4. Application of iOn vectors in the vertebrate central nervous system, related to Figure 3

(A) At P10, astrocytes are also labeled with $iOnCAG^{\infty}RFP$ but not with a $CAG::GFP$ plasmid electroporated at E13.5, demonstrating long term integration and expression of the iOn vector in neural progenitors and in their neuronal and glial descent (insets show enlarged view of boxed area, arrowheads point to protoplasmic astrocytes). (B) Validation of the iOn switch in vivo in the embryonic chicken spinal cord at E6. An episomal plasmid ($CAG::Cerulean$, green) is found in isolated neurons born shortly after electroporation, while the iOn vector (red) labels radial clones of neurons migrating from the ventricular surface with the presence of PBase (top), but not the absence of PBase (bottom). (C) Time-course expression of $iOnCAG^{\infty}RFP$ with PBase by epifluorescence imaging 1, 2, and 3 days after electroporation in the embryonic chick spinal cord (whole mount views). (D) Top: Combinatorial expression of 3 FPs can generate several distinct color labels. Bottom: Expression of these labels in neurogenic progenitors can be used to resolve individual clones. (E) Wide-field epifluorescence (top) and confocal views (bottom) from an E6 chick spinal cord electroporated at E2 with triple color LiOn mix ($GFP/RFP/IRFP$) and PBase. FP combinations identify and resolve different clones of neural cells migrating radially from the ventricular surface (arrowheads).

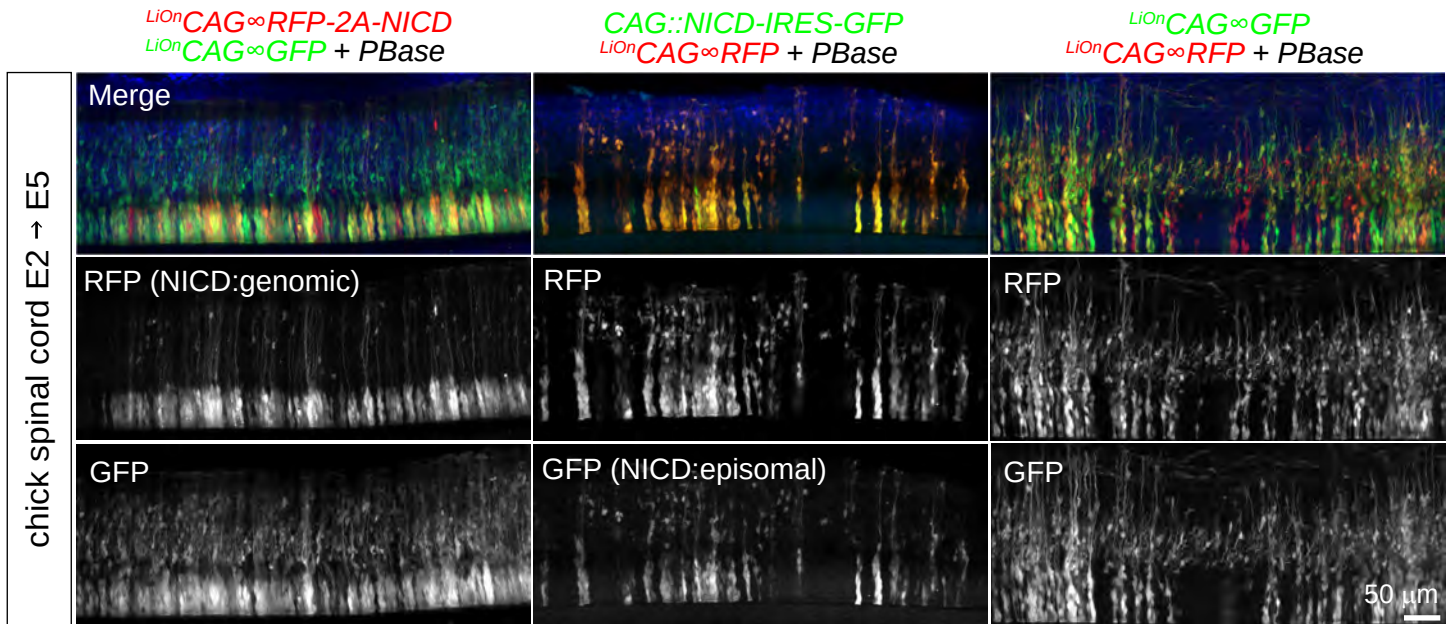


Figure S5. Long term perturbation of neural development by somatic transgenesis with iOn vectors, related to Figure 4

Comparison of the effects obtained in neural progenitors by expressing the Notch intracellular domain (NICD) from LiOn (left) and episomal vectors (middle) relative to a control situation right). Panels show longitudinal views through whole-mount embryonic chicken spinal cord preparations 3 days after electroporation, oriented such that the ventricular surface lines the bottom of the image. NICD-expressing plasmids were co-electroporated with non-perturbing plasmids as control. Permanent expression of NICD with LiOn ($LiOnCAG^{\infty}RFP-2A-NICD$, left) leads to an almost complete blockade of neuronal differentiation and radial migration (compare RFP signal with control $LiOnCAG^{\infty}GFP$ expression). Transient NICD expression ($CAG::NICD-IRES-GFP$, middle) only results in partial effects compared with control ($LiOnCAG^{\infty}GFP/RFP$, right).

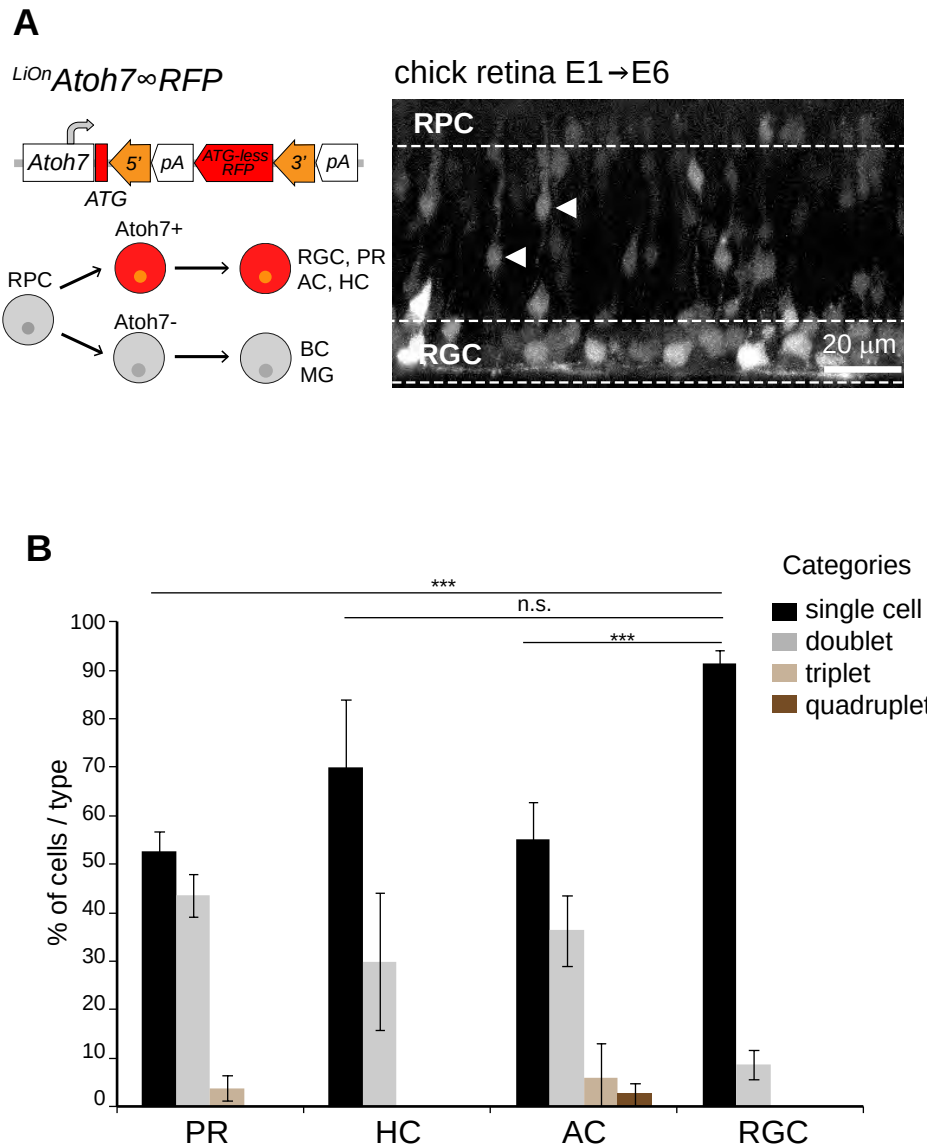


Figure S6. Validation of Atoh7-driven expression with the LiOn strategy and quantification of the composition of Atoh7-derived clones, related with Figure 5

(A) View across the retina of an E6 chicken embryo, during the peak of RGC production and before the start of PR genesis, 5 days after electroporation of a *LiOn Atoh7[∞]RFP* vector. Transgene expression is most prominent in the RGC (RGL) and outer nuclear (ONL) layers, while in intermediate layers only a fraction of labeled cells are visible, likely migrating towards the RGL at this intermediate stage (arrowheads). (B) Quantification of the percentage of Atoh7-derived retinal neurons belonging to 1, 2, 3 or 4-cell clones within labeled photoreceptor (PR), horizontal (HC), amacrine (AC) and ganglion cells (RGC) found in individual columns examined in Figure 5C. Graph shows mean and s.e.m. of 14 columns reconstructed from 2 distinct embryos. A Kruskal-Wallis test indicated significant difference between RGCs vs. PRs and HCs clonal category distributions ($p < 0.001$).

	Name	Scheme
Test of iOn configurations	<i>iOn(1A)CAG[∞]RFP</i>	
	<i>iOn(2A)CAG[∞]RFP</i>	
	<i>iOn(1B)CAG[∞]RFP</i>	
iOn (transcriptional switch)	<i>iOnCAG[∞]RFP</i>	
	<i>iOnCAG[∞]MCS</i>	
LiOn (translational switch)	<i>LiOnCAG[∞]GFP</i>	
	<i>LiOnCAG[∞]RFP</i>	
	<i>LiOnCAG[∞]IRFP</i>	
Tagged LiOn	<i>LiOnCAG[∞]GFP-Kras</i>	

	Name	Scheme
Control PB transposons	<i>PB CAG::GFP</i>	
	<i>PB CAG::RFP</i>	
	<i>PB CAG::IRFP</i>	
LiOn Cre	<i>LiOnCMV[∞]Cre</i>	
NICD	<i>LiOnCAG[∞]RFP-2A-NICD</i>	
Atoh7 promoter	<i>LiOnAtoh7[∞]Cre</i>	
	<i>LiOnAtoh7[∞]RFP</i>	
	<i>Tol2-based floxed reporter</i>	

Table S1. Schematic map of the transgenes designed for this study

All constructs were assembled in a pUC57-mini plasmid backbone. Restriction sites available to exchange GOIs and promoters are indicated. An iOn vector equipped with a multi-cloning site was also designed to facilitate the cloning of varied GOIs. pA1, pA2, pA3: bGH, rabbit beta-globin and SV40 transcription terminators. P: PEST degradation signal.

Étude du lignage des cellules progénitrices rétiniennes chez le poulet : origine des classes et types neuronaux

Les mécanismes régulant la génération des différents types neuronaux du système nerveux pendant le développement des vertébrés sont encore mal connus. Au cours de cette thèse, la composition et l'organisation des clones de neurones générés par des cellules progénitrices rétiniennes (RPC) individuelles ont été étudiées chez le poulet avec la stratégie Brainbow. Celle-ci permet de marquer de façon permanente les RPC avec des combinaisons de couleurs distinctes pour suivre leur lignage. Des approches ont été développées pour : 1) déclencher le marquage Brainbow à différents stades de développement ou dans des RPC spécifiques ; 2) caractériser en 3D l'organisation cellulaire des clones rétiniens et identifier les types cellulaires générés. Une dispersion tangentielle inédite des RPC a été mise en évidence dans le neuroépithélium rétinien avant la phase de neurogenèse, conduisant à l'intercalation uniforme des clones. La composition des clones a été analysée pour comprendre si les RPC précoces pourraient être biaisées à générer certains types neuronaux et contribuer par leur intercalation à leur répartition régulière dans la rétine. Ce travail a permis l'étude des potentialités d'une population de progéniteurs neuronaux et l'exploration des liens entre développement précoce et organisation d'un tissu par de nouvelles approches applicables à des problématiques variées.

Mots-clés

Neurobiologie ; développement ; rétine ; poulet ; types neuronaux ; analyse clonale

A lineage study of progenitor cells in the avian retina: origin of neuronal classes and types

The mechanisms regulating the generation of the different types of neurons of the vertebrate nervous system during development are still poorly understood. In this thesis, the composition and organization of clones of neurons generated by retinal progenitor cells (RPCs) in chicken embryos were characterized with the Brainbow strategy. This technique enables to permanently label RPCs with distinct colour combinations in order to individually track their lineage. New approaches were developed to: 1) trigger Brainbow labels at different stages of development or in genetically identified RPCs; 2) characterize in 3D the organization of retinal clones and identify the neuronal types that they comprise. My results provide evidence for a previously uncharacterized phase of tangential dispersion of RPCs in the retinal neuroepithelium before neurogenesis, leading to uniform intercalation of retinal clones. The composition of these clones was analyzed to understand whether early RPCs could be biased to generate certain neural types and, through intercalation, contribute to their regular distribution in the retina. This study sheds light on the potentialities of a population of neural progenitors and on the possible links between the early development and mature cellular organization of a tissue through new approaches applicable to diverse problematics.

Keywords

Developmental neurobiology ; retina ; chicken ; neuron types ; clonal analysis

Étude du lignage des cellules progénitrices rétiniennes chez le poulet : origine des classes et types neuronaux

Les mécanismes régulant la génération des différents types neuronaux du système nerveux pendant le développement des vertébrés sont encore mal connus. Au cours de cette thèse, la composition et l'organisation des clones de neurones générés par des cellules progénitrices rétiniennes (RPC) individuelles ont été étudiées chez le poulet avec la stratégie Brainbow. Celle-ci permet de marquer de façon permanente les RPC avec des combinaisons de couleurs distinctes pour suivre leur lignage. Des approches ont été développées pour : 1) déclencher le marquage Brainbow à différents stades de développement ou dans des RPC spécifiques ; 2) caractériser en 3D l'organisation cellulaire des clones rétiniens et identifier les types cellulaires générés. Une dispersion tangentielle inédite des RPC a été mise en évidence dans le neuroépithélium rétinien avant la phase de neurogenèse, conduisant à l'intercalation uniforme des clones. La composition des clones a été analysée pour comprendre si les RPC précoces pourraient être biaisées à générer certains types neuronaux et contribuer par leur intercalation à leur répartition régulière dans la rétine. Ce travail a permis l'étude des potentialités d'une population de progéniteurs neuronaux et l'exploration des liens entre développement précoce et organisation d'un tissu par de nouvelles approches applicables à des problématiques variées.

Mots-clés

Neurobiologie ; développement ; rétine ; poulet ; types neuronaux ; analyse clonale

A lineage study of progenitor cells in the avian retina: origin of neuronal classes and types

The mechanisms regulating the generation of the different types of neurons of the vertebrate nervous system during development are still poorly understood. In this thesis, the composition and organization of clones of neurons generated by retinal progenitor cells (RPCs) in chicken embryos were characterized with the Brainbow strategy. This technique enables to permanently label RPCs with distinct colour combinations in order to individually track their lineage. New approaches were developed to: 1) trigger Brainbow labels at different stages of development or in genetically identified RPCs; 2) characterize in 3D the organization of retinal clones and identify the neuronal types that they comprise. My results provide evidence for a previously uncharacterized phase of tangential dispersion of RPCs in the retinal neuroepithelium before neurogenesis, leading to uniform intercalation of retinal clones. The composition of these clones was analyzed to understand whether early RPCs could be biased to generate certain neural types and, through intercalation, contribute to their regular distribution in the retina. This study sheds light on the potentialities of a population of neural progenitors and on the possible links between the early development and mature cellular organization of a tissue through new approaches applicable to diverse problematics.

Keywords

Developmental neurobiology ; retina ; chicken ; neuron types ; clonal analysis