

JIMMY ELLIOTT

**CONTRÔLE DE LA COMPÉTENCE TEMPORELLE DES  
CELLULES PROGÉNITRICES DE LA RÉTINE PAR  
IKAROS ET RÔLE DE LA VOIE DU CNTF/LIF DANS  
LA DIFFERENCIATION ET L'APOPTOSE DES  
PHOTORÉCEPTEURS BÂTONNETS**

Thèse présentée  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de doctorat en neurobiologie  
pour l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)

DÉPARTEMENT D'ANATOMIE-PHYSIOLOGIE  
FACULTÉ DE MÉDECINE  
QUÉBEC

JANVIER 2008

© JIMMY ELLIOTT, 2008

## RÉSUMÉ

La rétine constitue un modèle très intéressant pour l'étude du développement du système nerveux. Elle origine de cellules neuroépithéliales qui se diviseront et se différencieront pour donner naissance à 6 différents types de neurones et un type de cellule gliale. Au cours du développement, la majorité des cellules progénitrices de la rétine (CPRs) sont multipotentes et quelques unes ont même le potentiel de générer tous les différents types cellulaires de la rétine. Cependant, à des stades plus tardifs, les CPRs perdent alors la compétence qui leur permet de générer les cellules dites précoces et acquièrent la capacité de générer les cellules dites tardives. Il est clair que l'ensemble des types cellulaires est produit dans un ordre bien précis et concomitant, mais les mécanismes moléculaires par lesquels les CPRs changent leur compétence au cours du temps pour générer chaque type de cellule au bon moment restent toutefois inconnus. Le facteur de transcription Ikaros avait été largement étudié dans le système hématopoïétique, cependant son rôle potentiel au niveau du système nerveux n'avait que très peu été exploré. Dans cette étude nous avons investigué l'hypothèse qu'Ikaros puisse contrôler la compétence temporelle des CPRs. Nous avons premièrement observé qu'Ikaros est exprimé dans les CPRs au début du développement tandis qu'à des stades plus avancés son expression devient alors restreinte à une sous-population pour finalement être absente dans l'ensemble des CPRs aux derniers stades du développement de la rétine. De plus, chez la rétine adulte, Ikaros est exprimé dans les neurones différenciés de type précoce. En effectuant une analyse clonale à l'aide de rétrovirus, nous avons montré qu'en induisant l'expression d'Ikaros dans les CPRs à des stades tardifs, où il n'est normalement pas exprimé, il est possible d'induire la production de cellules de type précoce au dépend des cellules produites tardivement. De plus, l'analyse de souris dont le gène Ikaros a été inactivé nous a révélé que plusieurs cellules nées précocement au cours du développement sont manquantes. L'ensemble de ces résultats suggère donc un modèle dans lequel l'expression d'Ikaros est à la fois nécessaire et suffisante pour conférer une compétence temporelle précoce au CPRs.

Une fois la diversité cellulaire générée, des vagues d'apoptoses successives ont lieu de manière à éliminer les cellules extranuméraires ou corriger les erreurs de connections. La mort cellulaire programmée ou apoptose est donc un procédé essentiel au développement du système nerveux. Cependant, les régulateurs extracellulaires de cette mort cellulaire développementale restent toutefois très méconnus. Dans cette thèse, nous avons étudié le rôle de la voie de signalisation du CNTF/LIF durant le développement rétinien *in vivo*. Nous démontrons que l'exposition au CNTF durant le développement postnatal de la rétine *in vivo* retarde l'expression de la rhodopsine et résulte en un important déficit spécifique en photorécepteurs. Plus spécifiquement, nous montrons que l'exposition au CNTF induit une augmentation importante de la mort cellulaire des précurseurs postmitotiques des photorécepteurs bâtonnets. De plus, nous montrons que le blocage de la voie du CNTF/LIF durant le développement de la rétine de souris *in vivo* résulte en une diminution significative de la mort cellulaire développementale des photorécepteurs. Nous démontrons aussi que la voie CNTF/LIF est responsable de l'apoptose spécifique des photorécepteurs issuent de clones contenant seulement des photorécepteurs sans toutefois affecter les photorécepteurs issuent de clones mixtes. Nous avons observé que la stimulation ou le blocage de la voie du CNTF/LIF contrôle l'expression génique des isoformes neuronale et endothéliale de la synthase d'oxide nitrique (NOS) et la production subséquente d'oxide nitrique (NO) à partir de ces enzymes est responsable de l'apoptose induite par CNTF . Ces résultats suggèrent donc que la voie de signalisation du CNTF/LIF est active au cours du développement rétinien et agit via la régulation de la production d'oxide nitrique afin de moduler la mort cellulaire programmée des précurseurs postmitotiques des photorécepteurs bâtonnets.

## AVANT-PROPOS

Je voudrais avant tout exprimer mes plus grands remerciements à mon directeur de recherche Claude Gravel, pour m'avoir donné la chance de travailler sur la rétine, un modèle qui m'a passionné au plus haut point durant ces années. Merci, de m'avoir respecté dans les décisions que j'ai dû prendre durant mon doctorat et de m'avoir toujours supporté. Un gros merci à mon codirecteur Michel Cayouette de m'avoir permis de continuer mon doctorat dans son laboratoire. Merci d'avoir été présent et d'avoir été si dynamique dans toutes les découvertes que l'on a fait ensemble dans le labo. Merci à mes deux directeurs d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir poussé à toujours me dépasser.

Je voudrais aussi remercier les gens du CRULRG. Premièrement, Ann Lorrain et Caroline Paquet, les assistantes de recherche du labo. Merci d'avoir été là et d'avoir répondu à toutes mes questions quand j'en avais besoin et de m'avoir toujours encouragé à continuer. Merci à Martin Deschênes de m'avoir pris en stage d'été pour la première fois et de m'avoir permis de travailler en neuroscience et de m'avoir fait connaître le CRULRG. Merci à toute la gang du 6e, Andréanne, Martin L, Martin P, Phil, Martin G, Martine, Cyntia, Julie-Christine, Vince, et tous ceux que j'oublis. On a passé des super moments, surtout en congrès et dans nos voyages post-congrès. Merci tout spécial à Sonya !!! qui m'a été d'une aide incroyable et qui m'aide encore aujourd'hui !! T'as été super !

Je ne peux pas oublier les gens de l'IRCM que j'ai côtoyé durant ces deux dernières années. Merci au labo Cayouette ! Christine pour avoir été si gentille avec moi ! Merci d'avoir répondu à toutes mes questions et surtout celles de troubleshooting! Merci pour ton aide dans mon projet, il ne serait pas ce qu'il est aujourd'hui si tu n'avais pas été là! Merci à Vasanth pour ton aide sur l'article et merci aussi à Amel pour nos grandes discussions sur la vie et nos sorties sur St-Laurent ! Merci à Francisco pour nos discussions sur la Science. Merci au labo Charron et Kania !

Merci, à Dr. Parent d'avoir été sur mon comité d'examen de pré-doctorat et d'avoir bien voulu faire partie de mon comité encore une fois. Merci aux autres membres de mon comité de thèse, Dr Saghatelyan et Dr. Kmita.

# TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	I
AVANT-PROPOS .....	III
TABLE DES MATIÈRES .....	V
LISTE DES TABLEAUX .....	VII
LISTE DES FIGURES .....	VIII
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	XXII
CHAPITRE 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	14
1.1 LA RETINE : MODÈLE DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL.....	14
1.1.1 Organisation anatomique de la rétine .....	15
1.1.2 Phototransduction .....	18
1.2 DEVELOPPEMENT DE LA RÉTINE.....	20
1.2.1 Prolifération et production de la diversité cellulaire.....	20
1.2.1.1 Multipotentialité des CPRs .....	22
1.2.1.2 Facteurs intrinsèques.....	23
1.2.1.3 Facteurs environnementaux .....	24
1.2.2 Différenciation et spécification de la diversité cellulaire .....	24
1.2.2.1 Facteurs environnementaux .....	25
1.2.2.2 Facteurs intrinsèques.....	27
1.2.3 Modèle de compétence des CPRs .....	32
1.3 OBJECTIF DE TRAVAIL 1 .....	35
1.4 MODELE DE COMPETENCE CHEZ LA DROSOPHILE .....	36
1.5 IKAROS : ORTHOLOGUE DE HUNCHBACK .....	37
1.5.1 Structure et isoformes .....	37
1.5.2 Rôle dans le système hématopoïétique .....	39
1.5.3 Contrôle de l'expression génique .....	41
1.6 DIFFÉRENCIATION ET MORT CELLULAIRE.....	44
1.7 OBJECTIF DE TRAVAIL 2 .....	47
1.8 CILIARY NEUROTROPHIC FACTOR.....	48
1.8.1 La voie de signalisation du CNTF/LIF .....	50
1.8.2 Rôle de la voie CNTF/LIF durant le développement rétinien .....	51
1.8.2.1 Expression du CNTFR $\alpha$ .....	51
1.8.2.2 CNTF/LIF et différenciation des photorécepteurs.....	52
1.9 APOPTOSE DEVELOPPEMENTALE DES PHOTORÉCEPTEURS .....	54
CHAPITRE 2. ARTICLE 1 .....	55
2.1 RÉSUMÉ .....	56
2.2 ABSTRACT.....	57

2.3 INTRODUCTION .....	58
2.5 DISCUSSION .....	68
2.6 MATERIALS AND METHODS .....	75
2.7 ACKNOWLEDGMENTS .....	79
2.8 REFERENCES .....	80
2.9 FIGURES.....	85
CHAPITRE 3. ARTICLE 2 .....	109
3.1 RÉSUMÉ .....	110
3.2 ABSTRACT.....	111
3.3 INTRODUCTION .....	112
3.4 RESULTS .....	115
3.5 DISCUSSION .....	126
3.6 MATERIALS AND METHODS.....	133
3.7 ACKNOWLEDGEMENTS.....	139
3.8 REFERENCES .....	140
3.9 FIGURES.....	144
CHAPITRE 4. DISCUSSION GÉNÉRALE .....	168
RÉFÉRENCES .....	177

# LISTE DES TABLEAUX

## CHAPITRE 1

Table 1.1: Résumé des différents phénotypes observés dans le système hématopoïétique chez 3 différentes souris mutantes pour le gène Ikaros .....	41
---	----

## CHAPITRE 3

Table 3.1: List of antibodies used in this study.....	107
---	-----

Table 3.2: List of RT-PCR primers used in this study.....	108
---	-----



# LISTE DES FIGURES

## CHAPITRE 1

Figure 1.1	Organisation laminaire de la retine .....	15
Figure 1.2	Représentation de l'intégration de la cellule de Müller dans la rétine.....	17
Figure 1.3	Représentation de l'organisation des astrocytes en relation avec les vaisseaux sanguins et les faisceaux d'axones des cellules ganglionnaires .....	18
Figure 1.4	Schéma représentant la morphologie des photorécepteurs bâtonnets et cônes ainsi que les structures qui les composent .....	19
Figure 1.5	Schéma représentant le développement de l'œil et la formation des vésicules optiques au cours du temps à partir du tube neural.....	20
Figure 1.6	Phases du cycle cellulaire et production de la diversité cellulaire au sein de la rétine .....	21
Figure 1.7	Multipotentialité des progéniteurs .....	22
Figure 1.8	Contribution des différents facteurs de transcription dans la spécification cellulaire.....	27
Figure 1.9	Cascade de facteurs de transcription importants dans la spécification des cellules Horizontales et Amacrines.....	31

Figure 1.10	Modèle de compétence cellulaire au cours du développement de la rétine.....	33
Figure 1.11	Production de la diversité neuronale chez la drosophile.....	36
Figure 1.12	Représentation schématique des différentes isoformes d'Ikaros .....	38
Figure 1.13	Modèle schématique pouvant expliquer l'activation de l'expression génique par Ikaros .....	42
Figure 1.14	Modèle schématique pouvant expliquer la répression de l'expression génique par Ikaros .....	43
Figure 1.15	Représentation de la structure à longues chaînes hélicoïdales de CNTF et LIF ainsi que leurs récepteurs respectifs.....	48
Figure 1.16	Voie de signalisation JAK-STAT induite par la liaison du CNTF ou LIF à leurs récepteurs .....	51
Figure 1.17	Étapes dans la différenciation des photorécepteurs bâtonnets.....	52

## CHAPITRE 2

Figure 2.1	Ikaros expression during retinal development .....	86
Figure 2.2	Ikaros expression in the mature retina .....	88
Figure 2.3	Ikaros misexpression in late mouse RPCs increases production of early born cell types .....	90

Figure 2.4	Ikaros inactivation reduces the generation of early-born cell types in the mouse retina .....	92
Figure 2.5	Ikaros inactivation reduces proliferation at early stages of mouse retinal development.....	94
Figure 2.6	Ikaros inactivation leads to a specific deficit in early-born cell types in the adult mouse retina.....	96
Figure 2.7	Proposed model for the regulation of temporal competence by Ikaros .....	98
Figure 2.8	Retroviral lineage analysis.....	100
Figure 2.9	Ikaros misexpression leads to photoreceptor cell death.....	102
Figure 2.10	Ikaros family members are expressed in the developing mouse retina .....	104
Figure 2.11	Ikaros Inactivation does not increase cell death in the developing retina.....	106

## CHAPITRE 3

Figure 3.1	Exposure to CNTF during retinal development <i>in vivo</i> leads to photoreceptor deficit in the mature retina, but does not affect bipolar cell production. ....	145
Figure 3.2	The CNTF/LIF signalling pathway regulates the timing of rhodopsin expression <i>in vivo</i> .....	147
Figure 3.3	Overexposure to CNTF during retinal development <i>in vivo</i> leads to increased retinal cell death.....	148

Figure 3.4	CNTF overexposure during retinal development <i>in vivo</i> induces cell death of postmitotic cells .....	151
Figure 3.5	CNTF-induced retinal cell death is abolished by prior exposure to the LIF05 dominant-negative ligand .....	153
Figure 3.6	Blocking the CNTF/LIF signalling pathway during retinal development <i>in vivo</i> reduces naturally occurring programmed cell death.....	155
Figure 3.7	The development of photoreceptor-only clones is specifically affected by manipulation of the CNTF/LIF signalling pathway during retinal development <i>in vivo</i> .....	157
Figure 3.8	CNTF/LIF signaling pathway causes apoptosis by regulating NO production through neuronal (n) and endothelial (e) Nitric Oxide Synthase (NOS) expression .....	159
Figure 3.9	AdLacZ-infected eyes express $\beta$ -Gal and do not show tissue loss .....	161
Figure 3.10	CNTF exposure during retinal development does not increase Müller cell genesis.....	163
Figure 3.11	Quantitative analysis of the proportion of TUNEL-positive cells and BrdU-positive cells at P3 .....	165
Figure 3.12	Semi-quantitative RT-PCR analysis of Bak and Bax mRNA levels in P3 retinas from eyes injected at P2 with r $\beta$ -Gal or rrCNTF.....	167

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ARNm:	ARN messenger
aFGF:	acidic Fibroblast Growth Factor
BDNF:	Brain-Derived Neurotrophic Factor
bFGF:	basic Fibroblast Growth Factor
Cas	Castor
ChAT	Choline Acetyl Transferase
CLC:	Cardiotrophin-like Cytokine
CLF:	Cytokine-like Factor 1
CNTF:	Ciliary Neurotrophic Factor
CNTRF $\alpha$ :	Ciliary Neurotrophic Factor Receptor alpha
CPR:	Cellule progénitrices de la rétine
CT-1	Cardiotrophin 1
DN:	Dominant négatif
DZ:	Doigt de zinc
EGF:	Epidermal Growth Factor
ENU:	N-Ethyl-N-nitroso-urée
GCL:	Couche des cellules Ganglionnaires
GDF11:	Growth and Differentiation factor 11
GFAP :	Glial Fibrillary Acidic Protein
gp130:	Glycoprotéine 130
Hb	Hunchback
HC-PC	Hétérochromatine Pericentromérique
HDAC	Histone Deacetylase
LIF05:	Mutant Dominant négatif de Leukemia inhibitory factor
Ik:	Ikaros
INL:	Couche nucléaire interne
IPL:	Couche plexiforme interne
JAK:	Janus Kinase
KCD:	Kinase Cycline-dépendante
Kr	Krüppel
LIF:	Leukemia Inhibitory Factor
LIFR $\beta$ :	Leukemia Inhibitory Factor Receptor beta
Math3 :	Mammalian atonal homologue 3
Math5:	Mammalian atonal homologue 5
Nb :	Neuroblaste
NGF:	Nerve Growth Factor

NO	Oxyde nitrique
eNOS	Isoforme endothéliale de la sythase d'oxyde nitrique
nNOS	Isoforme neuronale de la sythase d'oxyde nitrique
NP:	Neuropoetin
ONBL:	Couche neuroblastique externe
ONL:	Couche nucléaire externe
OPL:	Couche plexiforme externe
OsM:	Oncostatin M
Plstc:	Plastic
Ptn:	Pleiotrophin
Rho:	Rhodpsine
RGC:	Cellule Ganglionnaire
RPE:	Epithélium Pigmentaire Rétinien
Shh:	Sonic Hedgehog
SNC:	Système Nerveux Central
STAT:	Signal of Transducer and Activator of Transcription
TGFalpha:	Tumor Growth Factor alpha
TrkA:	Tyrosine Kinase A

# CHAPITRE 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

## 1.1 LA RETINE : MODÈLE DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

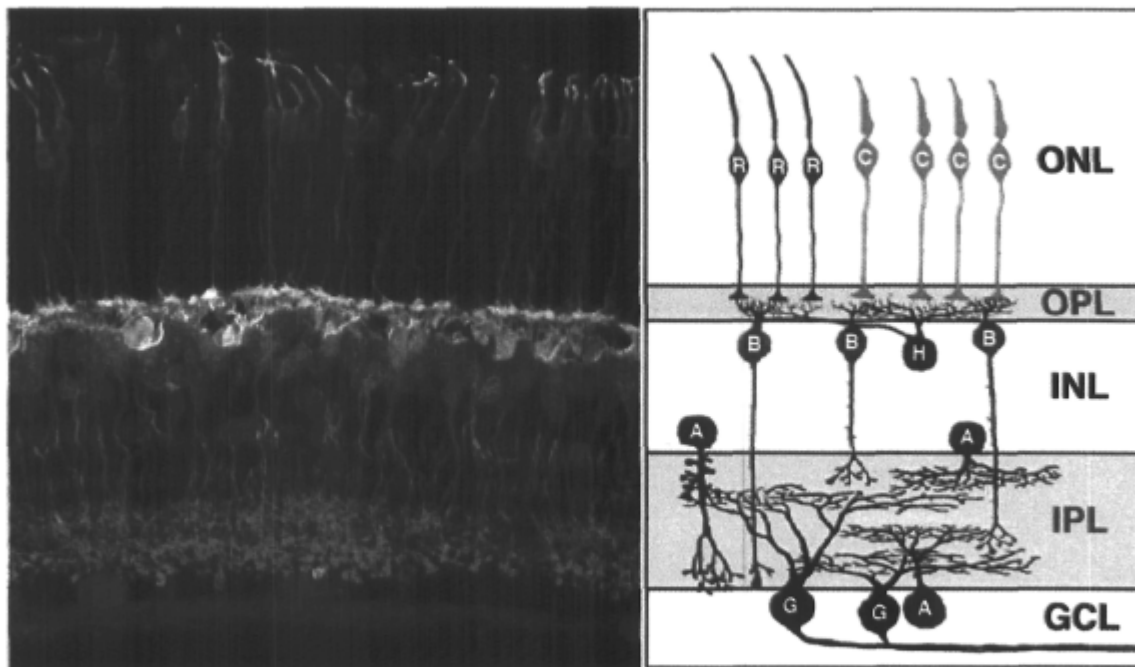
Les principaux enjeux en biologie développementale depuis plusieurs années sont de comprendre premièrement comment la diversité cellulaire est générée au sein de l'organisme mais aussi quels sont les facteurs intrinsèques et extrinsèques contrôlant la différenciation ainsi que la survie de chacun de ces types cellulaires. On en sait encore très peu sur le développement du système nerveux central (SNC) comparativement aux autres régions du corps humain. Probablement parce qu'il est beaucoup moins accessible et beaucoup plus complexe que tous les autres systèmes.

La rétine comparativement aux autres régions du SNC est beaucoup plus accessible. Comprendre son organisation a été l'objectif de plusieurs scientifiques au cours des 100 dernières années. Grâce aux premières descriptions anatomiques de Ramon y Cajal (1892) de chacun des types cellulaires composant la rétine, nous avons pu, au cours des années, mieux comprendre son organisation et son fonctionnement. Ce qui a permis qu'aujourd'hui on en connaisse beaucoup plus sur le développement de la rétine que tout autre partie du SNC. Probablement parce qu'elle est responsable d'un des sens les plus importants et fascinants chez l'être humain, mais aussi en raison de son accessibilité, ce qui fait d'elle un modèle intéressant pour l'étude du développement du SNC. L'organisation cellulaire très hiérarchisée de la rétine rend toute perturbation facilement décelable par simple coloration histologique. De plus, il existe de nombreux marqueurs antigéniques permettant de visualiser les différentes classes de cellules qui la compose (Haverkamp and Wässle, 2000).

### 1.1.1 Organisation anatomique de la rétine

La rétine est l'organe neurosensoriel qui permet la réception et la transformation de l'information visuelle et sa transmission sous la forme du message nerveux jusqu' aux structures cérébrales supérieures. Ces différentes étapes sont possibles grâce à une organisation cellulaire stratifiée bien précise. Cette organisation permet à la fois la réception et la transmission de l'information visuelle mais également sa modulation.

Sur une coupe transversale de rétine, on distingue une alternance de couches nucléaires et plexiformes contenant les terminaisons synaptiques (Figure 1). La couche nucléaire externe (ONL) contient les photorécepteurs, cônes (C) et bâtonnets (R) tandis que la couche nucléaire interne (INL) contient les interneurones soit les cellules bipolaires (B), horizontales (H) et amacrines (A). En contact avec l'humeur vitrée, une couche nucléaire plus mince regroupe les noyaux des cellules amacrines déplacées et ganglionnaires (GCL).





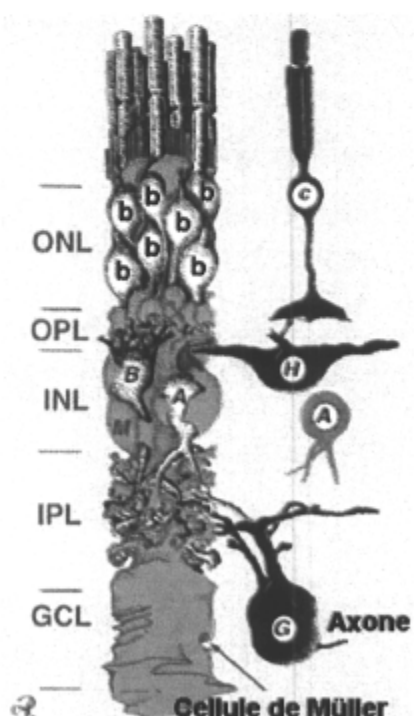
**Figure 1 : Organisation laminaire de la rétine.** (A) Coupe transversale de rétine adulte montrant la stratification des corps cellulaires (ONL, INL, GCL) ainsi que leurs terminaisons synaptiques (OPL et IPL). Les photorécepteurs cônes (violet) sont marqués avec un anticorps dirigé contre l'arrestine des cônes. Les cellules horizontales, amacrines et ganglionnaires sont marqués pour la calbindine (Rouge) et les cellules bipolaires expriment une protéine fluorescente verte (GFP) sous le contrôle des éléments régulateurs du gène mGluR6. (B) Représentation schématique des différents types de neurones et leurs projections chez la rétine adulte. Photorécepteurs bâtonnets (R) et cônes (C); Cellules horizontales (H); Cellules Bipolaires (B); Cellules Amacrines (A); Cellules ganglionnaires (G). (From Morgan et al. Nature Neurosci. 2006)

Les cellules bipolaires traitent directement ou indirectement via les cellules horizontales et amacrines l'information transmise par les photorécepteurs et transmettent cette information nerveuse vers les cellules ganglionnaires. Les cellules horizontales possèdent une arborisation dendritique très étendue qui ne se dirige que vers la couche plexiforme externe (OPL). Elles participent à la modulation de l'information lumineuse transmise par les photorécepteurs, par le phénomène d'inhibition latérale. La plupart des cellules amacrines sont situées dans la partie interne de la couche nucléaire interne. Cependant, certaines cellules appelées cellules amacrines déplacées sont retrouvées dans la GCL. Bien que les cellules amacrines aient toutes la même fonction, soit de moduler les signaux dans la couche plexiforme interne (IPL), leurs morphologies et leurs caractéristiques neurochimiques ont conduit à en différencier jusqu'à cinquante types différents (Kolb and Nelson, 1981; Kolb et al., 2002).

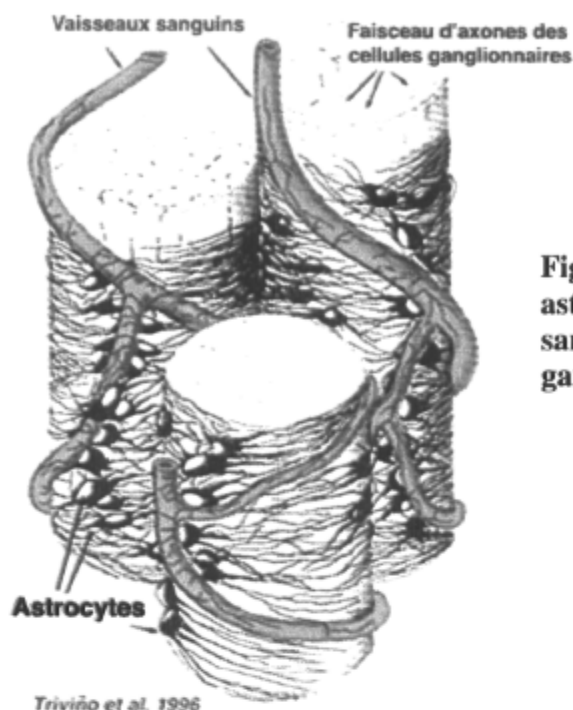
Les cellules ganglionnaires collectent les informations visuelles qui ont traversé toute la rétine, et les transmettent au cerveau. Leurs corps cellulaires projettent leurs dendrites dans la couche plexiforme interne où elles forment des synapses avec les cellules bipolaires et les cellules amacrines. Leurs axones s'unissent pour former le nerf optique qui transmet l'information visuelle au cerveau pour être analysée.

La rétine possède également des cellules gliales: des cellules microgliales résidentes dans les couches plexiformes, des astrocytes (As) dans la zone des cellules ganglionnaires, et des

cellules gliales radiaires, ce qui est assez rare dans le système nerveux central adulte : les cellules de Müller, (M). Les cellules de Müller sont les principales cellules gliales de la rétine. Alors que leurs corps cellulaires se situent dans la couche nucléaire interne, elles traversent la rétine complètement (Figure 2). Leurs prolongements vont entourer les corps cellulaires, ainsi que les synapses des neurones, permettant leur isolement électrique et neurochimique. Ces prolongements vont également entourer les vaisseaux sanguins participant ainsi à la barrière hémato-rétinienne. La membrane limitante externe est formée par les extrémités distales des cellules de Müller autour des photorécepteurs. Elles communiquent entre elles via des jonctions « gap ». L'extrémité basale couvrant la totalité de la rétine est appelée le « pied » et leur interaction forme la délimitation avec l'humeur vitrée. Les astrocytes en moins grand nombre que les cellules de Müller, ont une forme en étoile et sont principalement présents dans la couche des cellules ganglionnaires et la couche plexiforme interne. Leurs prolongements entrent en contact avec les cellules ganglionnaires et les vaisseaux sanguins (Figure 3).



**Figure 2 : Représentation de l'intégration de la cellule de Müller au sein de la rétine.** (c: cône, b: bâtonnet, h: cellules horizontales, B: cellules bipolaires, A: cellules amacrines, M: cellule de Müller, G: cellule ganglionnaire) D'après Reichenbach et al. (1991)



**Figure 3 : Représentation de l'organisation des astrocytes en relation avec les vaisseaux sanguins et les faisceaux d'axones des cellules ganglionnaires. (Triviño et al. 1996)**

### 1.1.2 Phototransduction

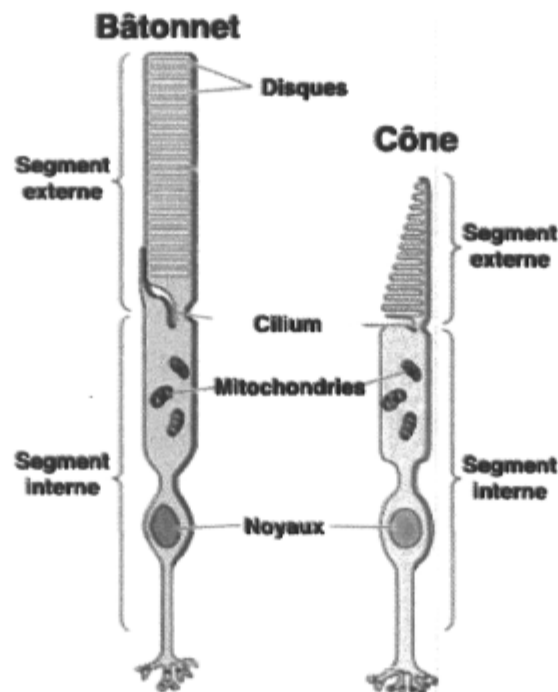
Les photorécepteurs sont des cellules hautement spécialisées qui convertissent la lumière en signal nerveux, un phénomène appelé phototransduction. Il existe deux types de photorécepteurs possédant une morphologie et des fonctions relativement différentes: les bâtonnets et les cônes.

Les photorécepteurs possèdent une structure qui leur est propre et sont composés d'un segment interne contenant les organelles et d'un segment externe composé de replis membranaires appelés disques, contenant les pigments sensibles à la lumière. Les segments internes et externes sont rattachés au niveau d'une structure étroite appelé le cilium (Figure 4).

C'est la forme du segment externe qui différencie les bâtonnets des cônes. Au niveau morphologique, le segment externe des bâtonnets a une forme cylindrique allongée

contenant plusieurs disques et entourés d'une membrane plasmique tandis que celui des cônes est plutôt court et contient peu de disques qui ne sont pas entourés par une membrane. Cette caractéristique fait que les bâtonnets sont environ mille fois plus sensible à la lumière que les cônes. Cependant, seul les cônes sont sensibles aux couleurs c'est pourquoi ils sont actifs en condition diurne tandis que les bâtonnets le sont davantage en condition nocturne. Les photorécepteurs cônes sont donc responsables de la vision en conditions photopiques, colorée, fine et centrale. Les bâtonnets quant à eux sont responsables de la vision en conditions scotopique, en noir et blanc, de la perception des mouvements et plus particulièrement du champ visuel périphérique.

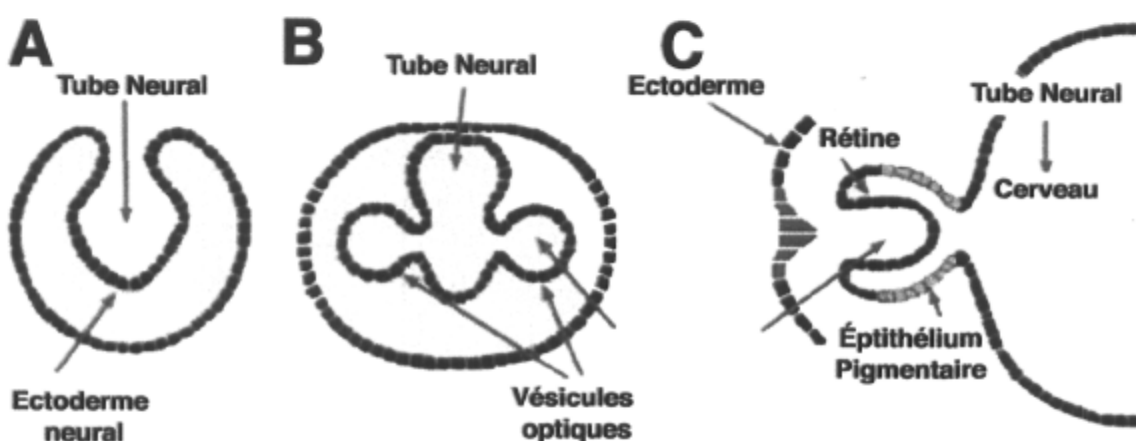
La phototransduction est donc possible grâce au pigments présents dans les disques. Ces pigments changent de conformation lorsqu'ils sont frappés par la lumière et induisent une cascade neurochimique ayant pour produit final un potentiel d'action encodant l'information visuelle.



**Figure 4 : Schéma représentant la morphologie des photorécepteurs bâtonnets et cônes ainsi que les structures qui les composent. (ERPI, C., ed. 2005.)**

## 1.2 DÉVELOPPEMENT DE LA RÉTINE

Comme l'ensemble du SNC, la rétine origine du tube neural et va alors être générée suite à l'invagination du neuroépithélium. Deux structures nommées vésicules optiques se formeront de part et d'autre du tube neural. La partie interne deviendra alors la rétine tandis que la partie externe sera destinée à devenir l'épithélium pigmentaire (RPE) (Figure 5). Cette monocouche de cellules neuroépithéliales proliféreront et se différencieront de manière ordonnée et précise de façon à produire la diversité cellulaire composant la rétine.



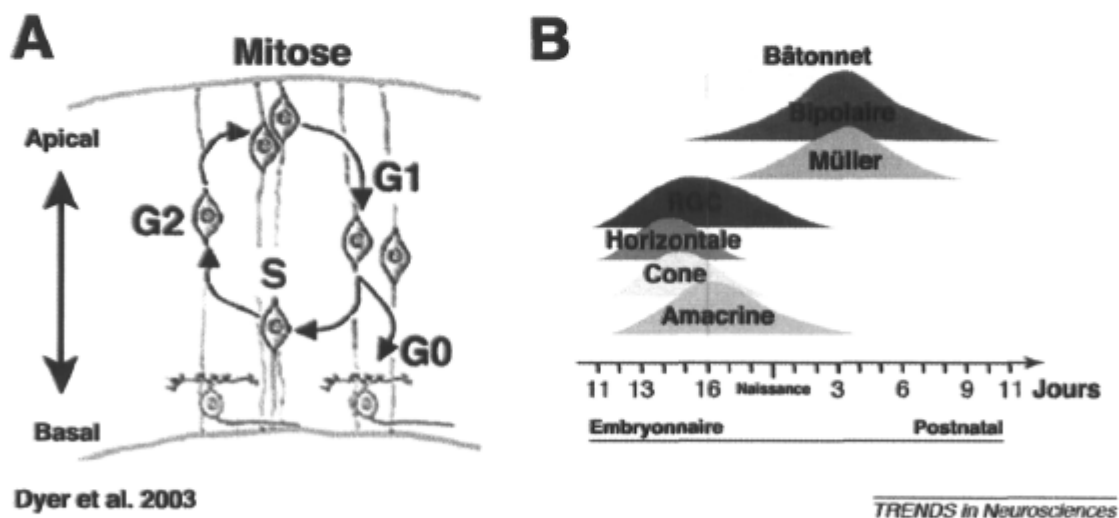
**Figure 5 : Schéma représentant le développement de l'oeil et la formation des vésicules optiques au cours du temps à partir du tube neural.** A. Tout comme les autres régions du SNC, la rétine origine du tube neural. B. Dans un premier lieu, les vésicules optiques seront formées de part et d'autres du tube neural. C. Les vésicules optiques vont s'invaginer sur elles-mêmes pour former la rétine et les structures adjacentes.

(Adapté de <http://webvision.umh.es>)

### 1.2.1 Prolifération et production de la diversité cellulaire

Les cellules progénitrices de la rétine (CPRs) prolifèrent dans l'axe apico-basal où ils effectuent la phase S du cycle cellulaire au niveau basal et entre en mitose au niveau apical

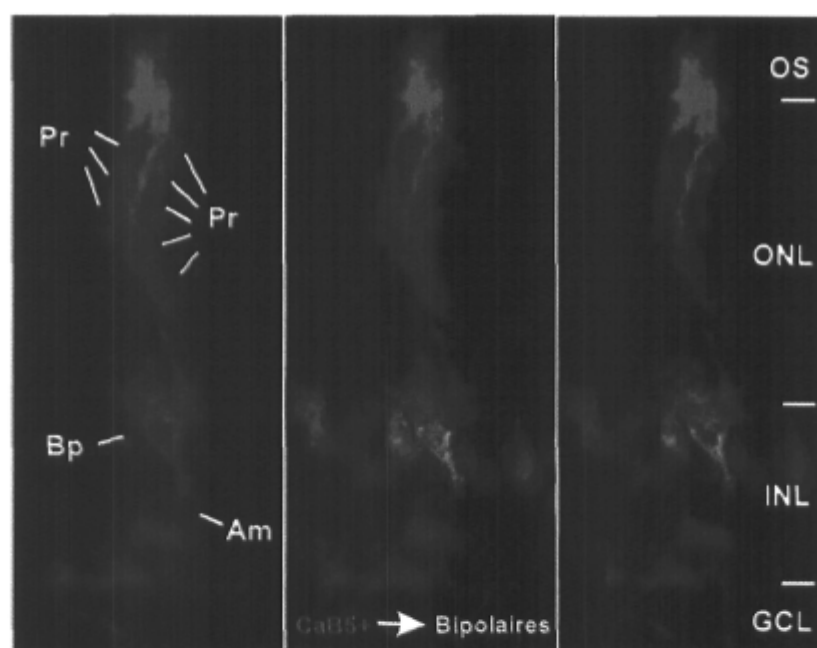
(Figure 6A). Au fur à mesure que le développement s'effectue, la proportion de cellules en division diminue tandis que la longueur du cycle quant à elle augmente, principalement en raison de l'augmentation de la longueur de la phase S (Alexiades and Cepko, 1996). La région centrale de la rétine commence à se développer avant la région périphérique. C'est pourquoi la prolifération au niveau de la région centrale cesse au jour postnatal 5-6 tandis que pour la périphérie elle se termine au jour postnatal 11 (Young, 1985). L'ensemble des différents types cellulaires sera alors produit dans un ordre bien précis mais concomittant. On les classe principalement en deux groupes, soit les cellules de type précoce, générées principalement avant la naissance et les cellules dites tardives générées après la naissance. Les cellules ganglionnaires sont produites en premier, suivies par les cellules horizontales, les photorécepteurs cônes et les cellules amacrines et plus tardivement les photorecepteurs bâtonnets, les cellules bipolaires et les cellules de Müller sont alors générées (Rapaport et al., 1996) (Figure 6B).



**Figure 6 : Phases du cycle cellulaire et production de la diversité cellulaire au sein de la rétine.** A. Représentation des différentes phases du cycle cellulaire par rapport à la position apico-basale des progéniteurs. B. Ordre de génération des différents types cellulaires en fonction du temps.

### 1.2.1.1 Multipotentialité des CPRs

Des études antérieures ont rendu possible l'identification de toute la descendance d'un progéniteur communément appelé « clone ». Le marquage unique à l'aide de traceurs et l'utilisation de vecteurs rétroviraux ont permis d'identifier la progéniture de CPRs individuelles. Les vecteurs rétroviraux infectent seulement les cellules en division et s'intègrent au génome de la cellule et par le fait même sont transmis aux cellules filles. Étant incompetents pour la réplication, ils ne peuvent donc pas infecter les CPRs environnants. Plusieurs de ces clones contenaient l'ensemble des principaux types cellulaires de la rétine suggérant que plusieurs CPRs sont multipotents (Holt et al., 1988; Turner and Cepko, 1987; Turner et al., 1990; Wetts and Fraser, 1988) (Figure 7). Cependant, il semble que certains de ces clones soient composés de seulement un type de cellule suggérant que certains soient prédestinés à générer un type cellulaire particulier.



**Figure 7. Multipotentialité des progéniteurs.** Clone infecté avec un vecteur rétroviral exprimant la phosphatase alcaline et révélé en fluorescence (Vert) composé de 8 photorécepteurs, une cellule bipolaire et une cellule amacrine. Un marquage complémentaire dirigé contre CaB5 (rouge) représente les cellules bipolaires. La rétine est contre-colorée au Hoechst de manière à révéler les noyaux (bleu).

Au cours du développement, il est important que la prolifération ainsi que la différenciation de chacun des types cellulaires soient intimement coordonnés. Ainsi le moindre débalancement a des conséquences souvent graves et irréversibles. Par exemple, si les CPRs sortent du cycle cellulaire trop tôt, la proportion de cellules de type précoce sera alors augmentée au détriment des cellules tardives. La prolifération au sein de la rétine est contrôlée en partie par des facteurs intrinsèques mais est aussi influencée par des facteurs environnementaux.

### 1.2.1.2 Facteurs intrinsèques

Il semble que certains inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes (KCD) soient importants pour la sortie du cycle cellulaire de manière à ce que la cellule enclenche le processus de différenciation. Ils ont été démontrés comme étant d'importants régulateurs du cycle cellulaire en bloquant l'activité des complexes cycline-cycline kinase dépendantes. Plus particulièrement les inhibiteurs KCD p27(Kip1) et p57(Kip2) semblent jouer un rôle majeur sur la prolifération cellulaire durant le développement rétinien (Durand et al., 1998; Dyer and Cepko, 2000). Les souris déficientes en p27(Kip1) démontrent une augmentation de la proportion en cellules mitotiques de même qu'une mort cellulaire inhabituelle particulièrement durant les derniers stades du développement. Lorsque p27(Kip1) est surexprimée dans les CPRs, une sortie précoce du cycle cellulaire est alors observée sans toutefois avoir une influence sur la proportion des différents types cellulaires. Le même effet est observé avec p57(Kip2) un peu plus tardivement au cours du développement. Il semble aussi avoir un rôle sur la spécification de la différenciation des cellules amacrines (Dyer and Cepko, 2001b). De plus, durant le développement embryonnaire, p27(Kip1) et p57(Kip2) sont exprimés dans les progéniteurs mais dans différentes populations démontrant que les CPRs représentent une population hétérogène (Dyer and Cepko, 2001a). Le facteur de transcription *Prospero-related homeobox transcription factor* (Prox1) semble lui aussi jouer un rôle au niveau de la sortie du cycle cellulaire au cours du développement embryonnaire. Les cellules dont Prox1 est inactivé divisent davantage, tandis que l'expression ectopique cause une sortie du cycle prématurée (Dyer et al., 2003). Chez les CPRs postnatales, une autre protéine, la *Retinoblastoma protein* (Rb) semble être nécessaire pour la sortie du cycle



cellulaire et la différenciation en photorécepteurs. En absence de cette protéine, les CPRs continuent de proliférer et la différenciation en photorécepteur est alors impossible (Zhang et al., 2004). Rb inhiberait la progression du cycle cellulaire lorsqu'elle est déphosphorylée. Entre autres, elle serait la cible des KCDs au cours du cycle cellulaire et serait donc inactive dans sa forme phosphorylée (Korenjak and Brehm, 2005).

### 1.2.1.3 Facteurs environnementaux

Plusieurs facteurs de croissance ont été démontrés comme ayant une influence sur la prolifération en culture. Entre autres, le transforming growth factor alpha (TGF $\alpha$ ), le basic fibroblast growth factor (bFGF), l'acidic fibroblast growth factor (aFGF) et l'epidermal growth factor (EGF) ont une influence positive sur la prolifération cellulaire (James et al., 2004; Lillien and Cepko, 1992). Il s'avère que les jeunes CPRs répondent plus aux FGFs tandis que les CPRs provenant de rétines plus tardives répondent davantage au TGF et EGF. Ils apparaît donc que les CPRs changent au cours du temps, en répondant différemment aux mitogènes présents dans la rétine principalement dû aux changements dans l'expression de leurs récepteurs. Ces facteurs sont principalement sécrétés par les cellules différenciées environnantes et par les cellules du RPE (Sheedlo and Turner, 1996). *Sonic hedgehog* (Shh) et un de ses récepteur *patched* sont exprimés dans la zone adjacente à la région proliférative. D'ailleurs, des expériences *in vivo* et *in vitro* ont démontré que la voie de Shh stimule la prolifération cellulaire dans la rétine (Jensen and Wallace, 1997; Wang et al., 2005).

## 1.2.2 Différenciation et spécification de la diversité cellulaire

La différenciation successive et ordonnée des différents types cellulaires à partir de progéniteurs multipotents fait de la rétine un excellent modèle d'étude sur la question du caractère intrinsèque ou extrinsèque de la spécification cellulaire (Cayouette et al., 2003; Cepko, 1999; Marquardt and Gruss, 2002; Turner et al., 1990).

### 1.2.2.1 Facteurs environnementaux

Au cours du développement, une multitude de changements environnementaux se produisent suite à la production des différents types cellulaires. Plusieurs facteurs sont alors sécrétés par les cellules différenciées et ont ensuite une influence sur la destinée des progéniteurs. Il semble qu'*in vivo* du moins à partir du jour embryonnaire 17 l'influence de facteurs environnementaux instructifs soit plutôt faible puisque lorsque mis en culture à basse densité, de manière à réduire l'influence des cellules différenciées environnantes, les CPRs produisent les mêmes proportions de chacun des différents types cellulaires et se divisent en moyenne le même nombre de fois (Cayouette et al., 2003). Cependant, il a été démontré qu'il existe des boucles de rétroaction négative exercées par les cellules différenciées sur les progéniteurs, en particulier chez les RGCs. Lorsque des progéniteurs précoces de poulet sont cultivés en présence de cellules tardives, leur capacité à produire des RGCs est alors diminuée. Par contre, lorsque les RGCs sont absentes de ces cultures cette inhibition est abolie suggérant que certains signaux sont sécrétés par les RGCs différenciées pour empêcher leur surproduction (Gonzalez-Hoyuela et al., 2001; Waid and McLoon, 1998). Puisque les RGCs sont générés en premier lieu au cours du développement, il a été proposé qu'elles puissent influencer la production de la diversité cellulaire. Une équipe s'est penchée sur cette question et a alors généré une souris transgénique chez laquelle le gène de la diphtérotoxine a été introduit sous les éléments régulateurs du facteur de transcription Brn3b démontré comme essentiel pour la différenciation des RGCs et exprimé seulement par ce type cellulaire. Chez ces souris transgéniques, les RGCs meurent aussitôt qu'elles sont générées produisant alors une rétine complètement déplétée en RGCs. La rétine de ces souris démontre une proportion de chacun des types cellulaires similaire aux souris sauvages, cependant elle présente une diminution de la prolifération (Mu et al., 2005b). Ces résultats suggèrent donc que les RGCs exercent une influence positive sur la prolifération des CPRs mais ne semble pas influencer la production de la diversité cellulaire. De façon à déterminer comment cette boucle de rétroaction influence la production des RGCs, des progéniteurs exprimant la GFP sous le contrôle des éléments régulateurs de *ath5*, un facteur de transcription nécessaire à la production des RGCs, ont été visualisés en microscopie en

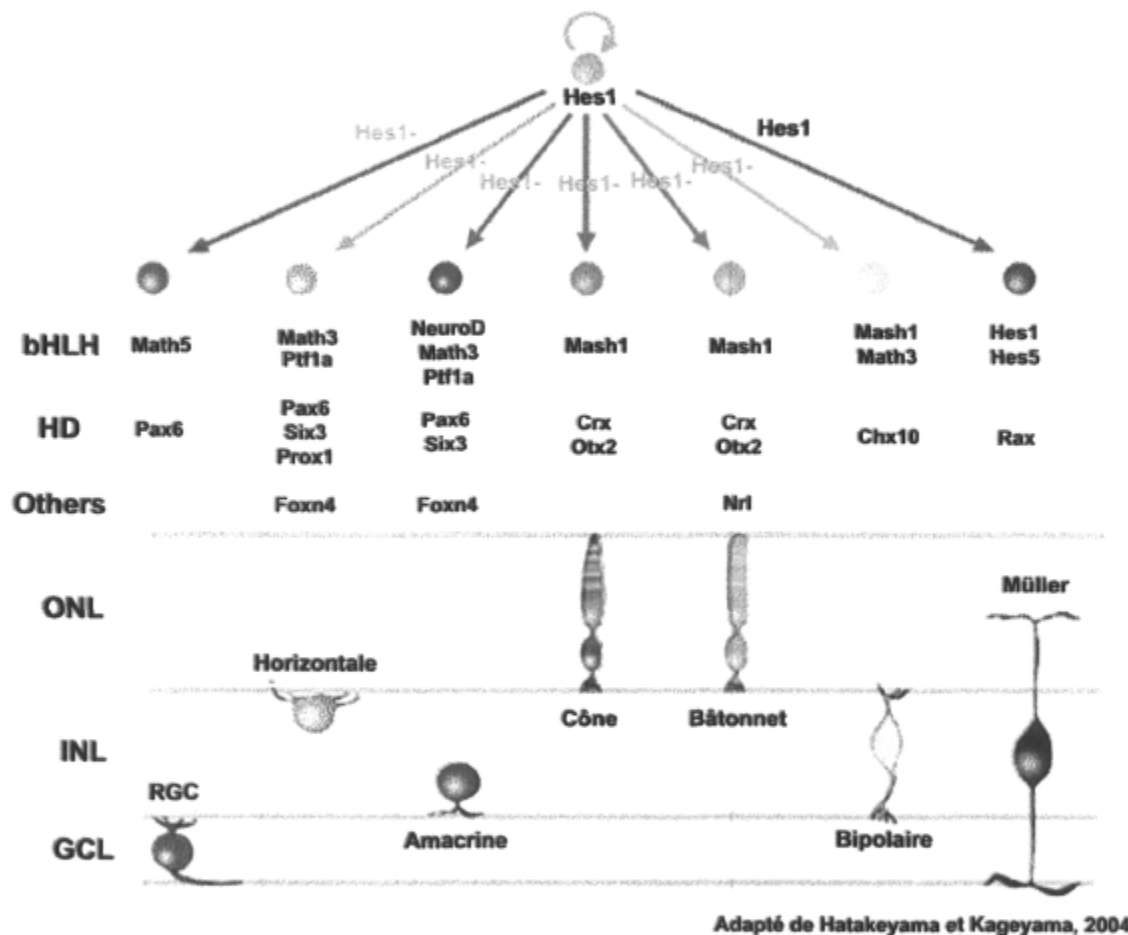
temps réel chez le poisson zébre. Durant le développement normal, les progéniteurs ath5-positifs divisent invariablement une seule fois pour produire une RGC et un autre type de cellule. Toutefois, lorsque transplantés dans un environnement déplété en RGCs, ces progéniteurs se divisent et génèrent fréquemment deux RGCs, démontrant que la spécification cellulaire est modulable par des signaux environnementaux (Poggi et al., 2005).

Plusieurs études se sont d'ailleurs intéressées à ces signaux environnementaux inhibiteurs. Entre autres, il a été démontré que chez la souris, la voie de *Sonic hedgehog* (Shh) est particulièrement impliquée dans ce phénomène. Dans la rétine, Shh est exprimé chez les RGCs différenciées et une étude a d'ailleurs démontrée que la déplétion conditionnelle de Shh induit une diminution rapide du nombre CPRs en provoquant une sortie précoce du cycle cellulaire et par le fait même une différenciation prématurée favorisant la production de RGCs (Wang et al., 2005). Ces résultats suggèrent que la voie de Shh participe à la boucle de rétroaction négative exercée par les RGCs et il semble aussi qu'elle soit requise pour une organisation laminaire appropriée de la rétine chez les vertébrés en permettant la production normale des cellules de Müller (Dakubo and Wallace, 2004; Wang et al., 2002b).

Cette influence négative de l'environnement a aussi été démontrée pour avoir un effet sur l'aspect temporel de la différenciation. Le facteur de croissance 11 (GDF11) est un facteur important pour la genèse des RGCs. Des études suggèrent qu'il agisse en contrôlant la fenêtre de temps où les progéniteurs sont compétents à générer les RGCs (Kim et al., 2005). De plus, certains autres signaux environnementaux sont des ligands de la voie de Notch. Lorsque cette voie est stimulée chez les CPRs de rat, la production de cellule de Müller est augmentée au détriment des neurones. Il semble donc que la voie de Notch soit particulièrement importante dans le choix de la différenciation gliale vs neuronale (Furukawa et al., 2000). Il a d'ailleurs été suggéré que cet effet soit médié via l'interférence avec des facteurs de type bHLH démontrés comme étant importants pour la différenciation neuronale (Perron and Harris, 2000). Ces facteurs de transcription ont un rôle majeur quant au caractère intrinsèque contrôlant la production des différents types de neurones.

### 1.2.2.2 Facteurs intrinsèques

Il existe principalement deux groupes majeurs de facteurs de transcription qui influencent la spécification cellulaire dans la rétine : *basic helix-loop-helix* (bHLH) et *homeodomain* (HD) (Figure 8). Ces facteurs de transcription se lient à des séquences régulatrices spécifiques sur l'ADN pour activer ou réprimer l'expression de certains gènes.



**Figure 8 : Contributions de différents facteurs de transcription dans la spécification cellulaire.** Les neurones en différenciation perdent l'expression de Hes1. Les facteurs de transcription bHLH et HD avec la contribution d'autres types de facteurs déterminent la spécification de chacun des types de neurones. Les cellules qui continuent d'exprimer Hes1 durant la retinogénèse deviennent alors le dernier type cellulaire à être spécifié, soit les cellules de Müller. (Figure adaptée de : (Hatakeyama and Kageyama, 2004))

Durant le développement, il est essentiel de maintenir un niveau de progéniteurs jusqu'aux stades tardifs du développement de manière à produire un nombre suffisant de chacun des différents types cellulaires. Il a été démontré que le facteur de transcription de type bHLH *Hairy and Enhancer of Split genes* (Hes1), qui est un répresseur de l'activité transcriptionnelle, joue un rôle indispensable dans le maintien de la production des progéniteurs en inhibant la différenciation neuronale (Tomita et al., 1996). Hes1 est exprimé initialement dans les vésicules optiques et plus tard son expression est maintenue dans les progéniteurs de la zone ventriculaire. L'expression ectopique du facteur Hes1 chez les CPRs embryonnaires inhibe la différenciation neuronale et favorise la production de progéniteurs. Inversement, les souris dont le gène Hes1 a été inactivé, prolifèrent moins et démontrent une microphthalmie (Tomita et al., 1996). Un autre membre de la même famille Hes5, semble lui aussi participer au maintien de la production de progéniteurs. Hes1 et Hes5 sont tous deux essentiels à la signalisation de Notch. Lorsque Hes1 et Hes5 sont inactivés chez la même souris, aucune formation des vésicules optiques n'est observée, suggérant qu'ils agissent synergiquement au cours du développement (Ohtsuka et al., 1999).

### ***Spécification des cellules de Müller***

Chez la rétine postnatale, Hes1 et Hes5 sont encore exprimés, mais ne sont présents seulement que chez les cellules de Müller, parmi les derniers types cellulaires à être produit au cours du développement de la rétine. Leur expression est transitoire puisqu'elle disparaît au jour postnatal 10. L'expression ectopique de Hes1 ou Hes5 chez la rétine postnatale induit production de cellules de Müller (Furukawa et al., 2000; Hojo et al., 2000). Le facteur de type HD Rax (Rx) joue un rôle similaire. Rax est connu pour son rôle dans la prolifération et le maintien de la production des progéniteurs. Cependant à des stades plus tardifs, il induit lui aussi la production de cellules de Müller (Furukawa et al., 1997a; Mathers et al., 1997). Il a été proposé que les cellules de Müller, qui sont morphologiquement très similaires aux progéniteurs, pourraient avoir un potentiel prolifératif et pourraient permettre la neurogénèse et la gliogénèse au sein de la rétine. Il a été suggéré que c'est probablement pour cette raison que l'expression de Hes1 et Hes5 demeure au sein des CPRs durant la rétinogénèse et finalement exprimé par le dernier type cellulaire produit au cours du développement.

### ***Spécification neuronale***

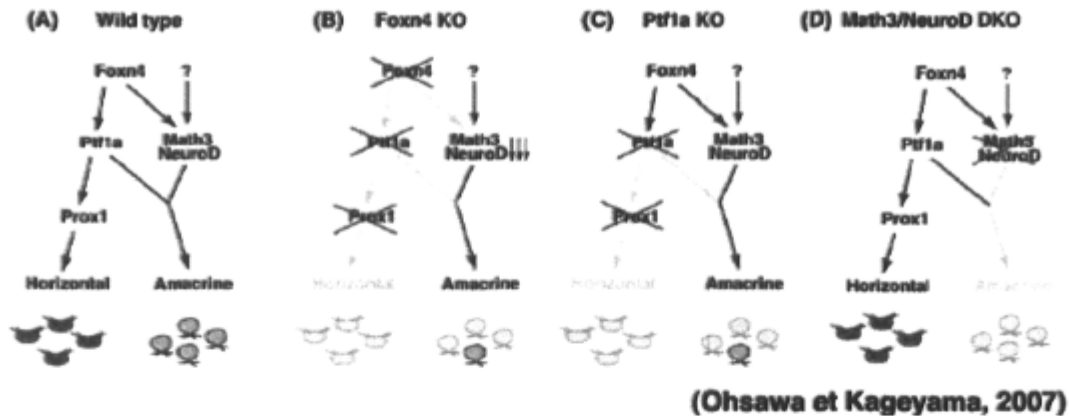
D'autres facteurs de type bHLH sont des activateurs de l'activité transcriptionnelle et sont connus pour promouvoir la différenciation neuronale. Plus particulièrement les facteurs *Mammalian achaete-scute homolog* (Mash1), *Mammalian atonal homologs* (Math3, Math5) et NeuroD sont exprimés dans la zone ventriculaire au cours du développement et sont plus tard exprimés chez différents types de neurones différenciés. Lorsque ces facteurs sont exprimés ectopiquement, ils induisent la production de neurones (Hatakeyama et al., 2001b). Même s'ils sont exprimés dans les neurones différenciés, l'expression ectopique n'est souvent pas suffisante pour induire ce type cellulaire particulier. Par exemple le facteur Mash1, même s'il est exprimé chez les cellules bipolaires, lorsqu'exprimé ectopiquement, induit principalement la production de photorécepteurs (Bae et al., 2000). Ce qui suggère que d'autres facteurs additionnels sont nécessaires à la spécification des différents types cellulaires.

### ***Spécification des cellules Bipolaires***

Il a été démontré que les facteurs de type bHLH Mash1 et Math3 ainsi que le facteur de type HD Chx10 sont requis pour la spécification des cellules bipolaires. L'expression ectopique conjointe de ces trois facteurs dans les CPRs induit la production de cellules bipolaires (Hatakeyama et al., 2001a). Par contre, l'expression de Mash1 ou de Math3 seul induit la production de photorécepteurs, tandis que l'expression de Chx10 induit la production de cellules de Müller (Hatakeyama et al., 2001a). De plus, les souris dont les gènes Mash1 et Math3 ont été simultanément inactivé démontrent une absence complète en cellules bipolaires au profit des cellules de Müller, tandis que l'inactivation de Chx10 démontre aussi une absence de cellules bipolaires mais sans augmentation compensatoire (Burmeister et al., 1996; Tomita et al., 2000). Il semble donc que ces facteurs aient des rôles distincts dans la spécification des cellules bipolaires.

### *Spécification des cellules Amacrines et Horizontales*

Il existe deux facteurs de type bHLH exprimés chez les cellules amacrines : Math3 et NeuroD. Ces facteurs sont exprimés transitoirement chez les cellules amacrines en différenciation (Morrow et al., 1999; Tomita et al., 2000). Les souris dont le gène Math3 ou NeuroD est inactivé ne présentent pas de diminution significative du nombre de cellules amacrines produites. Cependant, lorsque les deux gènes sont inactivés à la fois, une réduction importante est alors observée et cela semble fait au profit des cellules ganglionnaires (Inoue et al., 2002). L'expression ectopique de chacun de ces facteurs n'est pas suffisante pour induire la spécification en cellules amacrines suggérant que d'autres facteurs de transcription sont nécessaires. Les facteurs de transcription de type HD *Paired box gene 6* (Pax6) et *sine oculis homeobox homolog 3* (Six3) sont aussi exprimés par les cellules amacrines, mais tout comme Math3 et NeuroD, l'expression ectopique n'est pas suffisante pour induire leur production (Inoue et al., 2002). Par contre, la coexpression de NeuroD ou Math3 avec Pax6 ou Six3 est suffisante pour augmenter significativement la production de cellules amacrines (Inoue et al., 2002). Tout comme la spécification d'autres types cellulaires, la coexpression de facteurs bHLH et HD semble être nécessaire pour la spécification cellulaire. Comme pour les cellules amacrines, l'expression des facteurs de type HD Pax6 ou Six3 avec le facteur bHLH Math3 est suffisante pour induire la production de cellules Horizontales. Cependant, les souris Math3 mutantes présentent un nombre normal en cellules horizontales suggérant qu'un autre facteur est capable de compenser au cours du développement. Ce facteur pourrait bien être le facteur HD Prox1 qui est exprimé par les cellules horizontales en différenciation mais aussi par certaines cellules bipolaires et un sous-type d'amacrines. Chez les mutants Prox1, les cellules horizontales sont absentes tandis que l'expression ectopique chez les CPRs postnataux en induit la production (Dyer et al., 2003). Deux autres facteurs en amont de Prox1, le *winged helix/forkhead transcription factor* (Foxn4) et le *Pancreas specific transcription factor 1a* (Ptf1a) démontrent le même phénotype lorsqu'ils sont inactivés (Fujitani et al., 2006; Li et al., 2004) (Figure 9). Mais seulement Prox1 est à la fois nécessaire et suffisant pour la spécification des cellules horizontales. En effet, l'expression ectopique de Foxn4 ou Ptf1a induit la production de cellules amacrines plutôt que horizontales (Fujitani et al., 2006; Li et al., 2004).



**Figure 9. Cascade de facteurs de transcription importants dans la spécification des cellules Horizontales et Amacrines.** A. Facteurs de transcription importants dans le contrôle de la production des cellules Horizontales et Amacrines chez la souris sauvage. B, C. L'inactivation de Foxn4 (B) ou Ptf1a (C) mène à une absence de cellules Horizontales et diminution des cellules Amacrines. D. Lorsque Math3 et NeuroD sont inactivés, aucune production de cellules Amacrines n'est observée mais les cellules Horizontales sont produites normalement. (Ohsawa and Kageyama, 2007)

### *Spécification des RGCs*

Très tôt au cours du développement, le facteur bHLH Math5 joue un rôle majeur dans la spécification des RGCs (Yang et al., 2003). Math5 semble activer directement l'expression de *Pou domain transcription factors*. Particulièrement Brn3b démontré comme nécessaire à la survie et la différenciation terminale des RGCs (Liu et al., 2001). Brn3a et Brn3c quant à eux semblent importants seulement pour les derniers stades de développement des RGCs puisqu'ils sont exprimés plus tard au cours du processus de différenciation (Liu et al., 2000). Chez les souris Math5 mutantes, une diminution dramatique du nombre de RGC est observée, et ce, au profit des cellules amacrines. Ce phénotype est à l'opposé des doubles mutants NeuroD/Math3 qui présentent une diminution des cellules amacrines au profit des RGCs (Inoue et al., 2002). Ces deux groupes de facteurs de transcription pourraient donc agir de façon antagoniste durant le développement pour définir la spécification des RGCs versus amacrines.



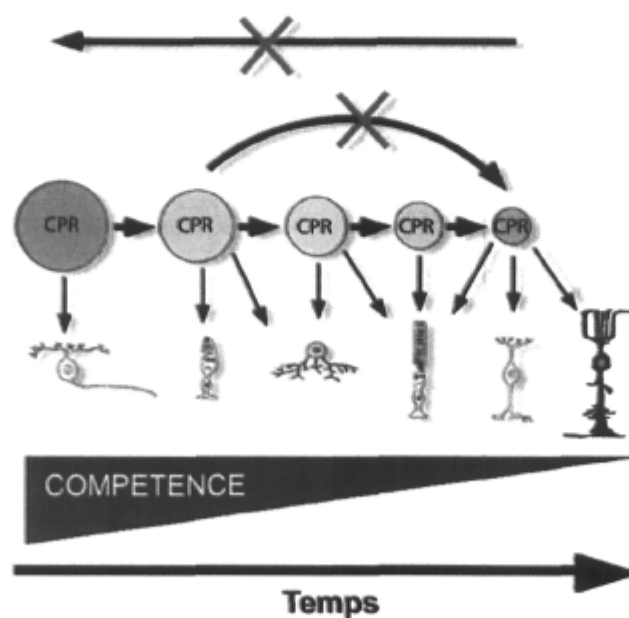
### *Spécification des Photorécepteurs*

Les facteurs *Cone-Rod homeobox* (Crx) et *Orthodenticle homolog 2* (Otx2) ont été démontrés pour être des facteurs-clés dans la spécification des photorécepteurs. Otx2 active Crx au cours du développement et est requis pour la spécification des photorécepteurs (Chen et al., 1997). En effet, l'inactivation d'Otx2 mène une inversion de la spécification des photorécepteurs vers la spécification de cellules ayant plusieurs propriétés des cellules amacrines (Nishida et al., 2003). Quant au gène Crx, lorsqu'il est inactivé, les photorécepteurs sont incapables de se différencier adéquatement et sont inaptes à former leurs segments externes (Furukawa et al., 1997b). Les photorécepteurs sont composés de deux populations différentes, les cônes et les bâtonnets. Il apparaît donc qu'ils nécessitent l'expression de facteurs de transcription différents afin de spécifier leur différenciation respective. Le facteur de transcription *neural retina leucine zipper* (Nrl) est exprimé par les photorécepteurs bâtonnets et joue un rôle majeur dans leur spécification. Lorsque Nrl est inactivé, on observe une absence totale de bâtonnets chez ces mutants compensée par la production de cônes (Mears et al., 2001). Chez ces mutants l'expression du récepteur nucléaire orphelin Nr2e3 est complètement absente. Nr2e3 active certains gènes spécifiques aux bâtonnets avec la participation de Crx et réprime l'expression de gènes spécifiques aux cônes (Chen et al., 2005; Peng et al., 2005). Le facteur de transcription Nrl pourrait contrôler la spécification entre les bâtonnets et les cônes et cet effet semble se produire via l'activation de Nr2e3.

### 1.2.3 Modèle de compétence des CPRs

Les CPRs au cours du développement interagissent avec leur environnement pour produire différents types cellulaires. Chaque type de CPRs semble aussi être contrôlé par plusieurs facteurs de transcription qui les spécifient à générer un type ou un groupe de cellules spécifiques. Des expériences *in vitro* ont démontré que le potentiel prolifératif de même que l'aspect temporel de la différenciation demeurent inchangés lorsque des CPRs

embryonnaires sont cultivés en présence d'un excès de 50 fois de CPRs postnataux. Cependant dans ces cultures mixtes, les CPRs postnataux prolifèrent moins et donnent naissance aux photorécepteurs plus tôt que ceux embryonnaires. De plus lorsque les CPRs précoces sont cultivés *in vitro*, ils peuvent générer des RGCs tandis que les CPRs plus tardifs en sont incapables dans les mêmes conditions et génèrent principalement des photorecepteurs bâtonnets. D'autre part, lorsque des CPRs tardifs sont cultivés en présence d'un excès de 20 fois de CPRs embryonnaires, ils sont incapables de revenir en arrière et de produire des types cellulaires normalement générés au niveau embryonnaire (Belliveau et al., 2000). Ce qui suggère que ce phénomène de compétence cellulaire soit en grande partie dû au caractère intrinsèque. Ainsi certains des CPRs les plus précoces sont multipotents, c'est-à-dire qu'ils sont compétents à générer l'ensemble des différents types cellulaires de la rétine. Au cours du développement, ils vont perdre leur compétence à générer les cellules dites précoces pour acquérir la compétence à générer les cellules tardives. Les CPRs changent donc au cours du temps et passent d'un degré de compétence à un autre. Ainsi, les CPRs les plus précoces sont incapables de passer directement à un stade de compétence tardif. À l'inverse, les CPRs tardifs sont incapables de revenir en arrière pour acquérir un degré de compétence leur permettant de générer des cellules précoces (Figure 10).



Watanabe and Raff, 1992  
Cepko, 1996

**Figure 10 : Modèle de compétence cellulaire au cours du développement de la rétine.** La compétence des CPRs change au cours du temps. Les CPRs précoces ont le potentiel de générer l'ensemble des différents types cellulaires. Au cours du développement, ils vont perdre le potentiel à générer des cellules précoces et vont acquérir le potentiel à générer des cellules tardives. Ce phénomène semble irréversible, puisque les CPRs tardifs sont incapables de revenir en arrière pour produire des cellules précoces. De même, il est impossible pour les CPRs précoces de passer directement aux stades tardifs.

Il est clair que l'environnement change au cours du temps en partie dû aux cellules postmitotiques en différenciation. Ces cellules pourraient donc contrôler via une boucle de rétroaction négative la production de neurones du même type et possiblement agir synergiquement avec des facteurs intrinsèques de manière à contribuer à la spécification cellulaire.

### 1.3 OBJECTIF DE TRAVAIL 1

La rétine est une région du SNC où le caractère intrinsèque semble jouer un rôle important dans la production de la diversité cellulaire. Les CPRs s'avèrent être contrôllées par plusieurs facteurs de transcription qui les spécifient à générer un type ou un groupe de cellules particulier. À la recherche d'autres modèles similaires de compétence, notre attention s'est arrêtée sur le développement des neuroblastes de la Drosophile où la diversité neuronale est produite suite à l'expression séquentielle de différents facteurs de transcription.

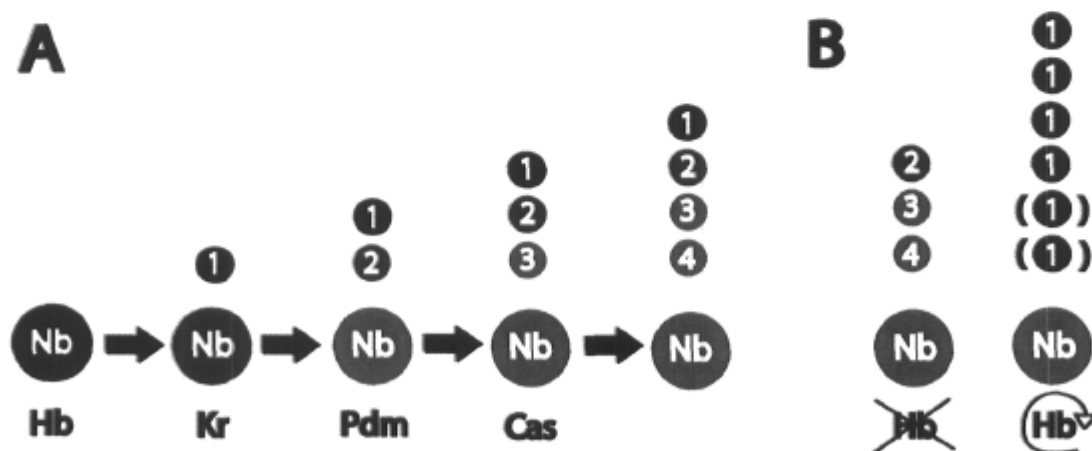
Le premier de ces facteurs de compétence à être exprimé est appelé Hunchback. Il a été démontré pour être à la fois nécessaire et suffisant pour spécifier la production de neurones précoces. L'orthologue de Hunchback chez les vertébrés est nommé Ikaros. Largement étudié au cours des dernières années pour son rôle important au niveau du système hématopoïétique, Ikaros s'avère un facteur nécessaire à la production des cellules T, B et NK. Cependant, son rôle potentiel au sein du système nerveux n'a que très peu été investigué. Il a été démontré important comme étant important dans le système neuro-endocrinien où il jouerait un rôle dans la détermination de l'axe hypothalamo-hypophysaire principalement en contôlant le relâchement de l'hormone de croissance (GH) (Ezzat et al., 2006). Dans les ganglions de la base, il serait exprimé dans les neurones striataux en développement et participerait à la différenciation des neurones enképhalinerigiques (Agoston et al., 2007).

Des résultats préliminaires dans le laboratoire suggèraient qu'il était exprimé de façon temporelle dans la rétine. Nous avons donc décidé de mieux caractériser son expression et de procéder à des expériences de gain et perte de fonctions. Comme différentes souris mutantes pour le gène Ikaros avait été générées précédemment, ce fut un avantage pour nous dans l'étude de la perte de fonction d'Ikaros dans la rétine. Pour le gain de fonction, nous avons exprimé Ikaros dans les progéniteurs à l'aide de vecteurs rétroviraux.

Les résultats de ces travaux sont présentés dans le Chapitre 2 et ont été soumis récemment pour publication.

## 1.4 MODELE DE COMPETENCE CHEZ LA DROSOPHILE

Le développement du système nerveux de la *Drosophile* est plutôt bien défini en raison de sa simplicité si on le compare aux vertébrés. C'est pour cette raison que l'on connaît maintenant très bien la progéniture de chaque neuroblaste (Nb) au cours du temps. Il n'est pas encore très bien compris comment, en général, une cellule souche ou un progéniteur génère différents types cellulaires dans une séquence bien particulière. Chez la *Drosophile*, il a été démontré que les 30 différents Nb de chaque segment expriment séquentiellement les facteurs de transcription Hunchback (Hb), Krüppel (Kr), Pdm et Castor (Cas) soulevant ainsi la possibilité d'une horloge moléculaire interne aux neuroblastes déterminant l'ordre de génération des Cellules Mères Ganglionnaires (CMGs) (Isshiki et al., 2001). Chaque Nb exprime transitoirement chacun de ces gènes et les CMGs produites durant cette période continueront d'exprimer le gène une fois différenciée. Ainsi, les toutes premières CMGs générées continue d'exprimer Hb, tandis que les secondes exprimeront le facteur de transcription Kr suivi par Pdm et Cas. Des expériences de gain et de perte de fonctions ont démontré que Hb est à la fois suffisant et nécessaire à la production des premières CMGs tandis que Kr l'est pour les secondes CMGs. (Figure 11)



Adapté de Isshiki et al. Cell, 2001

**Figure 11 : Production de la diversité neuronale chez la Drosophile.** A. Cascade de facteurs de transcription exprimés par les neuroblastes (Nb) nécessaires à la production de la diversité neuronale. B. Le facteur Hunchback (Hb) est à la fois nécessaire et suffisant pour spécifier les neurones précoces (neurones 1).

Ces résultats suggèrent que Hb, Kr, Pdm et Cas puissent contrôler l'identité temporelle des Nb et agir synergiquement avec d'autres facteurs déterminant l'identité spatiale de manière à spécifier chaque type de neurone ou de glie dans le SNC.

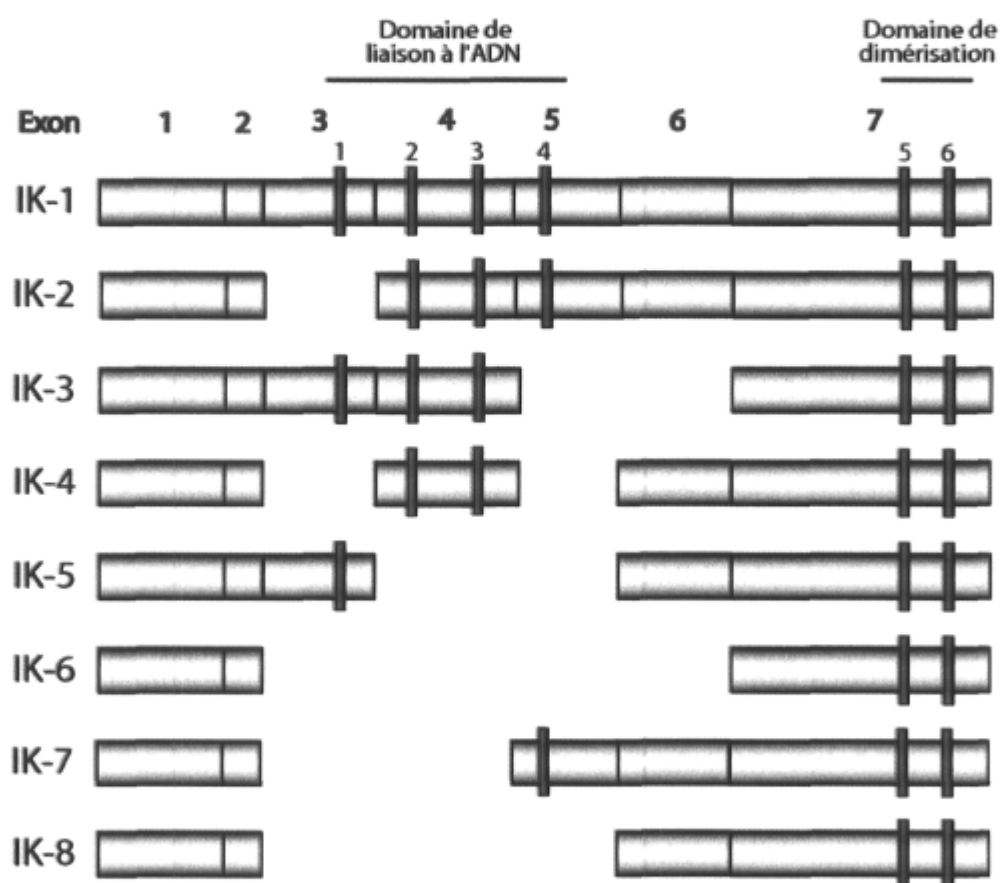
Plus récemment, la même équipe a démontré que l'expression transitoire de Hb dans des Nb à des stades avancés est suffisante pour remettre l'horloge à zéro et donc recommencer le programme du point de départ suggérant un haut degré de plasticité (Pearson and Doe, 2004). Ils ont aussi montré que cette même expression transitoire de Hb peut spécifier la production de CMGs précoces suggérant que Hb joue un rôle majeur dans la spécification de l'identité temporelle neuronale. Une question particulièrement intéressante est : Est-ce que l'orthologue de Hb a une fonction similaire durant la neurogénèse chez les vertébrés ?

## 1.5 IKAROS : ORTHOLOGUE DE HUNCHBACK

### 1.5.1 Structure et isoformes

Le gène Ikaros (IK) code pour une protéine de type «doigt de zinc » (DZ) chez les vertébrés qui est l'orthologue de Hunchback chez la drosophile (Georgopoulos et al., 1992). La structure d'Ikaros est composée d'un domaine de dimérisation en carboxy-terminal caractérisé par deux motifs DZ responsables de la formation d'homodimères ou d'hétérodimères entre les différentes isoformes d'Ikaros (Sun et al., 1996), mais aussi avec d'autres protéines de la même famille : Aiolos, Helios, Eos, Pegasus (Hahm et al., 1998; Kelley et al., 1998; Molnar and Georgopoulos, 1994; Morgan et al., 1997; Perdomo et al., 2000). Le gène Ikaros comprend sept exons et permet par épissage alternatif de l'ARN pré-messager, l'expression de plusieurs isoformes protéiques différentes (Figure 12). On connaît à ce jour l'existence de 8 différentes isoformes qui contiennent toutes le domaine de dimérisation. Cependant, ce qui les distingue est leur composition en amino-terminal ou l'on

retrouve 4 motifs DZ nécessaires à la liaison de l'ADN et reconnaissant la séquence consensus TGGGAA (Hahm et al., 1994; Molnar and Georgopoulos, 1994). Des mutations ciblées des différents DZ du domaine amino-terminal d'Ikaros ont permis de montrer que les DZ 2 et 3 interagissent physiquement avec l'ADN (Cobb et al., 2000; Koipally and Georgopoulos, 2002). Ainsi, comme 3 des 4 doigts de zinc sont nécessaires pour la liaison à l'ADN, seules les isoformes 1, 2 et 3 peuvent lier l'ADN. Par conséquent, les isoformes sans domaine de liaison à l'ADN peuvent interférer avec la fonction des autres isoformes par un mécanisme dominant négatif.



**Figure 12: Représentation schématique de plusieurs isoformes d'Ikaros.** Le domaine de liaison à l'ADN contient 4 motifs DZ, le domaine de dimérisation en possède 2.

### 1.5.2 Rôle dans le système hématopoïétique

Dans le système hématopoïétique, l'expression d'Ikaros est détectée très tôt au cours du développement embryonnaire (E8.5), au niveau des sites où se produisent l'hématopoïèse primitive (sac vitellin) et définitive (foie fœtal) (Georgopoulos et al., 1992). Chez l'adulte, Ikaros est exprimé dans l'ensemble des cellules hématopoïétiques (cellules myéloïdes et érythroïdes, lymphocytes T et B) (Kelley et al., 1998; Kirstetter et al., 2002; Klug et al., 1998; Morgan et al., 1997). Cependant, la régulation de l'expression d'Ikaros varie d'un lignage cellulaire à l'autre. En effet, le niveau d'expression d'Ikaros diminue en parallèle avec la différenciation des cellules myéloïdes et érythroïdes (Dumortier et al., 2006; Klug et al., 1998). À l'opposé, le niveau d'expression d'Ikaros augmente au cours de la différenciation des cellules T (Kelley et al., 1998; Morgan et al., 1997), ce qui suggère qu'Ikaros ait des fonctions différentes dans ces populations. Des différentes isoformes décrites jusqu'à maintenant, Ik-1 et Ik-2 sont les isoformes les plus abondamment exprimées dans les cellules hématopoïétiques (Molnar and Georgopoulos, 1994; Morgan et al., 1997). Ainsi, la plupart des protéines Ikaros produites dans les cellules hématopoïétiques normales sont capables de se lier à l'ADN.

Les membres de la famille d'Ikaros sont des facteurs-clés dans la spécification de la différenciation des lymphocytes et leurs autres fonctions agissant à divers niveaux au sein des cellules souches hématopoïétiques (Georgopoulos et al., 1994; Georgopoulos et al., 1992). Les souris dont le gène *ikaros* a été inactivé démontrent une absence de lymphocytes B et T, de même que leurs progéniteurs les plus précoces (Wang et al., 1996). La mutation *Ik-/-* a été réalisée par délétion de l'exon 7, codant la partie carboxy-terminale de la protéine, incluant le domaine de dimérisation. Les souris *Ik-/-* expriment une protéine tronquée qui est instable dans le système hématopoïétique. Ces résultats suggèrent qu'Ikaros est nécessaire pour le développement normal des cellules B. Les cellules T fœtales sont également absentes et le thymus des souris *Ik-/-* est dépourvu de cellules T jusqu'à la naissance. Elles se développent cependant dans le thymus quelques semaines après la naissance. La protéine Ikaros, indispensable au développement des cellules T et B, est également nécessaire aux autres cellules du lignage lymphoïde. En effet, les cellules NK sont absentes et les cellules dendritiques thymiques sont réduites chez les souris *Ik-/-*.



Le phénotype des souris  $\text{Ik}^{\text{DN}/-}$  est beaucoup plus sévère que celui des souris  $\text{Ik}^{-/-}$ . Les protéines produites par cette mutation sont dépourvues du domaine de fixation à l'ADN (délétion des exons 3 et 4), mais gardent la capacité d'interagir avec les autres isoformes d'Ikaros ainsi qu'avec les protéines de la même famille. Ainsi, les protéines Ik DN peuvent interférer avec l'activité normale de ces protéines par un mécanisme dominant négatif. Les embryons  $\text{Ik}^{\text{DN}/-}$  se développent normalement, puis meurent après la naissance à la suite d'infections opportunistes diverses. L'activité et le nombre de cellules hématopoïétiques immatures des souris  $\text{Ik}^{\text{DN}/-}$  sont affectés. En effet, les cellules  $\text{Ik}^{\text{DN}/-}$  sont dépourvues de toute activité de reconstitution à long terme du système hématopoïétique (Nichogiannopoulou et al., 1999). Elles présentent un blocage précoce et complet du développement des cellules du lignage lymphoïde pendant l'hématopoïèse fœtale et adulte. Le thymus de ces animaux reste rudimentaire et les organes lymphoïdes périphériques secondaires sont absents. Il a été proposé que les effets plus sévères observés dans les cellules  $\text{Ik}^{\text{DN}/-}$  reflètent les effets combinés de l'absence d'activité de la protéine Ikaros, et des interférences des protéines Ik DN avec les autres protéines de la famille Ikaros.

La mutation Ik plastic ( $\text{IK}^{\text{PLSTC}}$ ) a été isolée après utilisation de la méthode de mutagenèse chimique par l'agent éthylant N-Ethyl-N-nitroso-urée (ENU). La mutation  $\text{IK}^{\text{PLSTC}}$  résulte d'une mutation ponctuelle (A-G) au niveau de la séquence codant pour le DZ 3 de la protéine Ikaros (Papathanasiou et al., 2003). Cette mutation abolie complètement la capacité d'Ikaros à se fixer à l'ADN, mais préserve sa faculté à se dimériser efficacement avec les autres isoformes. La mutation homozygote  $\text{IK}^{\text{PLSTC}}$  conduit à une létalité embryonnaire entre E15.5 et E17.5, due à une anémie sévère. L'analyse des cellules dans le foie fœtal des souris  $\text{IK}^{\text{PLSTC}}$  révèle un phénotype très similaire à celui décrit pour les mutations précédentes: absence d'activité de reconstitution à long terme du système hématopoïétique, absence totale de cellules T, B et NK. D'autre part, les mutants  $\text{IK}^{\text{PLSTC}}$  ne produisent pas de cellules érythroïdes matures, bien que le nombre de précurseurs érythropoïétiques soit normal dans le foie fœtal. Il est à noter que la mutation  $\text{IK}^{\text{PLSTC}}$  bloque de manière plus efficace la liaison des autres membres à l'ADN que la mutation  $\text{Ik}^{\text{DN}/-}$  en raison sa plus grande stabilité que la forme tronquée dont les exons 3 et 4 ont été délétés.

Les souris  $Ik^{-/-}$  meurent généralement au cours de la vie adulte suite à l'apparition de lymphoblastomes principalement dû à des problèmes reliés aux cellules souches hématopoïétiques (Nichogiannopoulou et al., 1999).

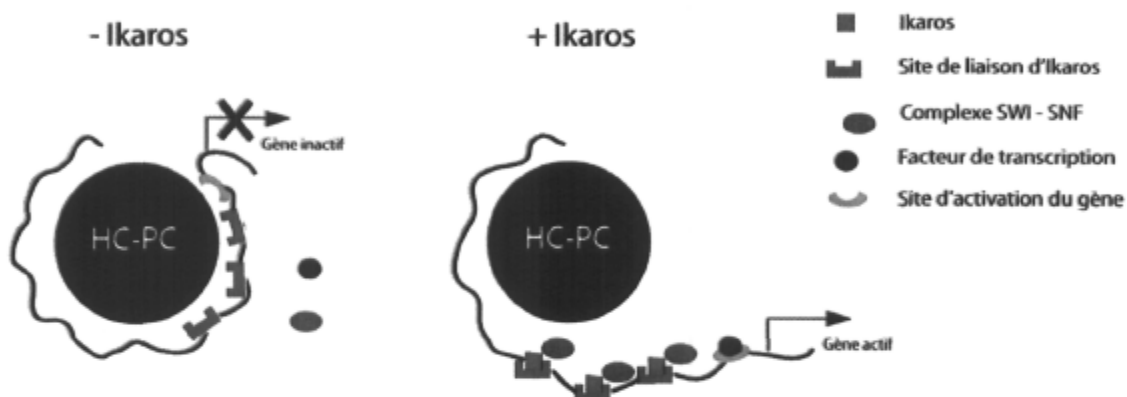
Mutation	Phénotype
$Ikars -/-$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Absence de cellule B</li> <li>- Absence de cellules NK</li> <li>- Absence de cellules T foetales</li> <li>- Réduction des cellules dendritique (Thymus)</li> </ul>
$Ikars DN -/-$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Absence de cellule B</li> <li>- Absence de cellules NK</li> <li>- Absence de cellule T</li> <li>- Réduction des cellules dendritique (Thymus)</li> </ul>
$Ikars plstc/plstc$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Absence de cellule B</li> <li>- Absence de cellules NK</li> <li>- Absence de cellules T</li> <li>- Réduction des cellules dendritique (Thymus)</li> <li>- Absence de cellule erythroïdes matures</li> </ul>

**Table 1 : Résumé des différents phénotypes observés chez 3 différentes souris mutantes pour le gène Ikaros.**

### 1.5.3 Contrôle de l'expression génique

L'étude de la fonction d'Ikaros a révélé qu'il peut fonctionner comme un activateur ou répresseur de l'activité transcriptionnelle (Koipally et al., 1999). En premier lieu, un rôle d'activateur lui avait été attribué après l'étude des mutants (Georgopoulos et al., 1992). En effet, le profil d'expression de certains gènes dans les précurseurs hématopoïétiques des mutants  $Ik^{-/-}$  et  $Ik^{DN/-}$  suggérait un rôle d'Ikaros comme activateur de la transcription (Nichogiannopoulou et al., 1999). Il a aussi été montré qu'une petite fraction des protéines Ikaros s'associe au complexe SWI/SNF (Kim et al., 1999; O'Neill et al., 2000). Le complexe SWI/SNF est responsable du remodelage de la chromatine de façon ATP-dépendante et rend les gènes accessibles à la machinerie transcriptionnelle (Figure 13). Une autre étude a

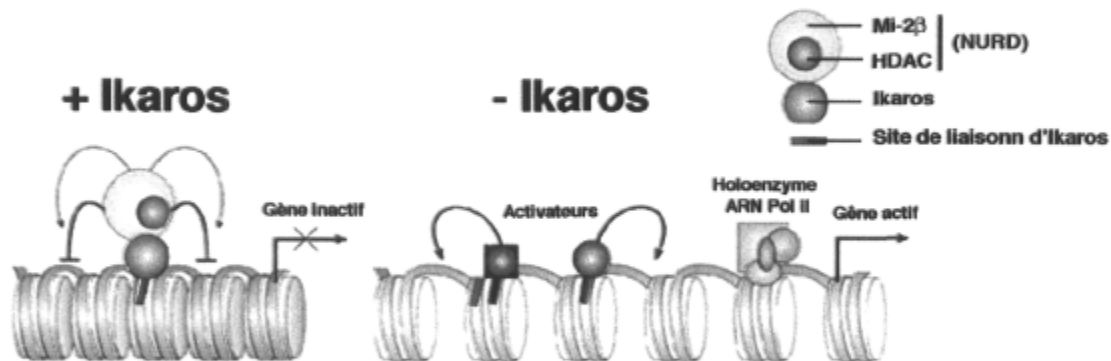
montré qu'Ikaros peut activer l'expression de gènes de façon inhabituelle, en potentialisant l'activité d'autres facteurs de transcription (Koipally et al., 2002). Ces résultats suggèrent qu'il existe une corrélation entre la localisation d'Ikaros au niveau de l'hétérochromatine-péricentromérique (HC-PC) et l'activation de l'expression des gènes.



**Figure 13 : Modèle schématique pouvant expliquer l'activation de l'expression génique par Ikaros.** La liaison d'Ikaros à ses séquences consensus et la liaison subséquente du complexe SWI/SWF à Ikaros induirait un changement de la conformation de la chromatine rendant accessible ou de façon plus efficace la liaison de facteurs de transcription activant l'expression de gènes spécifiques.

Les premières évidences qu'il puisse agir comme un répresseur viennent de sa présence au niveau des centromères lui suggérant une fonction dans la ségrégation des chromosomes. Il semble que cette distribution change au cours du cycle cellulaire ou elle est présente durant les phases G1 et G2 et disparaît en phase S où sa répartition devient alors uniforme au sein du noyau. Au début de la mitose, Ikaros n'est plus détecté jusqu'à l'anaphase (Brown et al., 1997). Chez les cellules T activées, le complexe Ikaros-Mi2-HDAC aurait des propriétés de remodelage de la chromatine. Il pourrait aussi contrôler l'état d'acétylation des histones en se liant à l'ADN nouvellement synthétisé au cours de la phase S dans des régions

hétérochromatiques étant inaccessibles menant à la répression de l'activité transcriptionnelle de certains gènes (Figure 14).



*Adapté de Nature review immunology mars 2002*

**Figure 14 : Modèle schématique pouvant expliquer la répression de l'expression génique par Ikaros.** La reconnaissance d'Ikaros à sa séquence consensus suivie de la liaison du complexe NURD à Ikaros réorganise la chromatine dans un état de répression génique (nucléosomes oranges). Lorsque Ikaros est absent, l'organisation de la chromatine rend possible la liaison des régulateurs de l'activité transcriptionnel (nucléosomes verts).

Il a été proposé que le mécanisme de répression transcriptionnelle, associé au recrutement centromérique pourrait constituer une des bases moléculaires de la mémoire transcriptionnelle au cours du cycle cellulaire (Brown et al., 1999; Brown et al., 1997; Jeppesen, 1997). Cette fonction de répression est associée à un remodelage de la chromatine et une hypoacétylation des histones dans les régions des promoteurs de certains gènes cibles. Chez les cellules lymphoïdes, la localisation d'Ikaros à proximité des domaines centromériques en association avec des gènes réprimés suggère qu'il puisse jouer un rôle en repositionnant les promoteurs des gènes cibles aux centromères (Kim et al., 1999). Chez les cellules souches, Ikaros pourrait maintenir ou réprimer au cours du cycle cellulaire l'expression de loci nécessaires à la spécification de la différenciation de différents types cellulaires. Il semble que ce soit le cas dans le système hématopoïétique mais le rôle potentiel d'Ikaros dans d'autres systèmes reste en grande partie inexploré.

Pour ce qui est des mécanismes de régulation de l'expression d'Ikaros, ils sont encore très mal connus. Toutefois, une étude a permis de mettre en évidence plusieurs sites promoteurs dans le locus Ikaros (Kaufmann et al., 2003). L'identification de ces éléments régulateurs est d'un intérêt particulier, puisqu'elle devrait permettre la mise en évidence de facteurs de transcription impliqués dans la régulation du gène Ikaros.

## 1.6 DIFFÉRENCIATION ET MORT CELLULAIRE

Au cours du développement chez les vertébrés, le nombre de neurones produits est environ le double du nombre de neurones présents dans le système nerveux central mature. La mort cellulaire programmée de 50% des neurones produits survient de façon hautement reproductible dans le temps et dans l'espace et elle est conservée à travers les espèces. Cette mort neuronale est capitale pour le développement du système nerveux car elle permet l'adaptation du nombre de neurones connectés aux cellules cibles et la correction des erreurs de connexions (Barde, 1989). Les neurones, comme toutes les cellules, ont besoin pour survivre de recevoir en permanence de leur environnement des "signaux de survie" essentiellement constitués par les facteurs de trophiques. En l'absence de ces signaux, les neurones déclenchent leur programme de suicide et meurent par apoptose (Barde, 1989).

Morphologiquement, le processus d'apoptose se caractérise par une condensation du noyau, une fragmentation de l'ADN, et la formation de corps apoptotiques rapidement éliminés par les cellules voisines. La membrane cellulaire ne se rompt pas, évitant alors la libération des constituants intracellulaires. De plus, les cellules en apoptose participent activement à leur propre auto-destruction via l'expression de gènes spécifiques ou l'activation d'un processus latent.

Ce phénomène est à l'origine de la perte neuronale massive et programmée observée au cours du développement embryonnaire. Les neurones générés ne disposeraient pas tous d'un apport suffisant en facteurs de croissance par leurs cellules-cibles. L'apoptose neuronale induite par ce manque en facteurs trophiques permettrait à chaque cellule cible d'être innervée par un nombre approprié de neurones (Barde, 1989; Oppenheim et al., 1991). Cette

théorie dite "neurotrophique" de la mort neuronale développementale a conduit à l'utilisation massive du modèle de privation de facteurs trophiques pour l'étude de l'apoptose neuronale *in vitro* (Barres et al., 1992; Raff, 1992). En effet, l'apoptose peut être induite dans des cultures primaires de neurones ou dans des lignées neuronales par la privation de facteurs neurotrophiques spécifiques par exemple : le Nerve Growth Factor (NGF) pour les neurones sympathiques (Martin et al., 1992) et le Brain derived neurotrophic factor (BDNF) ou le Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) pour les neurones parasympathiques (Allsopp, 1993).

### 1.6.1 Apoptose et développement rétinien

Chez la rétine, tout comme le reste du système nerveux, différentes vagues d'apoptose associées à la différenciation cellulaire sont observées au cours du développement (Penfold and Provis, 1986; Young, 1984). À partir d'une couche de cellules neuroépithéliales, la rétine se développe pour former trois couches distinctes composées de cellules postmitotiques différenciées. Lorsque les cellules deviennent postmitotiques, les cellules extranuméraires ou qui sont incapables de faire des connections fonctionnelles sont éliminées par apoptose et elles représentent pour certains types cellulaires environ 50% de la population initialement générée (Wong and Hughes, 1987). Durant le développement embryonnaire quelques cellules apoptotiques sont observées mais la mort cellulaire survient principalement durant les 2 premières semaines postnatales et est essentiellement terminée vers la fin de la troisième semaine (Young, 1984). Elle se produit principalement selon l'ordre dont les cellules sont générées. Ainsi les premières cellules en apoptose sont les RGCs, viennent ensuite les cellules amacrine et photorécepteurs suivi de près par les cellules bipolaires et les cellules de Müller.

Jusqu'à ce jour, on en sait très peu sur les médiateurs de cette apoptose, cependant chez les RGCs il semble que le NGF et son récepteur de basse affinité  $p75^{\text{NTR}}$  en serait en partie responsable (Ding et al., 2001; Frade and Barde, 1999; Frade et al., 1996; Harada et al., 2005). Malgré que le NGF soit mieux connu pour son rôle anti-apoptotique, les RGCs nouvellement postmitotiques exprimeraient le récepteur  $p75^{\text{NTR}}$  et le NGF sécrété par les RGCs différenciées au niveau de la GCL induirait l'apoptose de ces cellules. Chez la rétine

de poulet, les cellules postmitotiques en migration exprimeraient p75<sup>NTR</sup> tandis que les RGCs au niveau de la GCL exprimeraient le récepteur à haute affinité au NGF, Tyrosine Kinase A (TrkA) qui pourrait donc transformé la signalisation pro-apoptotique via p75<sup>NTR</sup> en une signalisation neurotrophique via TrkA (Frade et al., 1996; Gonzalez-Hoyuela et al., 2001). Chez la souris il semble que la situation soit un peu plus complexe, puisque les RGCs au niveau de la GCL expriment eux aussi le récepteur p75<sup>NTR</sup>. Il a été proposé que d'autres récepteurs de facteurs trophiques seraient exprimés chez ces cellules et les protégeraient de la mort induite via p75<sup>NTR</sup> (Harada et al., 2006). Puisque la seule source de NGF de la rétine provient des RGCs, il semblerait qu'elles contrôleraient leur propre nombre via l'expression de celui-ci.

Plusieurs autres facteurs environnementaux contrôlent fort probablement l'apoptose développementale des autres types cellulaires de la rétine, cependant leur identité reste toujours inconnue.

## 1.7 OBJECTIF DE TRAVAIL 2

Au delà du rôle de l'apoptose au cours du développement, elle survient rarement en condition normale et chez l'adulte est plutôt associée à des dégénérescences rétinienne. Plusieurs des rétinopathies mènent ultimement à une dégénérescence des photorécepteurs. Les mécanismes moléculaires de ces maladies menant à la mort cellulaire sont encore toutefois méconnus. Une meilleure compréhension de l'apoptose développementale des photorécepteurs serait utile afin d'établir des stratégies thérapeutiques efficaces.

À la recherche de facteurs potentiels contrôlant l'apoptose des photorécepteurs au cours du développement, nous avons émis l'hypothèse que la voie du CNTF/LIF serait impliquée dans ce processus. Malgré que le CNTF soit mieux connu pour ses vertus anti-apoptotique, en particulier chez la rétine mature de modèle murin de dégénérescences rétinienne, (Cayouette et al., 1998; Cayouette and Gravel, 1997; LaVail et al., 1992), des études *in vitro* on démontré que le CNTF peut aussi agir en tant que facteur capable d'induire la mort de neurones sympathiques (Kessler et al., 1993). Nous avons suggéré que tout comme le NGF, il puisse avoir un rôle pro-apoptotique durant le développement rétinien. Cette hypothèse étant basée sur la propriété des explants rétines de souris dont le gène du récepteur CNTFR $\alpha$  à été inactivé qui possèdent plus de photorécepteurs que les souris sauvages (Ezzeddine et al., 1997).

Dans le but de mieux comprendre le rôle de la voie de signalisation du CNTF/LIF *in vivo*, nous avons procédé à des injections intravitréales à différents temps postnataux dans le but de stimuler ou bloquer la signalisation endogène. Pour un effet à court terme des injections de protéines recombinantes ont été effectuées tandis que des vecteur adénoviraux ont été utilisés pour une action à long terme.

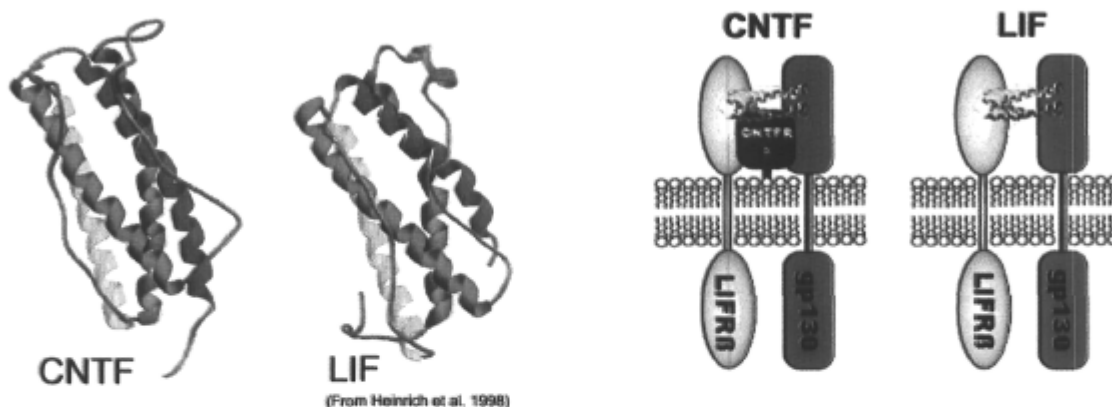
Les résultats de ces travaux sont présentés dans le Chapitre 2 et ont été publiés dans la revue *Developmental Biology*.



## 1.8 CILIARY NEUROTROPHIC FACTOR

Le Ciliary neurotrophic factor (CNTF) a d'abord été mis en évidence comme facteur de survie de neurones de ganglion ciliaire de poulet d'où il tire son nom (Stockli et al., 1989). Il est principalement retrouvé dans le système nerveux et sa purification a été obtenue à partir d'extraits de nerf sciatique. Sa structure tertiaire le définit comme faisant partie de la famille des cytokines à longues chaînes hélicoïdales (Bazan, 1991).

Le CNTF possède des propriétés biologiques similaires au Leukemia inhibitory factor (LIF), cependant le LIF possède un spectre d'action plus large en agissant sur divers systèmes. Dans le système nerveux, ils ont des rôles complémentaires qui s'expliquent par la nature de leurs récepteurs membranaires (Ip et al., 1992). Même s'ils font partie de la même famille et ont une structure tertiaire similaire ils ne partagent que très peu d'homologie quant à leur séquence (environ 15%). Le complexe du récepteur du CNTF/LIF est composé de diverses sous-unités : il est composé du CNTF récepteur  $\alpha$  (CNTFR $\alpha$ ), du LIF récepteur  $\beta$  (LIFR $\beta$ ) et de la glycoprotéine 130 (gp130) (Davis et al., 1993). Comparativement au CNTF qui nécessite absolument le CNTFR $\alpha$ , le LIF quant à lui ne nécessite que les sous-unités LIFR $\beta$  et gp130 pour activer cette voie de signalisation (Stahl et al., 1993) (Figure 15).



**Figure 15. Représentation de la structure à longues chaînes hélicoïdales de CNTF et LIF ainsi que leurs récepteurs respectifs.** CNTF et LIF possèdent une structure grandement similaire. Ils ont un complexe de récepteurs presque identiques. CNTF nécessite la présence de 3 sous-unités : LIFR $\beta$ , gp130 et CNTFR $\alpha$ . Le LIF quant à lui ne nécessite pas la présence de la sous-unité CNTFR $\alpha$ .

Certains autres facteurs neurotrophiques faisant partie de la même famille ont été démontré pour avoir des activités biologiques diverses au niveau du système nerveux. Parmi celles-ci on compte le Leukemia inhibitory factor (LIF) (Gearing et al., 1987), l'Oncostatin M (OsM) (Morikawa et al., 2005), Cardiotrophin-1 (CT-1) et Neuropoietine (NP) (Derouet et al., 2004). Ils ont tous la caractéristique commune de se lier au complexe du récepteur CNTF/LIF.

Même s'il a été démontré que l'application exogène de ces facteurs ait divers effets sur différents types de neurones (survie, différenciation, etc.), l'étude des mutants leur suggère un rôle plutôt mineur quant au développement du système nerveux et seraient majoritairement importants pour la survie neuronale durant la vie adulte. Cette affirmation est basée sur l'étude des souris dont les gènes du CNTF et/ou LIF ont été inactivés, qui se développent normalement mais présentent une perte de motoneurones à partir de la 6<sup>e</sup> semaine postnatale (Holtmann et al., 2005; Masu et al., 1993; Stewart et al., 1992). De plus, pour ce qui est du CNTF, il ne contient pas de séquence signal lui permettant d'être sécrété par la voie classique du réticulum endoplasmique et appareil de Golgi, c'est pourquoi il n'est relâché que lorsqu'il y a une lésion.

Par contre, les souris dont le gène du récepteur CNTFR $\alpha$  ou du LIFR $\beta$  a été inactivé meurent quelques heures après la naissance et présentent une perte massive de différentes populations de motoneurones (DeChiara et al., 1995; Li et al., 1995). Il apparaît donc que le CNTFR $\alpha$  et le LIFR $\beta$  sont essentiels au développement du système nerveux contrairement aux ligands CNTF et LIF. Cela suggère que d'autres ligands sont actifs au cours du développement et agissent via l'intermédiaire de celui-ci. Il a récemment été démontré que d'autres ligands potentiels peuvent se lier au complexe du récepteur CNTF/LIF. Entre autres, le Cardiotrophin-like cytokine (CLC) et le récepteur soluble Cytokine-like factor-1 (CLF) peuvent former un complexe capable de se lier au CNTFR $\alpha$  et d'activer la même voie de signalisation que CNTF (Elson et al., 2000). De plus, une nouvelle protéine récemment découverte nommée neuropoietine (NP), exprimée dans la rétine ainsi que dans les muscles squelettiques, a aussi été démontrée capable de se lier au CNTFR $\alpha$  (Derouet et al., 2004).

### 1.8.1 La voie de signalisation du CNTF/LIF

Lorsqu'il se lie au complexe du récepteur, le CNTF et le LIF activent la voie des JAK-STATs. La liaison du CNTF au CNTFR $\alpha$  est la première étape. Une fois ce complexe formé, il s'associe aux sous-unités LIFR $\beta$  et gp130 de manière à former un récepteur de haute affinité capable de transmettre le signal. Puisqu'il ne nécessite pas la sous-unité CNTFR $\alpha$ , le LIF s'associe directement à ces sous-unités. Des protéines Janus kinases (JAK-1, JAK-2) qui sont constitutivement associées au LIFR $\beta$  et au gp130, sont alors phosphorylées et activées (Boulton et al., 1995; Stahl and Yancopoulos, 1994). Elles phosphorylent à leur tour les six résidus tyrosines de la région intracytoplasmique du LIFR $\beta$  et du gp130, qui vont servir d'ancrage à d'autres protéines cytoplasmiques, plus particulièrement les protéines "Signal Transducer and Activator of Transcription" STAT1 et STAT3. Les STATs sont des facteurs de transcription présents dans le cytoplasme sous forme non-phosphorylée. Leur phosphorylation provoque leur hétérodimérisation en complexes STAT1/STAT3 ou STAT3/STAT3 et subséquentement leur translocation vers le noyau et leur fixation à des séquences d'ADN spécifiques mène à l'activation de la transcription de gènes cibles (Darnell et al., 1994; Hirano et al., 1994) (Figure 16).

On connaît certains gènes contenant des séquences spécifiques répondant à la stimulation au CNTF (*CNTF-responsive elements*) chez lesquelles le complexe des STATs peut se lier. Entre autres la choline acetyltransferase (Chat), le facteur c-fos, le glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Bonni et al., 1993; Kahn et al., 1997; Symes et al., 1993). Cependant on ne connaît pas très bien l'ensemble des gènes répondant à la stimulation au CNTF et qui sont impliqués dans l'effet de survie et de différenciation neuronale.

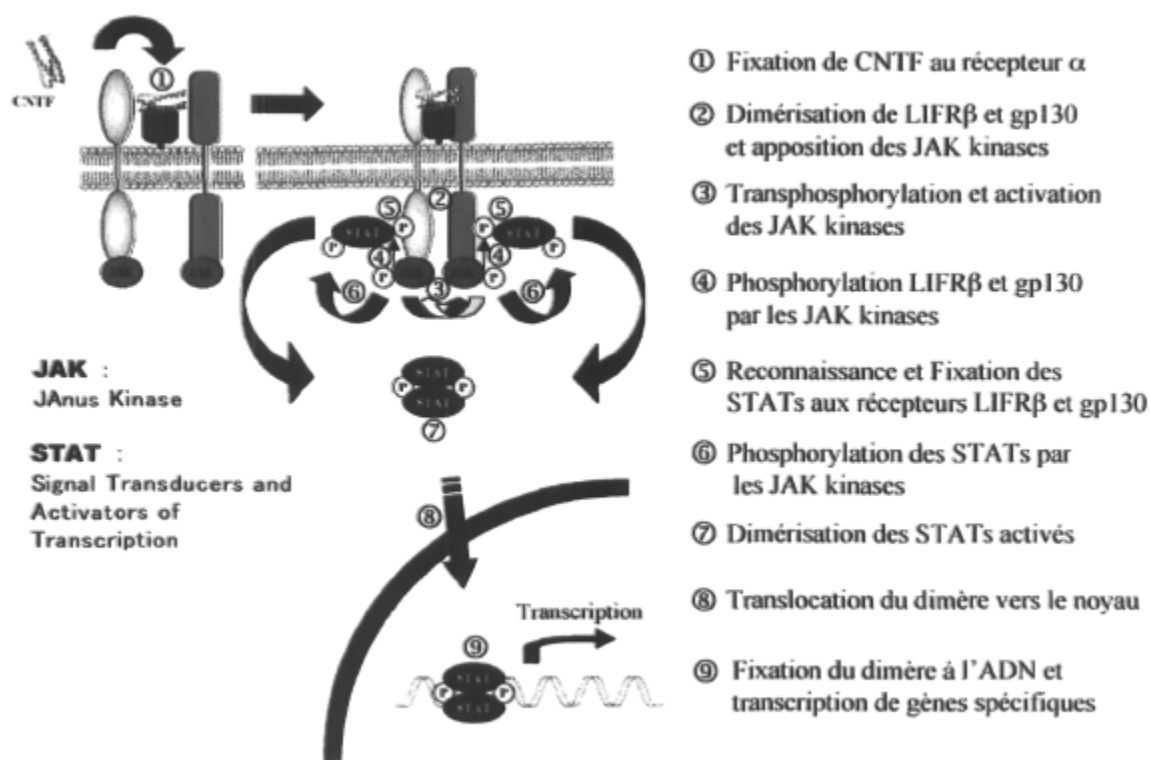


Figure 16 : Voie de signalisation JAK-STAT induite par la liaison du CNTF ou LIF à leur récepteurs.

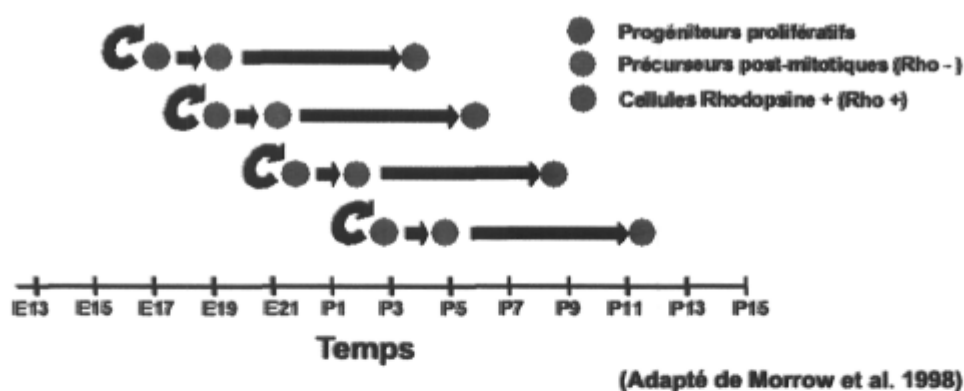
## 1.8.2 Rôle de la voie CNTF/LIF durant le développement rétinien

### 1.8.2.1 Expression du CNTFR $\alpha$

Il a été démontré que chez la rétine de rat, l'ARN messager (ARNm) du récepteur CNTFR $\alpha$  est exprimé par les cellules horizontales, une sous-population de cellules amacriques et ganglionnaires mais n'est pas exprimé au niveau des photorécepteurs (Kirsch et al., 1997). Ces résultats ont été confirmés par la détection de la protéine dans les mêmes régions (Beltran et al., 2005). Chez la rétine mature de rat et de souris, le récepteur CNTFR $\alpha$  n'est pas détecté dans les corps cellulaires ni dans les segments internes et externes des photorécepteurs. Par contre, ceci semble restreint aux rongeurs puisque d'autres espèces comme le chat, le chien, le singe et l'humain expriment le récepteur CNTFR $\alpha$  dans les segments internes et le corps cellulaire des photorécepteurs (Beltran et al., 2005).

### 1.8.2.2 CNTF/LIF et différenciation des photorécepteurs

L'expression régulée du CNTFR $\alpha$  au cours du développement suggère qu'il puisse être important pour la différenciation et/ou la survie de divers types cellulaires. Des études *in vitro* ont démontré que l'addition de CNTF ou LIF inhibe la différenciation des photorécepteurs. (Ezzeddine et al., 1997; Kirsch et al., 1998a; Neophytou et al., 1997; Schulz-Key et al., 2002). Il semblerait que la différenciation des précurseurs des photorécepteurs soit arrêtée à un stade où les précurseurs sont postmitotiques et rhodopsine-négatifs (Rho-) (Neophytou et al., 1997). En effet, lorsque les progéniteurs en prolifération sortent du cycle cellulaire et deviennent alors postmitotiques, deux phases distinctes sont observées par lesquelles les précurseurs des photorécepteurs sont Rho- pour une période de 5.5 à 6.5 jours en moyenne et commencent ensuite à exprimer la rhodopsine (Rho+) qui plus tard se retrouvera au niveau des segments externes qui se formeront au cours de la même période. Les premières cellules Rho+ apparaissent environ au jour postnatal 2 (Morrow et al., 1998; Neophytou et al., 1997) (Figure 17).



**Figure 17 : Étapes dans la différenciation des photorécepteurs bâtonnets.**

Il a été démontré que l'application exogène de CNTF ou de LIF à des cultures d'explants de rétines ou de cellules rétinienne dissociées de rat bloque les précurseurs au stade Rho- caractérisé par une diminution du nombre de cellules Rho+ par rapport aux contrôles (Bhattacharya et al., 2004; Ezzeddine et al., 1997; Kirsch et al., 1996; Neophytou et al.,

1997; Rhee et al., 2004). Il semble que cet effet soit réversible puisque lorsque le CNTF est retiré du milieu de culture, les précurseurs sont capables de passer au stade Rho+ (Schulz-Key et al., 2002). Cet effet sur la différenciation des photorécepteurs est probablement médié indirectement via un autre type cellulaire puisque les photorécepteurs chez les rongeurs n'expriment pas le CNTFR $\alpha$  (Beltran et al., 2005). De plus, l'injection intravitréale de CNTF chez les rongeurs adultes active des voies de signalisations principalement dans les cellules de Müller, dans les autres cellules de l'INL, dans les cellules ganglionnaires et dans les astrocytes, mais ne semble pas activer directement la signalisation chez les photorécepteurs. (Peterson et al., 2000; Wahlin et al., 2001; Wahlin et al., 2000).

Quelques articles ont rapporté que la diminution du nombre de cellules Rho+ est accompagnée d'une augmentation de cellules exprimant divers marqueurs de cellules bipolaires (Bhattacharya et al., 2004; Ezzeddine et al., 1997; Roger et al., 2006; Schulz-Key et al., 2002; Zahir et al., 2005). Cependant, il semble que l'augmentation de cellules bipolaires s'effectue seulement lorsque que le CNTF est présent à hautes concentrations dans les cultures (Schulz-Key et al., 2002). L'effet est partiellement dû à l'augmentation de l'expression des facteurs de transcriptions Math3 et Pleiotrophin (Ptn) (Bhattacharya et al., 2004; Roger et al., 2006). Une étude plus récente suggère que l'addition de CNTF à des explants de rétines ou des cultures dissociées puisse aussi induire la production de cellules de Müller (Goureau et al., 2004).

Ce rôle inhibiteur de la voie du CNTF/LIF dans la différenciation des photorécepteurs est corroborée par des résultats où certaines composantes du récepteur ont été inactivés. Les explants provenant de souris dans le gène CNTFR $\alpha$  à été inactivé commencent à exprimer la rhodopsine plus tôt et présentent plus de cellules Rho+ après 10 jours en culture (Ezzeddine et al., 1997). Le même effet est observé lorsque les cultures dissociées de rétines sont traitées avec la protéine dominante-négative humaine LIF05 (hLIF05) (Neophytou et al., 1997). Le mutant LIF05 se lie à la sous-unité LIFR $\beta$  et empêche la dimérisation avec la sous-unité gp130 empêchant donc toute signalisation via ce complexe (Hudson et al., 1996). Cette inhibition de la différenciation est médié via les STATs puisque lorsque des explants de rétines sont électroporés avec une construction surexprimant une forme mutante dominante-négative de STAT3 incapable de se lier à l'ADN l'expression de la rhodopsine

survient plus tôt. De plus, une augmentation du nombre total de photorécepteurs Rho+ est aussi observée (Rhee et al., 2004). Cependant, cette augmentation du nombre de cellules Rho+ est suprenante puisque l'induction d'une différenciation précoce n'implique pas nécessairement une augmentation leur nombre. Ces résultats viennent donc confirmer le rôle de la voie de signalisation du CNTF/LIF dans la différenciation des photorécepteurs bâtonnets *in vitro*. et suggèrent que la voie du CNTF/LIF puisse aussi favoriser la mort de certains photorécepteurs.

## 1.9 Apoptose développementale des photorécepteurs

Les photorécepteurs, tout comme les autres types cellulaires de la rétine subissent une vague d'apoptose atteignant son niveau le plus élevé au jour postnatal 7 (Young, 1984). Chez les photorécepteurs, elle se produit au niveau la couche neuroblastique externe (ONBL) principalement composée de photorécepteurs postmitotiques qui n'ont pas encore migré à travers l'OPL pour rejoindre leur couche appropriée soit l'ONL. L'apoptose développementale des photorécepteurs est très peu documentée et les médiateurs restent toujours inconnus. Cependant, des mécanismes intracellulaires menant à cette apoptose ont été caractérisés. En condition d'apoptose pathologique des photorécepteurs, la surexpression du facteur anti-apoptotique Bcl-2 préserve transitoirement de l'apoptose chez divers modèles murins de dégénérescences rétiniennes suggérant que d'autres facteurs de la même famille puissent influencer leur survie au cours du développement. En effet, il a été démontré que les gènes pro-apoptotiques Bak et Bax, tout deux membres de la famille de Bcl-2, sont nécessaires à l'induction de l'apoptose développementale des photorécepteurs (Chen et al., 1996). Chez les souris doublement déficientes en Bak et Bax, une abolition presque complète de l'apoptose est observée au niveau de l'INL et de l'ONBL, tandis que chez les souris Bax mutantes, seulement l'apoptose au niveau de l'INL est abolie (Hahn et al., 2003; Mosinger Ogilvie et al., 1998). Finalement, les souris Bak mutantes ne présentent aucun phénotype sur l'apoptose rétinienne (Hahn et al., 2003). Il semblerait donc qu'un ligand présent au cours du développement puisse activer l'expression de Bak de manière à induire spécifiquement l'apoptose des photorécepteurs et agirait conjointement avec un autre facteur contrôlant l'expression de Bax à la fois important pour l'apoptose des cellules de l'INL mais aussi de l'ONBL.

## CHAPITRE 2. ARTICLE 1

### *Ikaros confers early temporal competence to mouse retinal progenitor cells*

Jimmy Elliott<sup>1</sup>, Christine Jolicoeur<sup>1</sup>, Vasanth Ramamurthy<sup>1</sup>, and Michel Cayouette<sup>1,2,3, \*</sup>

- 1 Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), Cellular Neurobiology Research Unit
- 2 Département de Médecine, Université de Montréal
- 3 Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University

\* Correspondence:

email: [michel.cayouette@ircm.qc.ca](mailto:michel.cayouette@ircm.qc.ca)

Address: Institut de recherches cliniques de Montréal, Cellular Neurobiology research unit, 110, Avenue des Pins Ouest, Montréal, QC, H2W 1R7

Tel: 514-987-5757

**Contributions :** Jimmy Elliott : Fig. 1 E-K, Fig. 2, Fig. 3 A-O;K, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7, Supp Fig 1, Supp Fig. 3, Supp Fig. 4, Supp Fig. 5

**Christine Jolicoeur :** Fig. 1 A-D, Fig 3 P-Q, Supp Fig. 2 A-P

**Vasanth Ramamurthy :** Sup Fig 2. Q



## 2.1 RÉSUMÉ

Au cours du développement de la rétine, les cellules progénitrices multipotentes (CPRs) donnent naissance aux différents types cellulaires à des moments bien spécifiques. Cependant, toute la machinerie moléculaire permettant aux CPRs de changer au cours du temps de façon à générer le bon type cellulaire au bon moment reste encore inconnue. Nous démontrons dans cette étude qu'Ikaros, l'orthologue murin de Hunchback chez la drosophile, est exprimé dans les CPRs embryonnaires précoces et non chez les CPRs tardifs. Dans la rétine différenciée, l'expression d'Ikaros est maintenue exclusivement dans les cellules nées tôt au cours du développement. L'expression ectopique d'Ikaros chez les CPRs tardifs est suffisante pour leur redonner la compétence de générer des cellules précoces, et ce, au détriment des cellules tardives. Inversement, les souris mutantes pour le gène Ikaros présentent une diminution du nombre de cellules précoces tandis que les cellules tardives ne sont pas affectées. L'ensemble de ces résultats démontre qu'Ikaros est à la fois nécessaire et suffisant pour conférer une identité temporelle précoce aux CPRs. Cela soulève l'éventualité d'un retour à un état de compétence antérieur chez les progéniteurs neuronaux de manière à augmenter le potentiel de différenciation pour la médecine régénérative.

## 2.2 ABSTRACT

In the developing retina, multipotent retinal progenitor cells (RPCs) give rise to specific retinal cell types at different times, but the molecular mechanisms regulating how RPCs change over time to regulate chronological order of cell birth remain unclear. We show here that Ikaros, a mouse ortholog of *Drosophila* Hunchback, is expressed in early embryonic, but not late RPCs. In the mature retina, Ikaros expression is maintained exclusively in early-born retinal cell types. Remarkably, misexpression of Ikaros in late RPCs is sufficient to allow them to resume the generation of early-born neurons, at the expense of late-born cell types. Conversely, Ikaros mutant mice show reduced numbers of early-born cell types, whereas late-born cell types are not affected. Together, these results show that Ikaros expression is both necessary and sufficient to confer early temporal competence to RPCs, raising the possibility of resetting temporal competence of neural progenitors to an early state to increase their differentiation potential for cell replacement therapies.

## 2.3 INTRODUCTION

During development of the nervous system, neural progenitor cells give rise to different cell types at specific times. The precise control of the chronological order of cell birth is critical in the formation of a fully functional nervous system. Although considerable progress has been made recently in identifying genes involved in the specification of particular cell types, the mechanisms that control how neural progenitor cells change over time to generate the right cell type at the right time remain poorly understood. Elucidating the mechanisms that control temporal competence of neural progenitors may have important implications for therapeutic uses of human neural stem cells.

The mouse retina provides an ideal system to study the problem of temporal regulation of cell birth because multipotent retinal progenitor cells (RPCs) give rise to different retinal cell types in a reproducible order during development (reviewed in (Livesey and Cepko, 2001)). At early embryonic stages, retinal ganglion cells, horizontal cells, and cone photoreceptors are produced. Then, at mid-embryonic stages of development, most amacrine cells are generated. Finally, in the late stages of retinal development, the majority of bipolar cells, rod photoreceptors, and Müller glial cells are produced (Rapaport et al., 2004; Young, 1985). What are the molecular mechanisms that operate in RPCs to ensure that the right cell type is produced on schedule? There is now strong evidence that RPCs gain and lose competence to generate a particular combination of cell types as they mature over time (reviewed in (Livesey and Cepko, 2001)). For example, in the early embryonic retina, young RPCs are competent to generate early born cell types such as retinal ganglion cells and horizontal cells, but in the older postnatal retina, RPCs lose the competence to generate these cell types and acquire the competence to generate late-born cell types (Cepko et al., 1996; Watanabe and Raff, 1992). Consistently, clonal-density cultures of RPCs isolated from embryonic day 20 (E20) retinas revealed that the clones produced by older RPCs are smaller and contained fewer cell types than the clones produced by younger E16-17 RPCs, even though they were cultured in the same conditions (Cayouette et al., 2003). More recently, imaging of RPCs expressing the transcription factor *ath5* in the living zebrafish retina showed that these cells have reproducible lineages *in vivo*. Together, these

results point to the importance of cell intrinsic mechanisms in retinal cell fate decisions, but negative feedback environmental signals can apparently influence these decisions (reviewed in (Cayouette et al., 2006)). For example, sonic hedgehog (Shh) is secreted by RGCs and is thought to act as an inhibitory cue to prevent RPCs from acquiring a RGC fate (Wang et al., 2005). More recently, growth and differentiation factor 11 (GDF 11) was shown to modulate the duration of expression of Math5, a bHLH transcription factor required to generate RGCs (Kim et al., 2005). These results identify a key role for negative feedback signals in the regulation of temporal competence, but the cell intrinsic factors that define a particular temporal competence state during vertebrate retinogenesis remain unknown.

Recent experiments in cortical progenitors have shown that the timing of neurogenesis is programmed within individual progenitor cells and depends mainly on cell-intrinsic mechanisms (Shen et al., 2006). One potential cell-intrinsic regulator of temporal identity in cortical progenitors is the winged-helix transcriptional repressor Foxg1, which apparently acts by repressing early temporal competence in late progenitors (Hanashima et al., 2004). Cell-intrinsic factors that confer specific temporal competence in neural progenitor cells have also recently been identified in a series of elegant experiments in *Drosophila* neuroblasts (Grosskortenhaus et al., 2005; Grosskortenhaus et al., 2006; Isshiki et al., 2001; Pearson and Doe, 2003). By following individual neuroblasts and their progeny (the ganglion mother cell; GMC), it was shown that each neuroblast expresses sequentially, in an invariant order, four temporal-identity genes called *hunchback*, *Krüppel*, *pdm*, and *castor* (Brody and Odenwald, 2000; Isshiki et al., 2001; Kambadur et al., 1998; Novotny et al., 2002; Pearson and Doe, 2003). Each GMC maintains the expression profile of the temporal-identity gene that its parent neuroblast displayed at the time the GMC was generated. The relevance of these temporal-identity genes to neuronal fate was addressed using gain of function and loss of function approaches, resulting in re-specification of the GMCs and their progeny to earlier or later fates (Grosskortenhaus et al., 2006; Isshiki et al., 2001; Pearson and Doe, 2003). Misexpression of Hunchback in neuroblasts, for example, resulted in the production of extra GMCs with early temporal identity, whereas *hunchback* mutant neuroblasts were unable to generate GMCs with early temporal identity (Isshiki et al., 2001; Pearson and Doe, 2003).

Could similar molecular machinery exist in the developing vertebrate retina to control RPC temporal competence so that appropriate retinal cell types are generated at the right time? Hunchback orthologs in vertebrates include Ikaros, the founding member of the Krüppel zinc finger family of transcription factors, that include Aiolos, Helios, Eos, and the more distant member Pegasus. These genes are characterized by N-terminal zinc finger DNA-binding domains and C-terminal zinc fingers related to the *Drosophila* protein Hunchback (Cobb and Smale, 2005; Cortes et al., 1999). The C-terminus contains the dimerization domain that is required for the formation of homo- and heterodimers, which are thought to play an important part in the regulation of the overall activity of the different family members (Cobb et al., 2000; Kelley et al., 1998; Morgan et al., 1997; Perdomo et al., 2000; Sun et al., 1996). The *ikaros* gene encodes at least eight isoforms (Ik1-8) generated through alternative splicing. Isoforms that lack a DNA-binding domain interfere with the function of the DNA-binding forms and can act as naturally occurring dominant negative proteins (Molnar and Georgopoulos, 1994; Sun et al., 1996).

The role of Ikaros has been most studied in the hematopoietic system, where it is thought to function as a key factor for differentiation at a number of branch points in the hematopoietic lineage (Georgopoulos, 2002). The role of Ikaros in nervous system development has not been studied extensively, but recent evidence indicates that it is involved in pituitary development (Ezzat et al., 2006) and that it is expressed in developing striatal neurons, where it apparently plays a part in enkephalinergic neuron differentiation (Agoston et al., 2007). It remains unknown, however, whether Ikaros is involved in retinal development. Considering the importance of *hunchback* in fly neuroblasts, where it is necessary and sufficient to specify early temporal competence, we hypothesized that *ikaros* might be a key regulator of RPC temporal identity.

We report here that Ikaros is expressed in early RPCs and in early-born retinal neurons. Misexpression of Ikaros in late postnatal RPCs, which do not normally express it, is sufficient to induce the generation of early-born cell types such as retinal ganglion cells (RGCs), horizontal cells, and amacrine cells, which are normally either not generated, or rarely generated, at this age. Importantly, mouse mutants of Ikaros show decreased generation of early-born neurons, whereas generation of late-born cell types is not affected.

## 2.4 RESULTS

### *Ikaros is expressed in early progenitors and early-born neurons*

To examine the potential role of Ikaros in RPC temporal competence, we first defined its expression pattern during retinal development by in situ hybridization. We found that Ikaros mRNA is expressed in the developing retina from early embryonic to late postnatal stages (Fig. 1A-D). We detected a more intense signal in the proliferative zone of the retinal neuroepithelium throughout retinal development, suggesting high expression of Ikaros in RPCs. Ikaros mRNA was also detected in cell layers containing differentiated neurons, but at lower levels than in the proliferative zone. These results suggest that Ikaros is expressed in RPCs in the developing retina and could play a part in regulating cell fate decisions.

To precisely define the temporal and spatial expression pattern of the Ikaros protein during retinal development, we stained retinal sections at different stages with a previously characterized monoclonal antibody raised against Ikaros (clone 4E9; (Kim et al., 1999)). At early embryonic stages in the rat retina, we found that the vast majority of RPCs stained for Ikaros, whereas the proportion of Ikaros-positive RPCs decreased progressively over time (Fig. 1E-H). At postnatal day 2 (P2), although there were still many proliferating RPCs, as detected by staining for proliferating cell nuclear antigen (PCNA), only a few rare RPCs were Ikaros-positive (Fig. 1 H-K). At E18 and P2, Ikaros was also detected in the ganglion cell layer (GCL) and the inner nuclear layer (INL), which contain the cell bodies of differentiated neurons. Consistently, in the mature retina, Ikaros-positive cells were detected in the INL and GCL (Fig. 2). These Ikaros-positive cells stained for Pax-6, a marker of horizontal, amacrine, and ganglion cells in the adult retina (Fig. 2A-C). To precisely identify the Ikaros-positive cells in the adult retina, we stained with antibodies against specific markers of the different retinal cell types such as Lim-1 and Calbindin for horizontal cells, Pax6 and Calbindin for amacrine cells, and Brn3b for ganglion cells, and we found that all three cell types expressed Ikaros (Fig 2A-L). In contrast, late-born bipolar cells, detected by PKC $\alpha$  expression, and Müller cells, detected by cyclin-D3 expression, did not stained for Ikaros (Fig. 2 M-R). In addition, Ikaros-positive cells were never observed in the

photoreceptor cell layer. Taken together, these results indicate that the Ikaros protein is detected in early RPCs during development, and in early-born cell types in the adult retina, suggesting that Ikaros could play a part in regulating early temporal competence in RPCs.

### ***Misexpression of Ikaros in late RPCs induces early-born cell type production***

To determine whether Ikaros expression is sufficient to confer early temporal competence, we forced Ikaros expression in late RPCs, which do not normally express Ikaros, and asked whether these cells could generate early-born cell types. To do this, we used a replication-incompetent retroviral vector encoding Ikaros, together with placental alkaline phosphatase (AP) (Supplementary Fig. 1). We injected this retroviral vector, or a control vector expressing AP only, into the subretinal space of P1 mice and 20 days later we analyzed the clones generated. The cells generated from an infected RPC were visualized using AP activity, and identified based on their morphology, position of their cell body within the retinal layers, and expression of cell-type specific markers (Supplementary Fig. 1). As expected, control clones contained the three major cell types generated after birth: rod photoreceptors, bipolar cells, and Müller cells, as well as a small proportion of amacrine cells that are still generated postnatally (Fig. 3A). In contrast, observation of Ikaros-expressing clones revealed dramatic changes in clonal composition. Very few photoreceptors were found in the Ikaros-expressing clones (7% compared to 71% in controls). As postmitotic photoreceptors do not normally express Ikaros (see Figure 2), and because the reduction in photoreceptors did not appear to be accompanied by a compensatory increase in absolute number of other cell types, it suggested to us that forced Ikaros expression in postmitotic photoreceptors might trigger cell death specifically in these cells. To test this possibility, we prepared retinal explants from P1 mice and infected them with the retroviral vector expressing Ikaros or a control retroviral vector. We then fixed the explants at different times after infection and counted the proportion of photoreceptor cells generated. Although the proportion of photoreceptors produced after misexpression of Ikaros was indistinguishable from that of controls 4 days after infection, the proportion of photoreceptors in Ikaros-infected explants rapidly decreased in the following days, suggesting that they were undergoing cell death (Supplementary Fig. 2A-I). Staining for activated caspase-3 and TUNEL confirmed that many photoreceptor cells overexpressing

Ikaros were undergoing apoptosis, whereas other cell types were not affected (Supplementary Fig. 2J-O). In control-infected explants, caspase-3 and TUNEL-positive photoreceptor cells were not found. These results indicate that Ikaros misexpression does not affect the initial generation of photoreceptors, but it eventually leads to photoreceptor cell death. Because photoreceptors are the most abundant cell type in the retina, and the majority of the clones contain only photoreceptor cells, we excluded photoreceptor cells from the following clonal analysis to avoid a misrepresentation in the proportions of non-photoreceptor cell types due to the specific photoreceptor cell death in the Ikaros misexpressing clones.

Detailed analysis of the clones generated in vivo following Ikaros misexpression revealed that  $16.6 \pm 3.3\%$  of the clones contained at least one horizontal cell, whereas clones containing horizontal cells were never observed in controls. In addition, the proportion of clones containing at least one amacrine cell was dramatically increased in Ikaros-expressing clones compared to controls ( $33.7 \pm 1.8\%$  vs.  $2.1 \pm 0.8\%$ ). Remarkably, some two-cell clones contained a bipolar cell together with a horizontal cell after Ikaros misexpression (Fig. 3B). As horizontal cells are normally generated between E12 and E16, and bipolar cells are mostly generated between P0 and P5, it was unusual to find the two cell types in the same clone containing only two cells. Such clones were never observed in controls. In addition, several Ikaros-expressing clones contained more than two amacrine cells, whereas clones containing multiple amacrine cells were rarely observed in controls (Fig. 3C). The amacrine cells and horizontal cells produced following Ikaros misexpression stained for their typical markers Syntaxin and Lim-1 (Fig. 3 D-I), indicating that they differentiated normally. Consistent with their expression of specific markers, amacrine and horizontal cells displayed their usual morphology, and were positioned normally within the retinal layers (Fig. 3 B, C). These results demonstrate that Ikaros misexpression in late RPCs is sufficient to confer early temporal competence, allowing them to resume early-born cell type production.

Quantification of the proportion of the different cell types generated in the clones revealed that the increase in the generation of early-born amacrine and horizontal cells following Ikaros misexpression was at the expense of the late-born Müller and bipolar cells (Fig. 3J).



Importantly, in our timecourse analysis of cell death in retinal explants (Supplementary Fig. 2), we did not observe Müller and bipolar cell death following Ikaros misexpression indicating that, unlike photoreceptor cells which are generated normally and then undergo cell death, Müller and bipolar cells production from Ikaros-misexpressing RPCs is decreased. Interestingly, the size of the clones produced by RPCs misexpressing Ikaros was not significantly different from that of control clones (Fig. 3K), suggesting that ectopic expression of Ikaros in late RPCs confer the competence to generate early-born cell types, but it does not reset their proliferation capacity to that of an early embryonic RPC.

Another cell type generated early during retinal development is the retinal ganglion cell (RGC), but we did not observe any RGC production following Ikaros misexpression in P1 RPCs *in vivo*. At least two different possibilities could explain this result. First, Ikaros expression alone may not be sufficient to induce RGC production. Second, negative feedback signals, which are known to prevent the production of RGCs at late stages of retinogenesis *in vivo* (Waid and McLoon, 1998; Wang et al., 2005), could override Ikaros expression in late RPCs and prevent RGC production. To test this latter possibility, we removed late RPCs from the influence of negative feedback signals operating *in vivo* by placing them in dissociated low-density cultures. After plating, the RPCs were infected with a retroviral vector expressing Ikaros and GFP as a reporter, or with a control retroviral vector expressing only GFP. Four days later, the cells were fixed and stained for Brn3b, a specific marker of RGCs. In this assay, a GFP-positive cell indicates that it was generated in culture since retroviral vectors infect only dividing cells. Among the total Brn3b-positive cells in the control culture, we did not find any that were GFP-positive, confirming that RGCs are not generated from late RPCs. Remarkably, however, more than 12% of the Brn-3b-positive cells in the Ikaros-infected cultures were also GFP-positive (Fig. 3L-N), suggesting that Ikaros misexpression in late RPCs is sufficient to confer the competence to generate RGCs, at least in culture.

We next wanted to determine whether maintaining Ikaros expression in RPCs throughout retinogenesis would prevent RPCs from generating late-born retinal cell types. To help address this question, we infected E13 retinal explants with the Ikaros retroviral vector and 17 days later we analyzed the clones generated. Consistent with our misexpression results at

P1, we found an increase in early-born cell type production following Ikaros misexpression, but bipolar cells and Müller cells were still generated in the clones (not shown). These results indicate that RPCs forced to continuously express Ikaros can still generate late-born cell types, suggesting that down-regulation of Ikaros expression is not necessary for RPCs to progress to a late temporal competence state.

***Inactivation of Ikaros specifically reduces the generation of early-born retinal cell types in vivo***

To determine whether Ikaros is required for normal production of early-born cell types in vivo, we first analyzed the developing retina of Ikaros knockout ( $IK^{-/-}$ ) mice at different stages of early-born cell type production. At E13, when RGCs are being generated, we found that the number of Brn3b and Islet-1-positive cells, two specific markers of RGCs at this stage, was significantly reduced in the  $IK^{-/-}$  retinas (Fig. 4A-F). In addition, the expression of the bHLH transcription factor Math5, which is required for RGC genesis, was significantly decreased in E13  $IK^{-/-}$  retinas compared to wildtypes (Fig. 4G-I). At E16, when most amacrine cells and horizontal cells are generated, we found that the number of cells expressing Lim1, a specific marker of horizontal cells, and NeuroD1, a bHLH transcription factor required for amacrine cell genesis, was significantly reduced in  $IK^{-/-}$  retinas (Fig. 4J-O). In contrast, expression of the cone-rod homeobox (Crx) transcription factor, a key regulator of photoreceptor cell fate specification, was not changed in E16  $IK^{-/-}$  retinas (Fig. 4P-R). These results suggest that inactivation of Ikaros specifically decrease early-born cell type production.

The reduced number of early-born cell types in the  $IK^{-/-}$  retina could be explained by a specific increase in cell death in these cell populations. To test this possibility, we compared the number of TUNEL-positive cells in  $IK^{-/-}$  and wildtype retinas at different stages of development. We did not find any increase in cell death in  $IK^{-/-}$  retinas compared to wildtypes at E13, E16 and P3 (Supplementary Fig. 3), suggesting that the reduced number of early-born cell types observed in the E13 and E16  $IK^{-/-}$  retinas is not caused by increased cell death. These results suggested that the reduced production of early-born cell types in  $IK^{-/-}$  retinas might be due to decreased proliferation. To study the effect of Ikaros inactivation on

cell proliferation, we stained retinal sections of  $IK^{-/-}$  or wildtype littermates for phosphohistone H3, a marker of mitotic cells, at different stages of retinal development. At E13, we found a significant decrease in cell proliferation in  $IK^{-/-}$  retinas compared to wildtypes (Fig. 5A-C). Interestingly, cell proliferation at E16 and P0 was no longer affected (Fig. 5D-F and not shown). These results suggest that inactivation of Ikaros causes a transient reduction in RPC proliferation, specifically in the early stages of retinogenesis.

The decrease in cells expressing markers of early-born cell types at E13 and E16 in the  $IK^{-/-}$  retina could be due to a delay in their generation. If this were the case, the number of early-born cell types would be expected to have reached control values in the adult  $IK^{-/-}$  retina. However, because other Ikaros family members are expressed in the developing retina (Supplementary Fig. 4), a normal number of early-born cell types in the adult retina could be due to functional compensation by other family members. To exclude this possibility, we also analyzed the retinas of a different Ikaros mutant mouse, which contains a deletion in the DNA binding domain. This mouse produces a dominant negative form of Ikaros ( $IK^{DN}$ ), which can interact with proteins produced by the *ikaros* locus or with other family members and compromise their activity. This mouse mutant has a more severe immunological phenotype than the  $IK^{-/-}$  mouse and  $IK^{DN/DN}$  mice die in the first postnatal week, so we studied the adult retinas of heterozygous  $IK^{DN/+}$  mice.

Histological analysis of both adult  $IK^{-/-}$  and  $IK^{DN/+}$  retinas first revealed that the inner nuclear layer (INL) and the ganglion cell layer (GCL), which contain the cell bodies of the early-born cell types, were thinner and contained fewer cells than wildtype littermates, whereas the outer nuclear layer (ONL), which contains the cell bodies of photoreceptor cells, was not different and contained similar number of cells as wildtype littermates (Fig. 6A-D). These results suggest that the decrease in early-born cell type production observed in the embryonic retina is not compensated at later stages of retinal development.

To more precisely determine whether early-born cell types are specifically decreased in the  $IK$  mutant retinas, we stained for cell-type specific markers of RGCs (Brn3b), horizontal cells (Lim-1, calbindin), and amacrine cells (syntaxin, Pax6) (Fig. 6E-M and not shown). The number of cells expressing these markers was significantly reduced in  $IK$  mutant retinas

compared to wildtypes. In contrast, the number of cone photoreceptors, another early-born cell type, was not changed in IK mutants, as judged by staining for cone opsin (Fig. 6N-P). Importantly, the production of late-born retinal cell types was not affected in IK mutants, as we found no difference in the number of cells expressing markers of bipolar cells (CaB5 and PKC-alpha) and Müller cells (CyclinD3) (Fig. 6Q-V). These results indicate that inactivation of Ikaros leads to a specific reduction of early-born cell types in the mature retina, without affecting late-born retinal cell types.

## 2.5 DISCUSSION

We report here that Ikaros confers early temporal competence to RPCs. We find that, during retinal development, Ikaros is expressed in early, but not late, RPCs. Misexpression of Ikaros in late RPCs is sufficient to confer the competence to generate early-born retinal cell types, including RGCs, horizontal cells, and amacrine cells. In addition, we find that Ikaros mutant retinas have a reduced number of early-born cell types, whereas late-born cell types are unaffected. Together, these results suggest a model in which Ikaros expression confers early temporal competence to RPCs so that they can generate early-born retinal cell types. We discuss this model and its implications below.

### *Role of Ikaros in RPCs and early-born neurons*

An interesting observation in this study is that the patterns of Ikaros mRNA and protein expression do not completely overlap. Although we detect both Ikaros mRNA and protein in the proliferative zone of the retinal neuroepithelium containing the RPCs, we find the Ikaros protein but not its mRNA in differentiated early-born neurons, whereas we detect Ikaros mRNA but not its protein in photoreceptors at P9. A number of possibilities could account for the differences in protein and mRNA expression, including particular Ikaros isoforms that are not recognized by the RNA probe, high stability of the Ikaros protein in postmitotic neurons, and mRNA or protein modifications. A recent study demonstrated the importance of mRNA 3'UTR modification in regulating translation as a way of controlling chronological order of cell birth during neurogenesis in the *Xenopus* retina (Decembrini et al., 2006). The Ikaros protein has also been reported to interact with components of the SUMO pathway, and SUMOylation of the Ikaros protein lead to the loss of its repression activity (Gomez-del Arco et al., 2005). It will be important to determine how Ikaros expression is regulated at the mRNA and protein levels in RPCs and postmitotic neurons, as these mechanisms may be at the heart of a temporal program operating in RPCs to regulate chronological order of cell birth.

Our finding that the Ikaros protein is detected in early-born neurons in the mature retina is similar to the findings in *Drosophila*, where Hunchback expression is maintained in the differentiated neurons that originate from Hunchback-positive neuroblasts (Brody and Odenwald, 2000; Isshiki et al., 2001). What could be the function of Ikaros in differentiated neurons in the retina? One possibility is that Ikaros might contribute to maintain the differentiation status of early-born neuron. Conditional inactivation of Ikaros and other family members in postmitotic neurons should help in addressing this question.

### *Ikaros as a regulator of early temporal competence*

The present findings, together with previously reported results, support the hypothesis that Ikaros acts to confer early temporal competence to RPCs, rather than to instruct specific cell-fate decisions. First, cell lineage studies initiated at E13-14 in the mouse retina revealed that a significant proportion of clones contained only photoreceptors or photoreceptors and bipolar cells, which are both generated late in development (Turner et al., 1990). It is likely that the RPCs that gave rise to these clones have expressed Ikaros at early stages, as we find that virtually all RPCs express Ikaros at early embryonic stages. Second, although misexpression of Ikaros in late RPCs increases the production of early-born cell types at the expense of late-born cell types, it does not completely abolish late-born cell type production, and some clones do not contain early-born cell types at all. Third, Ikaros misexpression in late RPCs does not increase one specific cell type, but instead causes a general increase in the production of early-born cell types. These results strongly suggest that the presence of Ikaros is not instructive, but is instead permissive for the production of early-born cell types. This is in contrast to other previously identified so called competence factors. For example, the bHLH transcription factor Math5 is thought to determine the competence state of retinal ganglion cell precursors (Brown et al., 1998; Mu et al., 2005a; Yang et al., 2003). Math5, however, is not expressed in RPCs, but acts in postmitotic RGC precursors to activate the expression of transcription factors involved in RGC differentiation (Yang et al., 2003). In addition, Math5 expression alone is not sufficient to induce RGC generation from late RPCs, and Math5-expressing cells have been shown to give rise to other cell types that are generated at both early (amacrine and horizontal cells) and late (photoreceptor cells) stages of retinogenesis (Yang et al., 2003). As we find that Math5 expression is significantly

reduced in  $IK^{-/-}$  retinas, our results suggest that Ikaros acts upstream of Math5. Recently, SOX2 was proposed to act as a regulator of RPC competence (Taranova et al., 2006). In contrast to Ikaros, however, SOX2 appears to regulate the general competence of RPC to proliferate and differentiate rather than to directly control temporal competence to generate a class of cell types produced at a specific time in development. Another recently identified competence factor is GDF11, a member of the TGF- $\beta$  family of signaling molecules. Unlike Ikaros, GDF11 is a secreted protein and apparently acts by regulating the time window that RPCs express certain transcription factors involved in RGC genesis such as Math5, without affecting RPC proliferation (Kim et al., 2005). Thus, GDF11 is a negative feedback signal that prevents prolonged RGC production, whereas Ikaros is a positive, cell-intrinsic regulator of early temporal competence in RPCs. These observations raise the possibility that GDF11 might control the timing of Ikaros expression. This possibility appears unlikely, however, as the number of horizontal cells is unchanged in the GDF11 mutant mice (Kim et al., 2005), whereas horizontal cells are reduced in Ikaros mutant mice (this study). It remains possible, however, that GDF11 acts in concert with another factor to regulate Ikaros expression.

Consistent with Ikaros regulating early temporal competence, we find that the number of Ikaros-positive RPCs gradually decreases over time during retinal development. By P2, less than 1% of RPCs express Ikaros, whereas at P4 no RPCs express Ikaros. Because some amacrine cells are still generated at P2, we propose that the few RPCs that express Ikaros in the postnatal retina are those that are still competent to give rise to amacrine cells. Although Ikaros apparently regulates the competence to generate early-born cell types, one exception appears to be the cone photoreceptors. In the mature retina, Ikaros is not expressed in rod or cone photoreceptor cells, and we find that the number of cone photoreceptor cells is not affected in the  $IK^{-/-}$  retinas. This result suggests that the mechanisms regulating temporal competence to generate cone photoreceptors do not depend on Ikaros. Interestingly, we find that a small proportion of RPCs do not express Ikaros at E13, suggesting that these cells may represent a subpopulation of RPCs that express a different temporal competence factor to generate cones. Alternatively, these Ikaros-negative cells at E13 may actually be newly differentiated, postmitotic cones, which do not express Ikaros.

One of the most interesting findings in this study is that misexpression of Ikaros alone in late RPCs is sufficient to confer competence to generate early-born neurons. This result is strikingly similar to experiments in *Drosophila* in which Hunchback was reintroduced in older neuroblasts, which then resumed the generation of early-born GMCs (Pearson and Doe, 2003). Another similarity between our Ikaros misexpression results in late RPCs and the misexpression experiments of Hunchback in *Drosophila* neuroblasts is that temporal competence appears to be independent of proliferation capacity (Pearson and Doe, 2003). In both cases, misexpression of Ikaros or Hunchback increased early-born cell type production at the expense of late-born cell types, and did not significantly increase clone size. Despite these similarities with Hunchback misexpression experiments, there are some differences. In *Drosophila*, young neuroblasts that are forced to continue to express Hunchback exclusively generate early-born GMCs (Isshiki et al., 2001). In contrast, early E13 RPCs forced to continually express Ikaros give rise to more early-born neurons but can still progress to generate late-born neurons. These results suggest that down-regulation of Ikaros expression is not required for RPCs to make late-born neurons. An attractive possibility to explain this result is that the expression of a late temporal competence regulator is required for production of late-born neurons and this factor can work even in the presence of Ikaros.

#### ***A model of temporal competence in the developing retina***

Are all RPCs born equal and then “learn” their temporal competence from their environment, or are they intrinsically preprogrammed to change their competence to generate particular cell types over time? Several lines of evidence support the latter possibility. First, RPCs are heterogeneous and do not necessarily have the same temporal competence at any specific time. For example, at mid to late embryonic stages, some RPCs are still competent to generate early-born cell types, whereas others have lost this competence and acquired the competence to generate late-born retinal cell types. Based on these observations, it is difficult to imagine how a single environmental signal could provide the temporal cues for a population of heterogeneous RPCs. Our finding that Ikaros becomes expressed in a sub-population of RPCs at mid stages of retinogenesis suggests a potential molecular explanation for this heterogeneous temporal competence of RPCs. Ikaros-positive RPCs might be competent to give rise to early-born cell type, whereas Ikaros-negative RPCs



might have lost this competence. Second, even when isolated in clonal-density cultures, RPCs can give rise to clones that contain the same number of cells and the same proportion of cell types as clones that develop *in vivo* (Cayouette et al., 2003). As the *in vitro* and *in vivo* environments are very different, this suggests an important role for intrinsic developmental programs that regulate temporal competence. Third, there is increasing evidence for reproducible lineages giving rise to specific combinations of cell types in the vertebrate retina (Cayouette et al., 2006; Poggi et al., 2005). Together, these observations suggest that cell-intrinsic mechanisms act in RPCs to control temporal competence and our data indicate that Ikaros might be one of these potential intrinsic regulators of temporal competence.

As other Ikaros family members are also expressed in the developing retina, we cannot exclude the possibility that other members act together with Ikaros to regulate temporal competence. In support of this possibility, we find that the retinal phenotype of the  $IK^{DN/+}$  mouse is slightly more severe than that of the  $IK^{-/-}$  mouse. Although it was previously demonstrated that the dominant-negative protein produced in the  $IK^{DN/+}$  mouse can interfere with the function of Aiolos and Helios (Winandy et al., 1995), it remains unclear whether it can also block Eos and Pegasus function efficiently. If not, then it is possible that Eos and Pegasus partially compensate in both the  $IK^{-/-}$  and  $IK^{DN/+}$  mouse, which would explain the incomplete loss of early-born cell types in these mutants. Alternatively, Ikaros might function together with another, yet unidentified factor, that can partially compensate for the Ikaros inactivation. Another possibility is that some combinatorial code of Ikaros family member expression in subtypes of RPCs might function to regulate temporal competence more precisely. At this time, however, it remains unknown whether a particular RPC can express different combination of Ikaros family members. The generation of specific antibodies should help resolve this issue.

Based on our data, we propose the following model (Fig. 7). In large multipotent lineages, Ikaros-positive RPCs constitute the beginning of the lineage and give rise to Ikaros-negative RPCs at the end of the lineage. Expression of Ikaros in early RPCs confers competence to generate early-born cell types, whereas Ikaros-negative RPCs give rise to late-born retinal cell types. Our finding that the number of proliferating cells is reduced at E13 but is no

longer affected by E16 in  $IK^{-/-}$  retinas suggest that RPCs either slow down or stop their cell cycle during the period when Ikaros is required to specify temporal competence, but then resume normal proliferation once the RPCs no longer require Ikaros. This is an interesting observation as it suggests that temporal competence is specified independently of cell-cycle progression, as the progression to late temporal competence stage still occurs normally in the  $IK^{-/-}$ . *Drosophila* neuroblasts can also apparently specify temporal identity independently of cell-cycle progression. In the neuroblast lineage, although the Hunchback-to-Krüppel transition requires cytokinesis, the Krüppel-to-Pdm1-to-Castor transitions occur normally in G2-arrested neuroblasts (Grosskortenhaus et al., 2005). A similar cell-cycle independent differentiation timing mechanism has been proposed for the oligodendrocyte lineage (Durand and Raff, 2000), which differentiate faster, after fewer divisions, when their cell cycle is slowed down by cooling to 33°C (Gao and Raff, 1997). It will be interesting to directly determine whether the transition from Ikaros-positive to Ikaros-negative RPCs is dependent on cell-cycle progression.

#### ***Mechanism of Ikaros-mediated regulation of early temporal competence***

The mechanism by which Ikaros might regulate temporal competence in RPCs remains unknown. During hematopoiesis, Ikaros can function as a potentiator of gene expression in T-cell development, apparently by recruiting Swi/Snf chromatin-remodeling complexes to specific cell-fate-decision genes (Harker et al., 2002; Koipally et al., 2002). Interestingly, a recent study has shown that a switch in subunit composition of neural SWI/SNF-like chromatin remodeling complexes accompanies the developmental transition from neural stem cells to committed neuronal lineages (Lessard et al., 2007). It will be interesting to determine whether Ikaros is involved in this switch. Ikaros can also act as a transcriptional repressor by associating with the histone deacetylase (HDAC)-containing complexes such as NuRD and Sin3 (Koipally et al., 1999). Based on these results, it is tempting to speculate that Ikaros might act by regulating chromatin conformation around genes involved in cell-fate specification and differentiation. In the retina, Ikaros could potentiate the expression of genes important for early-born cell type production. Consistent with this possibility, we find that, in addition to the reduced number of cells expressing early-born cell-type specific markers, the level of expression of these markers, especially transcription factors, is

generally lower in  $IK^{-/-}$  retinas compared to controls. Alternatively, Ikaros might work in early RPCs by silencing genes involved in late-born cell type production. A recent bioinformatics study identified a potential functional role for an Ikaros motif in retina-specific genes (Nelander et al., 2005). It will be interesting to determine experimentally whether these genes are under the control of Ikaros in RPCs and in differentiated retinal cell types.

In conclusion, our findings point to Ikaros as a key regulator of early temporal competence, thereby controlling the normal chronological order of cell birth. Our results have potential implications for cell replacement therapies, as we have shown that re-expression of a single gene into late, lineage-restricted RPCs, can turn them into RPCs with the differentiation potential of early multipotent RPCs, without resetting their proliferation potential. This suggests that, in theory, lineage-restricted neural progenitors could be manipulated to behave more like “stem cells” as far as their differentiation potential is concerned, but without the inconvenient of indefinite cell proliferation, which can lead to tumor formation.

## 2.6 MATERIALS AND METHODS

### *Animals*

All animals work was carried in accordance to the Canadian Council on Animal Care guidelines. CD1, Ik Null (Wang et al., 1996) and Ik DN mice (Georgopoulos et al., 1994) on C57/B6 backgrounds and Sprague Dawley rats were used in this study.

### *Retroviral vector constructions and production*

The retroviral vectors expressing Ikaros and a reporter gene were constructed by cloning the Ikaros full length cDNA into the pCLE (Gaiano et al., 1999) or LZRS (Christopherson et al., 2001) retroviral vectors. The retroviral vectors were prepared and purified as previously described (Cayouette et al., 2003).

### *Subretinal injections and clonal analysis*

Mice were injected subretinally at P1 with 1 $\mu$ l of pCLE-AP, encoding human placental alkaline phosphatase (Gaiano et al., 1999) or with LZRS-EGFP (Christopherson et al., 2001) into one eye and the other eye was injected with a retroviral vector encoding Ikaros and the reporter genes EGFP or AP. The eyes were collected at P21 and sectioned. For the detection of alkaline phosphatase activity, retinal sections were first fixed in paraformaldehyde 4% for 1 hour and then immersed in PBS at 65 °C for 1 hour. The eyes were then immersed in a solution of 4-nitro blue tetrazolium chloride (NBT/BCIP, Roche) or with Sigma Fast Red (Sigma) at 37 °C until desired level of staining was achieved.

### *Retinal explants and dissociated retinal cell culture*

For in vitro experiments, retinal explants from embryonic or postnatal ages were prepared as previously described (Cayouette et al., 2001). For dissociated cell cultures, retinas were

dissected in PBS, dissociated and plated as described (Cayouette et al., 2003). 150 000 cells were plated and cultured on glass coverslips for 3-4 days.

### ***Probes and in situ hybridization***

Digoxigenin-labelled RNA probes were synthesized using T3, T7 or SP6 RNA polymerases. Ikaros and Pegasus cDNA were cloned into PCRII-TOPO (Invitrogen) from pCDM8-Ik1 (from K. Georgopoulos) and pYX-Pegasus (Open biosystems). To make the Helios, Aiolos, and Eos probes, the full coding sequences (Helios nt145-1725; Aiolos nt283-1805; Eos nt753-2354) were cloned from P0 mouse brain or retina cDNAs and sub-cloned into PCRII-TOPO for probe synthesis. Crx (From C. Cepko) and Math5 (From N. Brown) probes have been described elsewhere.

For in situ hybridization, eyes were collected and frozen immediately in OCT, sectioned, air-dried for 30 minutes, and fixed in PFA 4% for 20 minutes. Sections were then digested with 2 ug/ml of proteinase K at room temperature for 20 minutes. Hybridization was done at 65°C overnight with 300ng/ml of RNA probes in the hybridization buffer (50% formamide, 5X SSC, 5X Denhardt's, 5mg/ml of Torula RNA, 500ug/ml fish sperm DNA). The probes were detected with an anti-Dig-AP antibody (1:3500, Roche). The AP activity was revealed using the 4-nitro blue tetrazolium chloride (NBT/BCIP, Roche).

### ***Histology, Immunofluorescence and TUNEL***

The eyes were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde, cryoprotected in sucrose 20%, frozen and embedded in a mix sucrose:OCT (1:1). Cryostat sections (12 um) were collected on Superfrost plus slides. For immunofluorescence, retinas were sectioned and processed for staining on the same day. Slides were preincubated 30 minutes in antibody buffer (NaCl 50mM, Tris Base 50mM, BSA 1%, L-Lysin 100mM, Azide 0.04%, pH 7.4) containing 0.4% Triton and 10% serum and then incubated overnight at 4°C with the primary antibodies (see supplementary table 1) diluted in antibody buffer. For anti-Ikaros immunostaining, rat retinal sections were used to increase signal to noise ratio, which was lower on mouse tissue. The monoclonal anti-Ikaros antibody we used was previously reported to be specific for

Ikaros and not recognize Aiolos and Helios. We independently tested that this antibody does not recognize overexpressed Eos and Pegasus in NIH-3T3 cells. Similar immunostaining results were also obtained using a different polyclonal antibody against Ikaros (Hahm et al., 1994).

Bound antibodies were detected with Goat anti mouse or rabbit Alexa 488 or 555 (1:1000; Molecular Probes) diluted in Antibody buffer at Room temperature for 1 hour. For Brn3B detection, sections were incubated in 0.3% peroxide in PBS for 1 hour at room temperature, then incubated with a Donkey anti-Goat biotinylated secondary antibody (1:400; Jackson immunoresearch) diluted in TSA blocking buffer (1%; Molecular Probes) followed by an incubation with Avidin Biotin Complex (ABC elite; Vector laboratories) for 30 minutes. HRP was revealed using a Tyramide signal amplification kit (Molecular probes).

To detect apoptotic cells, retinal sections were processed for Terminal dUTP-Nick End Labelling (TUNEL), using Apoptag Plus kit (Chemicon) according to the recommendations of the manufacturer.

### ***Quantitative analysis***

The number of cells expressing the different cell-type specific markers was quantified by averaging the total number of positive cells on three different retinal sections at E13 and E16 centered around the optic nerve head. The proportions obtained were always adjusted relative to wildtype littermates values to avoid small differences in developmental stages from one litter to another. In the adult retina, the average number of positive cells from three regions of 100-250  $\mu\text{m}$  in the midperipheral retina at the level of the optic nerve taken from both retinal hemispheres was counted for each animal. For in situ, pixel intensity from three different sections per animal was quantified using Matlab. Statistical comparisons were done using Student's T-test.

***RT-PCR***

Total RNA was extracted from both retinas of each animal at different ages using the RNeasy kit (Quiagen). 4 ug of RNA was reverse-transcribed using the Expand RT (Roche) in a volume of 20  $\mu$ l and 1  $\mu$ l of the cDNA mixture subjected to 30 rounds of PCR amplification using 100 nM of primers. Primers used are shown in Supplementary Table 2.

## **2.7 ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Katia Georgopoulos for the Ikaros null and Ikaros dominant-negative mice and the monoclonal Ikaros antibody, Stephen Smale for Ikaros antibodies, Nadean Brown for the Math5 probe, Connie Cepko for the Crx probe, Thomas Jessell for the Lim-1 antibodies, Jeremy Nathans for the cone opsin antibodies, and Jacques Drouin for the NeuroD antibody. We are grateful to Martin Raff, Jacques Drouin, Frédéric Charron, Artur Kania, and Jonah Chan for insightful comments on the manuscript. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research and the Foundation Fighting Blindness – Canada.



## 2.8 REFERENCES

- Agoston, D. V., Szemes, M., Dobi, A., Palkovits, M., Georgopoulos, K., Gyorgy, A., and Ring, M. A. (2007). Ikaros is expressed in developing striatal neurons and involved in enkephalinergic differentiation. *J Neurochem*.
- Brody, T., and Odenwald, W. F. (2000). Programmed transformations in neuroblast gene expression during *Drosophila* CNS lineage development. *Dev Biol* 226, 34-44.
- Brown, N. L., Kanekar, S., Vetter, M. L., Tucker, P. K., Gemza, D. L., and Glaser, T. (1998). Math5 encodes a murine basic helix-loop-helix transcription factor expressed during early stages of retinal neurogenesis. *Development* 125, 4821-4833.
- Cayouette, M., Barres, B. A., and Raff, M. (2003). Importance of intrinsic mechanisms in cell fate decisions in the developing rat retina. *Neuron* 40, 897-904.
- Cayouette, M., Poggi, L., and Harris, W. A. (2006). Lineage in the vertebrate retina. *Trends Neurosci*.
- Cayouette, M., Whitmore, A. V., Jeffery, G., and Raff, M. (2001). Asymmetric segregation of Numb in retinal development and the influence of the pigmented epithelium. *J Neurosci* 21, 5643-5651.
- Cepko, C. L., Austin, C. P., Yang, X., Alexiades, M., and Ezzeddine, D. (1996). Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 589-595.
- Christopherson, I., Piechoki, M., Liu, G., Ratner, S., and Galy, A. (2001). Regulation of L-selectin expression by a dominant negative Ikaros protein. *J Leukoc Biol* 69, 675-683.
- Cobb, B. S., Morales-Alcelay, S., Kleiger, G., Brown, K. E., Fisher, A. G., and Smale, S. T. (2000). Targeting of Ikaros to pericentromeric heterochromatin by direct DNA binding. *Genes Dev* 14, 2146-2160.
- Cobb, B. S., and Smale, S. T. (2005). Ikaros-family proteins: in search of molecular functions during lymphocyte development. *Curr Top Microbiol Immunol* 290, 29-47.
- Cortes, M., Wong, E., Koipally, J., and Georgopoulos, K. (1999). Control of lymphocyte development by the Ikaros gene family. *Curr Opin Immunol* 11, 167-171.
- Decembrini, S., Andreazzoli, M., Vignali, R., Barsacchi, G., and Cremisi, F. (2006). Timing the generation of distinct retinal cells by homeobox proteins. *PLoS Biol* 4, e272.
- Durand, B., and Raff, M. (2000). A cell-intrinsic timer that operates during oligodendrocyte development. *Bioessays* 22, 64-71.

- Ezzat, S., Mader, R., Fischer, S., Yu, S., Ackerley, C., and Asa, S. L. (2006). An essential role for the hematopoietic transcription factor Ikaros in hypothalamic-pituitary-mediated somatic growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 2214-2219.
- Gaiano, N., Kohtz, J. D., Turnbull, D. H., and Fishell, G. (1999). A method for rapid gain-of-function studies in the mouse embryonic nervous system. *Nat Neurosci* *2*, 812-819.
- Gao, F. B., and Raff, M. (1997). Cell size control and a cell-intrinsic maturation program in proliferating oligodendrocyte precursor cells. *J Cell Biol* *138*, 1367-1377.
- Georgopoulos, K. (2002). Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nat Rev Immunol* *2*, 162-174.
- Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J. H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., and Sharpe, A. (1994). The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* *79*, 143-156.
- Gomez-del Arco, P., Koipally, J., and Georgopoulos, K. (2005). Ikaros SUMOylation: switching out of repression. *Mol Cell Biol* *25*, 2688-2697.
- Grosskortenhaus, R., Pearson, B. J., Marusich, A., and Doe, C. Q. (2005). Regulation of temporal identity transitions in *Drosophila* neuroblasts. *Dev Cell* *8*, 193-202.
- Grosskortenhaus, R., Robinson, K. J., and Doe, C. Q. (2006). Pdm and Castor specify late-born motor neuron identity in the NB7-1 lineage. *Genes Dev* *20*, 2618-2627.
- Hahm, K., Ernst, P., Lo, K., Kim, G. S., Turck, C., and Smale, S. T. (1994). The lymphoid transcription factor LyF-1 is encoded by specific, alternatively spliced mRNAs derived from the Ikaros gene. *Mol Cell Biol* *14*, 7111-7123.
- Hanashima, C., Li, S. C., Shen, L., Lai, E., and Fishell, G. (2004). Foxg1 suppresses early cortical cell fate. *Science* *303*, 56-59.
- Harker, N., Naito, T., Cortes, M., Hostert, A., Hirschberg, S., Tolaini, M., Roderick, K., Georgopoulos, K., and Kioussis, D. (2002). The CD8alpha gene locus is regulated by the Ikaros family of proteins. *Mol Cell* *10*, 1403-1415.
- Isshiki, T., Pearson, B., Holbrook, S., and Doe, C. Q. (2001). *Drosophila* neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny. *Cell* *106*, 511-521.
- Kambadur, R., Koizumi, K., Stivers, C., Nagle, J., Poole, S. J., and Odenwald, W. F. (1998). Regulation of POU genes by castor and hunchback establishes layered compartments in the *Drosophila* CNS. *Genes Dev* *12*, 246-260.

- Kelley, C. M., Ikeda, T., Koipally, J., Avitahl, N., Wu, L., Georgopoulos, K., and Morgan, B. A. (1998). Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors. *Curr Biol* 8, 508-515.
- Kim, J., Sif, S., Jones, B., Jackson, A., Koipally, J., Heller, E., Winandy, S., Viel, A., Sawyer, A., Ikeda, T., *et al.* (1999). Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity* 10, 345-355.
- Kim, J., Wu, H. H., Lander, A. D., Lyons, K. M., Matzuk, M. M., and Calof, A. L. (2005). GDF11 controls the timing of progenitor cell competence in developing retina. *Science* 308, 1927-1930.
- Koipally, J., Heller, E. J., Seavitt, J. R., and Georgopoulos, K. (2002). Unconventional potentiation of gene expression by Ikaros. *J Biol Chem* 277, 13007-13015.
- Koipally, J., Renold, A., Kim, J., and Georgopoulos, K. (1999). Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *Embo J* 18, 3090-3100.
- Lessard, J., Wu, J. I., Ranish, J. A., Wan, M., Winslow, M. M., Staahl, B. T., Wu, H., Aebersold, R., Graef, I. A., and Crabtree, G. R. (2007). An Essential Switch in Subunit Composition of a Chromatin Remodeling Complex during Neural Development. *Neuron* 55, 201-215.
- Livesey, F. J., and Cepko, C. L. (2001). Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nat Rev Neurosci* 2, 109-118.
- Molnar, A., and Georgopoulos, K. (1994). The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 14, 8292-8303.
- Morgan, B., Sun, L., Avitahl, N., Andrikopoulos, K., Ikeda, T., Gonzales, E., Wu, P., Neben, S., and Georgopoulos, K. (1997). Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *Embo J* 16, 2004-2013.
- Mu, X., Fu, X., Sun, H., Beremand, P. D., Thomas, T. L., and Klein, W. H. (2005). A gene network downstream of transcription factor Math5 regulates retinal progenitor cell competence and ganglion cell fate. *Dev Biol* 280, 467-481.
- Nelander, S., Larsson, E., Kristiansson, E., Mansson, R., Nerman, O., Sigvardsson, M., Mostad, P., and Lindahl, P. (2005). Predictive screening for regulators of conserved functional gene modules (gene batteries) in mammals. *BMC Genomics* 6, 68.
- Novotny, T., Eiselt, R., and Urban, J. (2002). Hunchback is required for the specification of the early sublineage of neuroblast 7-3 in the *Drosophila* central nervous system. *Development* 129, 1027-1036.
- Pearson, B. J., and Doe, C. Q. (2003). Regulation of neuroblast competence in *Drosophila*. *Nature* 425, 624-628.

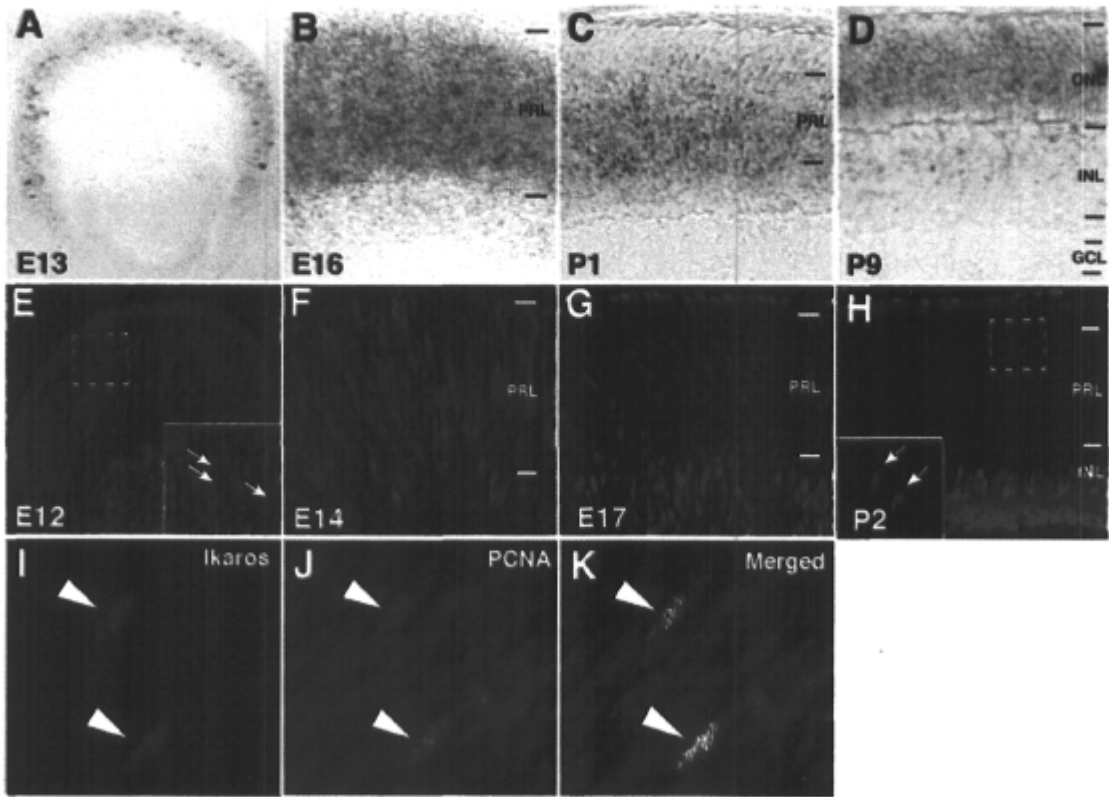
- Perdomo, J., Holmes, M., Chong, B., and Crossley, M. (2000). Eos and pegasus, two members of the Ikaros family of proteins with distinct DNA binding activities. *J Biol Chem* *275*, 38347-38354.
- Poggi, L., Vitorino, M., Masai, I., and Harris, W. A. (2005). Influences on neural lineage and mode of division in the zebrafish retina in vivo. *J Cell Biol* *171*, 991-999.
- Rapaport, D. H., Wong, L. L., Wood, E. D., Yasumura, D., and LaVail, M. M. (2004). Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol* *474*, 304-324.
- Shen, Q., Wang, Y., Dimos, J. T., Fasano, C. A., Phoenix, T. N., Lemischka, I. R., Ivanova, N. B., Stifani, S., Morrisey, E. E., and Temple, S. (2006). The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nat Neurosci* *9*, 743-751.
- Sun, L., Liu, A., and Georgopoulos, K. (1996). Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *Embo J* *15*, 5358-5369.
- Taranova, O. V., Magness, S. T., Fagan, B. M., Wu, Y., Surzenko, N., Hutton, S. R., and Pevny, L. H. (2006). SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. *Genes Dev* *20*, 1187-1202.
- Turner, D. L., Snyder, E. Y., and Cepko, C. L. (1990). Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron* *4*, 833-845.
- Waid, D. K., and McLoon, S. C. (1998). Ganglion cells influence the fate of dividing retinal cells in culture. *Development* *125*, 1059-1066.
- Wang, J. H., Nichogiannopoulou, A., Wu, L., Sun, L., Sharpe, A. H., Bigby, M., and Georgopoulos, K. (1996). Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity* *5*, 537-549.
- Wang, Y., Dakubo, G. D., Thurig, S., Mazerolle, C. J., and Wallace, V. A. (2005). Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog locally controls proliferation and the timing of RGC development in the embryonic mouse retina. *Development*.
- Watanabe, T., and Raff, M. C. (1992). Diffusible rod-promoting signals in the developing rat retina. *Development* *114*, 899-906.
- Winandy, S., Wu, P., and Georgopoulos, K. (1995). A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma. *Cell* *83*, 289-299.
- Yang, Z., Ding, K., Pan, L., Deng, M., and Gan, L. (2003). Math5 determines the competence state of retinal ganglion cell progenitors. *Dev Biol* *264*, 240-254.

Young, R. W. (1985). Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat Rec* 212, 199-205.

## 2.9 FIGURES

### *Figure 1. Ikaros expression during retinal development*

(A-D) In-situ hybridization on mouse retinal sections from E13 to P9 using an antisense riboprobe designed against Ikaros. Note the strong signal in the progenitor cell layer (PRL), as well as in cells located in the inner nuclear layer (INL) and outer nuclear layer (ONL) at P9. (E-H) Immunostaining with a monoclonal Ikaros antibody on rat retinal sections at different stages of development. Ikaros (green) is expressed in most cells at E12, but a few cells are not stained. The dotted line points to the region magnified in the lower-right corner showing Ikaros-negative cells (arrows). At later stages, Ikaros expression is limited to a subpopulation of RPCs in the progenitor layer (PRL), and in some postmitotic cells located in the inner nuclear layer (INL) and ganglion cell layer (GCL). By P2, a few rare Ikaros-positive cells are still detected in the PRL (arrows). The sections were counterstained with Hoechst (blue). (I-K) High magnification of a P2 retinal section stained for Ikaros (green) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA, red). At this stage, a few Ikaros-positive RPCs are still detected, as seen by co-staining with PCNA (arrowheads), but the majority of PCNA-positive RPCs do not express Ikaros.

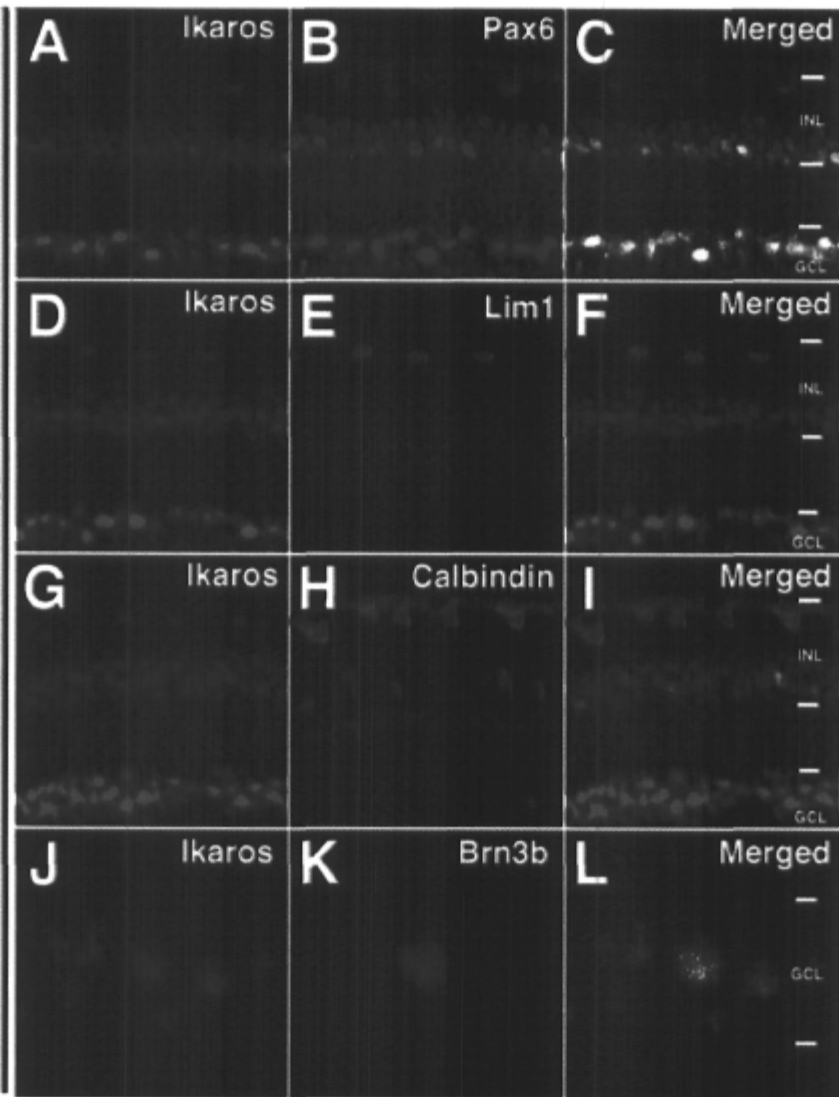


***Figure 2. Ikaros expression in the mature retina***

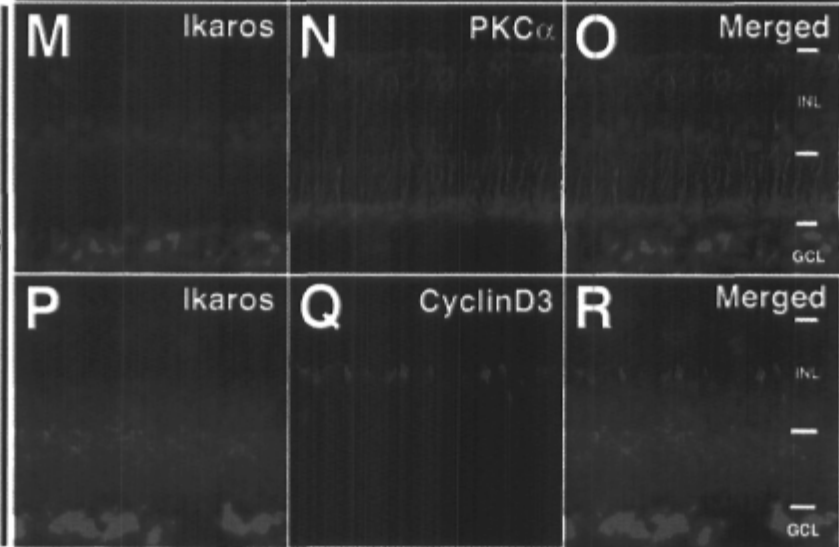
Immunostaining on rat retinal sections for Ikaros (left panels) and various cell-type specific markers (middle panels), as indicated. Right panels show a merged image. Ikaros is detected in the three cell types expressing Pax6 in the adult retina, the amacrine cells, horizontal cells and ganglion cells (A-C). Ikaros expression also co-localizes with Lim1 and Calbindin (D-I), two markers of horizontal cells, and with Brn3b, a marker of RGCs (J-L). However, Ikaros is not expressed in bipolar cells, which are stained for PKC $\alpha$  (M-O), and Müller cells, which are stained for Cyclin D3 (P-R).



**Early-born cell-type markers**

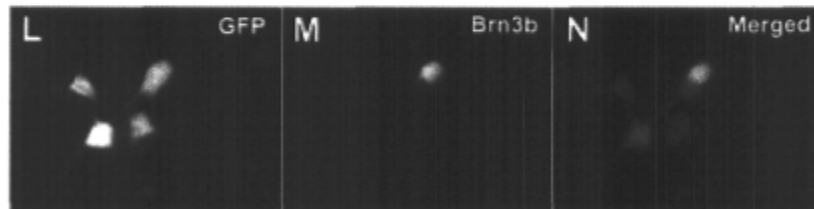
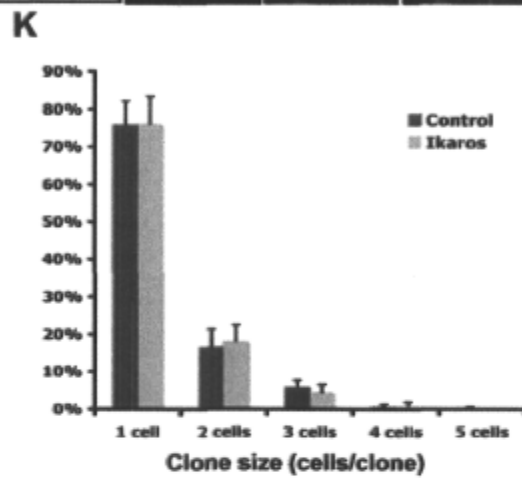
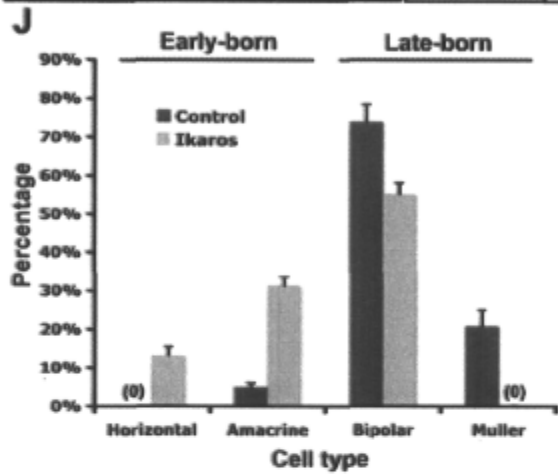
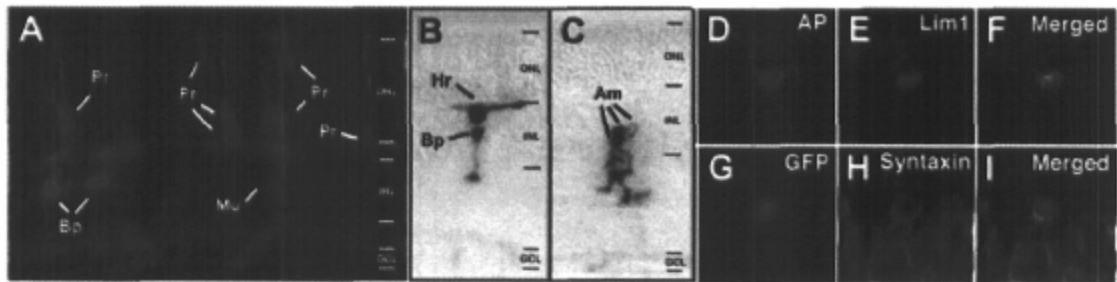


**Late-born cell-type markers**



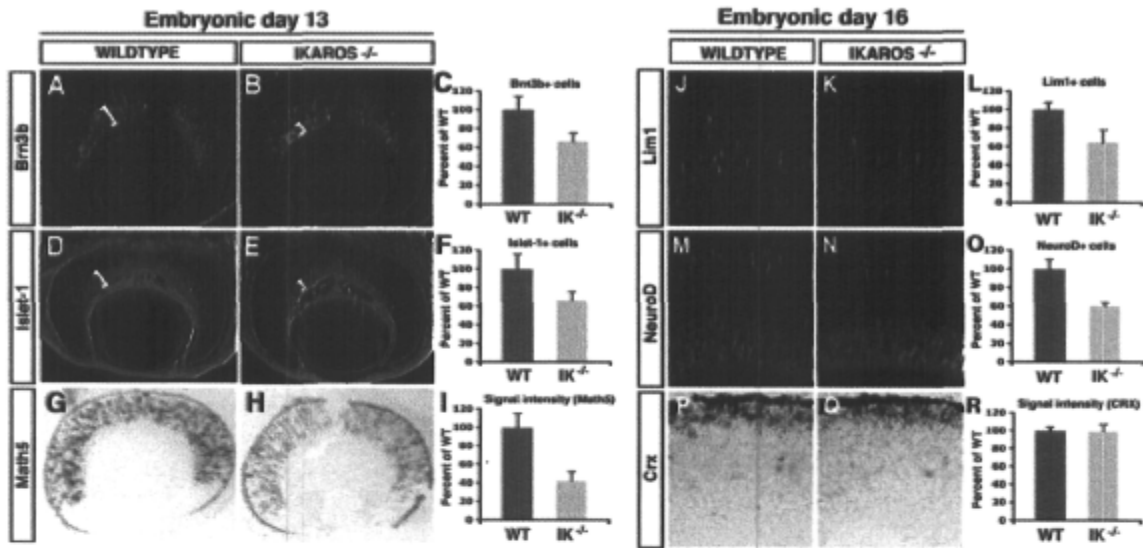
***Figure 3. Ikaros misexpression in late mouse RPCs increases production of early born cell types***

(A) Example of the different cell types obtained in the clones 20 days after infection of the mouse retina at P1 with a control retroviral vector expressing alkaline phosphatase (AP). Clones contain mostly late-born cell types such as photoreceptors (Pr), bipolar cells (Bp), and Müller cells (Mu). The fluorescent substrate FastRed was used to detect AP activity. (B, C) In vivo infection of the mouse retina at P1 with a retroviral vector expressing Ikaros, together with AP as a reporter, show markedly different clones containing early-born cell types such as horizontal cells (Hr) and amacrine cells (Am). In this case, the substrate NBT/BCIP was used, which gives a blue precipitate. (D-I) The early-born cells produced following Ikaros misexpression at P1 were identified by Lim1 staining for horizontal cells (D-F), and syntaxin staining for amacrine cells (G-I). (J) Quantification of the proportion of cells generated in the clones. Ikaros misexpression leads to increased production of early-born cell types such as horizontal cells and amacrine cells at the expense of late-born cell types such as bipolar cells and Müller cells. Results shown are mean  $\pm$  SEM (n=4). A total of 1010 clones from 4 different animals were analyzed for the control, and a total of 1626 clones were analyzed from 4 different animals were analyzed for Ikaros misexpression. Clones containing photoreceptors were not included in the quantification because of specific cell death after Ikaros misexpression (see text). (K) Analysis of the average number of cells per clone in controls and Ikaros misexpressing clones. Clone size is not significantly affected by Ikaros misexpression. (L-O) Misexpression of Ikaros in culture increases generation of Brn3b-positive cells, a marker of RGCs. RPCs were isolated from P0 mouse retina and infected in culture with a retroviral vector expressing Ikaros together with GFP as a reporter. After Ikaros misexpression, some GFP-positive cells, indicating cells generated in culture and expressing Ikaros (L), were stained for Brn3b (M). A merged image is shown in (N) together with Hoechst to reveal the nuclei (blue).



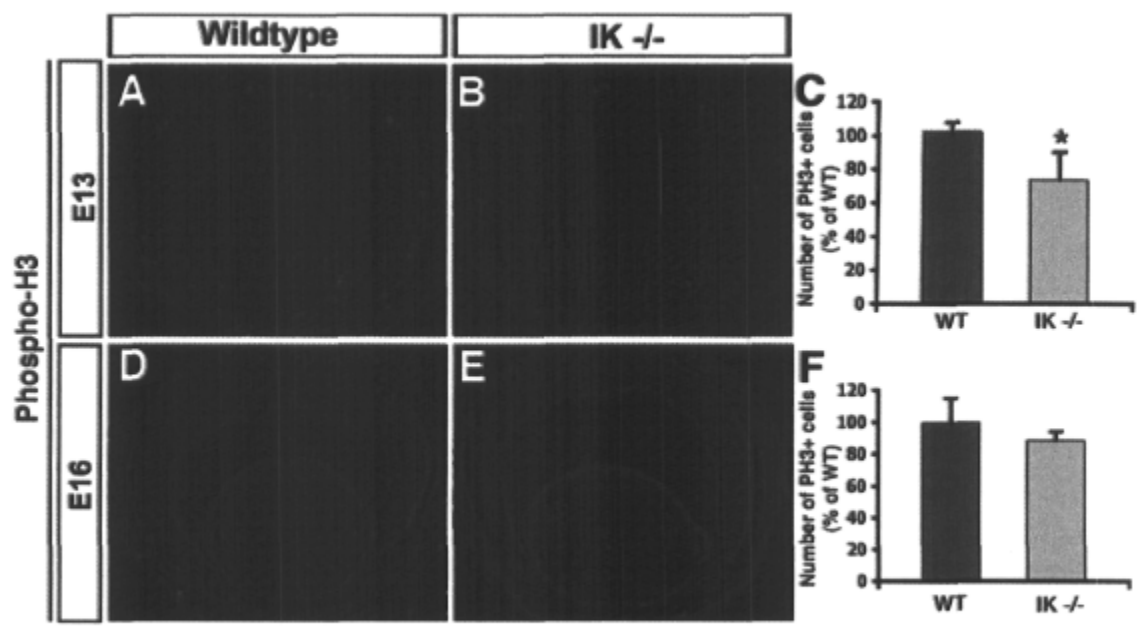
***Figure 4. Ikaros inactivation reduces the generation of early-born cell types in the mouse retina***

(A-I) Characterization of the expression of three markers of retinal ganglion cells, as indicated, in retinal sections from embryonic day 13  $IK^{-/-}$  mouse and wildtype littermates. Note the reduction in the thickness of the region containing Brn3b (A, B) and Islet-1 (D, E) cells (brackets) and the intensity of the Math5 signal (G, H) in the  $IK^{-/-}$  retina compared to wildtypes. Quantification of the number of cells expressing Brn3b (C) or Islet-1 (F), and the intensity of the Math5 in situ hybridization signal (I), revealed a significant reduction for all three markers in the  $IK^{-/-}$  retina compared to wildtypes (N=4). (J-R) Characterization of the expression of markers of horizontal cells (Lim1), amacrine cells (NeuroD), and photoreceptor cells (Crx), in retinal sections from embryonic day 16 wildtype and  $IK^{-/-}$  mouse. A significant reduction in the number of cells expressing Lim1 (J-L; n=4) and NeuroD (M-O; n=3) was observed in the  $IK^{-/-}$  retina compared to wildtypes (WT; n=4), but no change in Crx expression was detected (P-R; n=4 for WT and n=3 for  $IK^{-/-}$ ). Sections in panels A, B, D, E, J, K, M, N were counterstained with Hoechst to reveal cell nuclei. All quantifications are expressed as mean  $\pm$  SEM.



***Figure 5. Ikaros inactivation reduces proliferation at early stages of mouse retinal development***

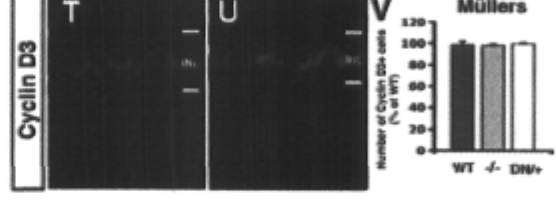
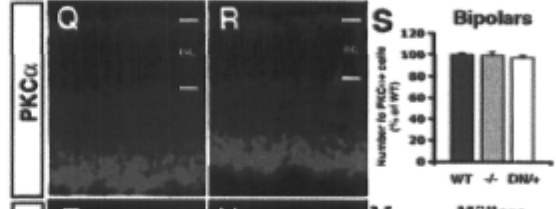
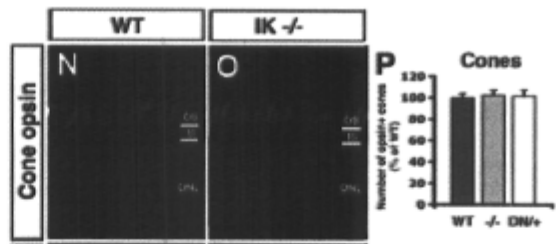
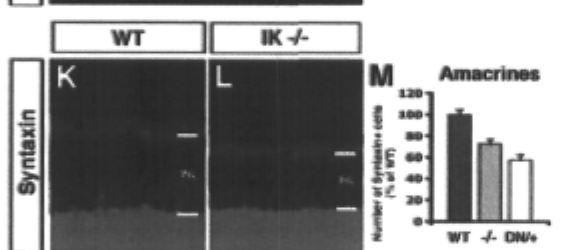
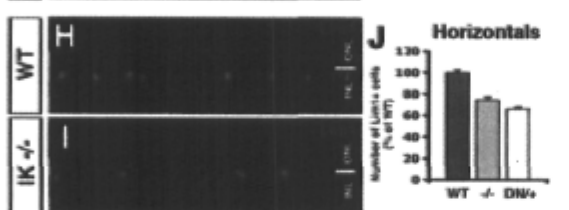
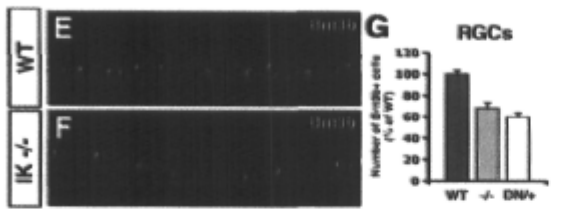
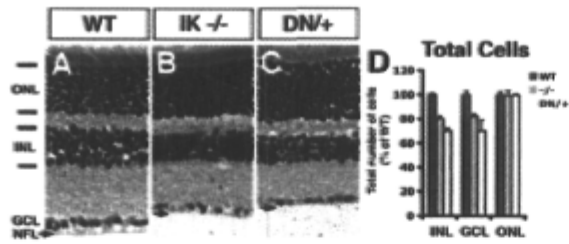
Immunostaining for the mitotic cell marker phospho-histone H3 (PH3) at E13 (A, B) and E16 (D, E) in wildtype (WT) and  $IK^{-/-}$  retinal sections. Mitotic cells (green) are found exclusively at the apical side of the retinal neuroepithelium. Sections were counterstained with Hoechst to reveal cell nuclei. (C, F) Quantification (mean  $\pm$ SEM) of the number of PH3-positive cells revealed a significant reduction in the  $IK^{-/-}$  retina at E13 (n=5), but not at E16 (n=3).



***Figure 6, Ikaros inactivation leads to a specific deficit in early-born cell types in the adult mouse retina***

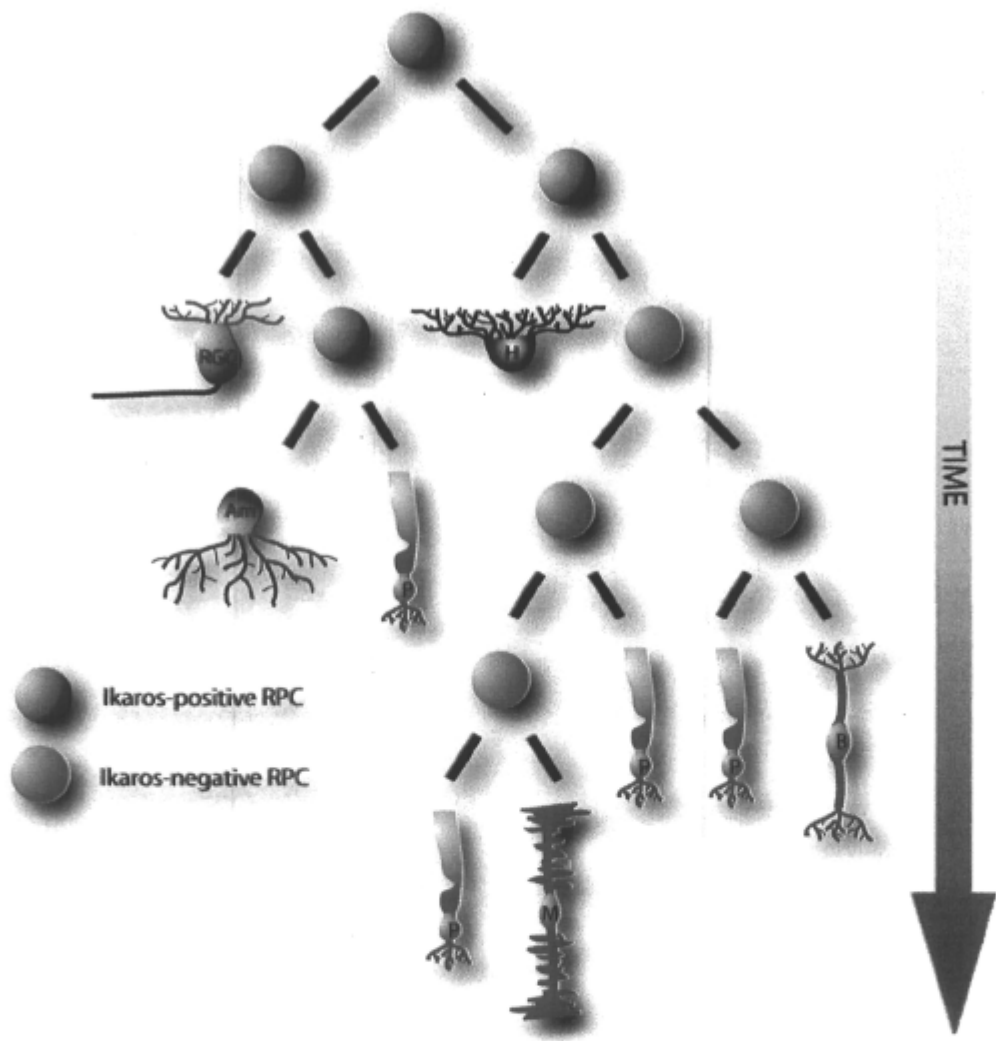
(A-C) Hematoxylin and eosin staining of wildtype (WT),  $IK^{-/-}$ , and  $IK^{DN/+}$  mouse retinal sections. Note the reduction in the thickness of the inner nuclear layer (INL) and ganglion cell layer (GCL), whereas the outer nuclear layer (ONL) is not affected. The nerve fiber layer (arrow) is also thinner in the  $IK^{-/-}$  and  $IK^{DN/+}$ . (D) Quantification of the number of cells in each layer confirmed that both the INL and GCL contain fewer cells in both IK mutants compared to WT (n=5 for WT and  $IK^{-/-}$ , n=4 for  $IK^{DN/+}$ ). (E-M) Analysis of the expression of cell-type specific markers of RGCs (Brn3b; n=4), horizontal cells (Lim1; n=7 for WT and  $IK^{-/-}$ , and n=6 for  $IK^{DN/+}$ ), and amacrine cells (syntaxin; n=7 for WT and  $IK^{-/-}$ , and n=6 for  $IK^{DN/+}$ ) by immunostaining in adult retinal sections. The number of cells expressing all three markers was significantly reduced in  $IK^{-/-}$  and  $IK^{DN/+}$  compared to wildtypes. (N-V) Analysis of the expression of cell-type specific markers for cone photoreceptors (cone opsin, n=4 for WT and  $IK^{-/-}$ , n=3 for  $IK^{DN/+}$ ), and for the late-born bipolar cells (PKC $\alpha$ ; n=6) and Müller cells (cyclinD3; n=6) by immunostaining of adult retinal sections. The number of cells expressing all three markers was not changed in  $IK^{-/-}$  and  $IK^{DN/+}$ , compared to WT. All retinal sections in panels E-V are counterstained with Hoechst to reveal cell nuclei. All quantifications are expressed as mean  $\pm$  SEM.





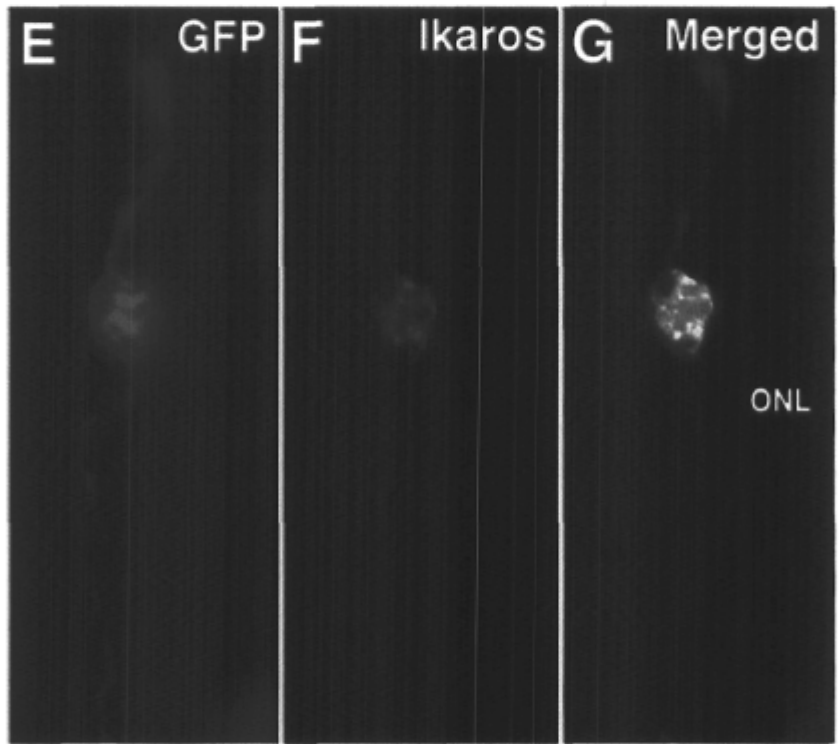
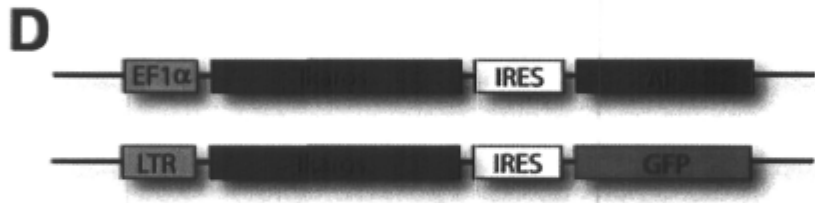
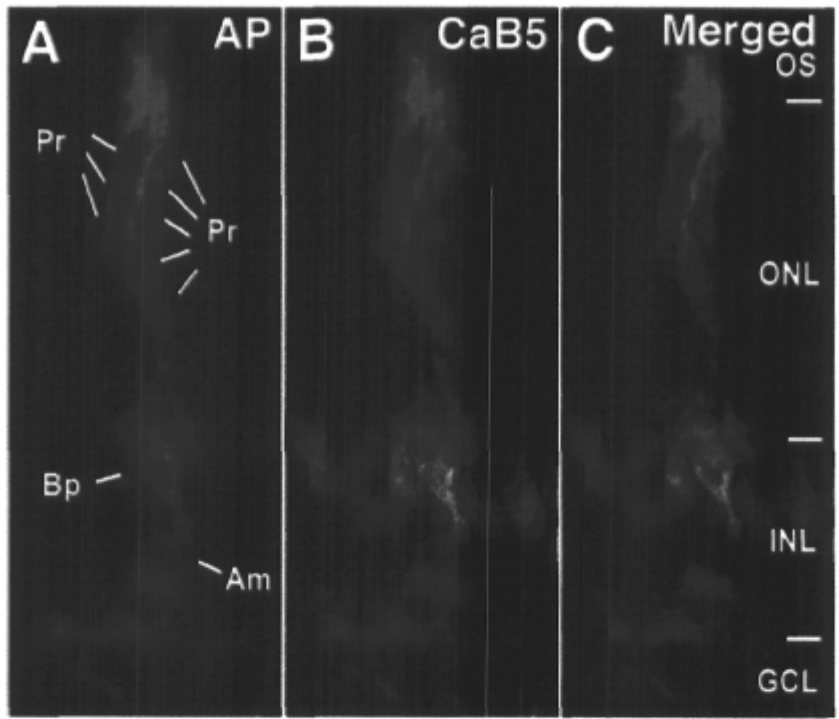
***Figure 7. Proposed model for the regulation of temporal competence by Ikaros***

Schematic representation of a large multipotent lineage showing the temporal generation of different cell types in the retina. Ikaros-positive RPCs (green) give rise to early born cell types. Over time, Ikaros expression is lost in some RPCs (red), which lose the competence to generate early born cell types and start generating late-born cell types. RGC: Retinal Ganglion Cell, H: Horizontal Cell, A: Amacrine cell, P: Photoreceptor cell, B: Bipolar cell, M: Müller cell



***Supplementary Figure 1. Retroviral lineage analysis***

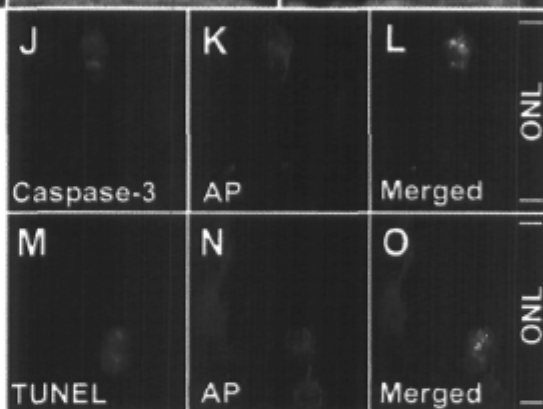
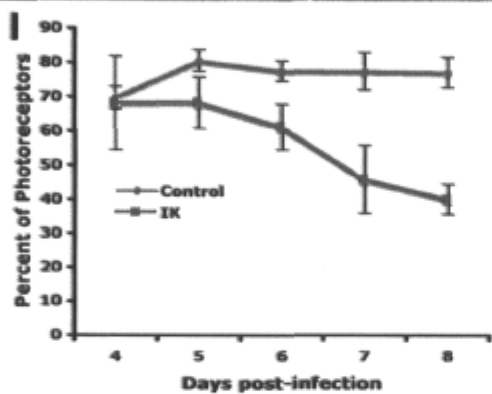
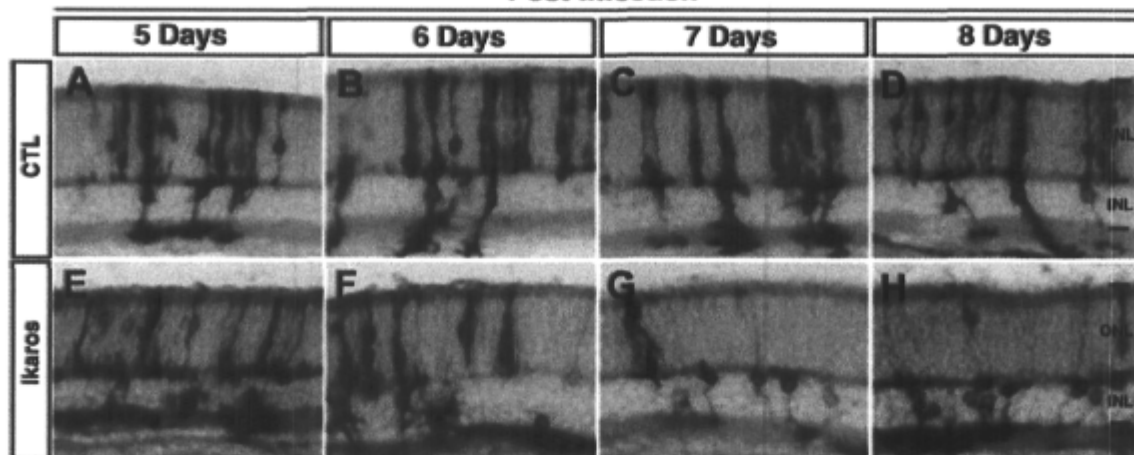
(A-C) A typical clone obtained 17 days after retroviral infection in a retinal explant at E13. The retroviral vector encodes placental alkaline phosphatase (AP), whose activity can be visualized following degradation of the fluorescent substrate Naphtol FastRed (A; green). As judged by cell morphology and position in the cellular layers, this clone contains 8 photoreceptor cells (Pr), one bipolar cell (Bp) and one amacrine cell (Am). The bipolar cell is stained for CaB5, a marker of bipolar cells (B; red). A merged image of the AP and CaB5 staining together with Hoechst counterstaining (blue) is shown in (C). OS: photoreceptor outer segments, ONL: outer nuclear layer, INL: inner nuclear layer, GCL: ganglion cell layer. (D) The two different Ikaros-expressing retroviral vectors used in this study. Both vectors express the full-length Ikaros cDNA, but one expresses AP as reporter, and the other expresses GFP. (E-G) Ikaros retroviral vectors drive high level of Ikaros expression. A photoreceptor cell (E, green) generated from an IK-EGFP-infected RPC, stained with the Ikaros antibody (F) showing strong punctate expression of Ikaros in the nuclei. Note that non-infected photoreceptor cells do not express Ikaros. A merged image counterstained with Hoechst is shown in (G).



***Supplementary Figure 2. Ikaros misexpression leads to photoreceptor cell death***

(A-H) Time-course analysis of photoreceptor development in mouse retinal explants infected on P1 with a control retroviral vector expressing AP only (A-D), or AP together with Ikaros (E-H). A high titer virus was used to obtain a large number of infected cells for a population analysis. Although photoreceptor cells are initially generated normally in both controls and Ikaros-infected explants, as seen by the number of cells located in the outer nuclear layer (ONL) at 5 days post-infection (A, F), the number of photoreceptors observed in the ONL in Ikaros-infected explants rapidly decreases at 6, 7, and 8 days post-infection (F-H), whereas it remained constant in the controls (B-D). (I) Quantification of the proportion of photoreceptor cells among total infected cells in controls and Ikaros-infected (IK) explants over time (mean  $\pm$ SEM; n=4 for each time point). (J-O) Staining for activated caspase-3 (J-L) or Terminal dUTP Nick End Labeling (TUNEL) (M-O) to identify apoptotic cells. Many Ikaros-infected photoreceptors in the ONL (red) are undergoing apoptosis and stain for activated caspase 3 and TUNEL (green). A merged image is shown in panels L and O with Hoechst counterstaining to reveal cell nuclei.

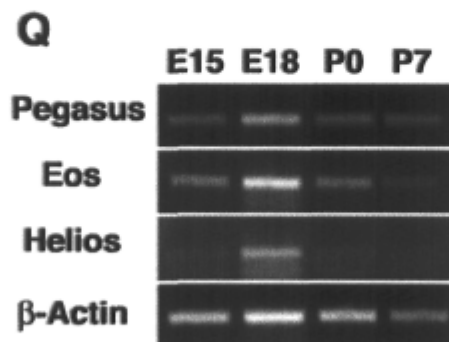
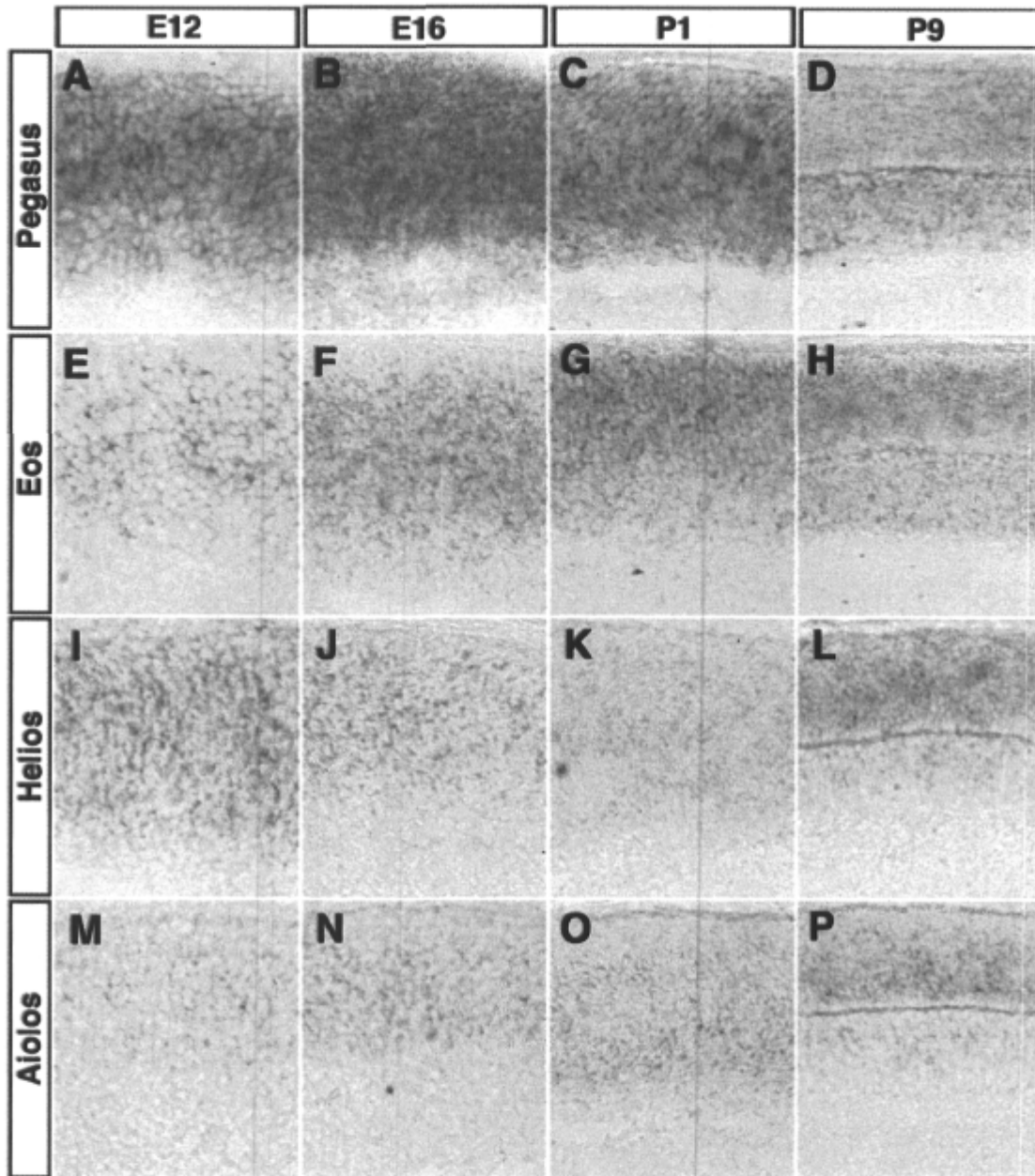
Post-infection



***Supplementary Figure 3. Ikaros family members are expressed in the developing mouse retina.***

In situ hybridization for Pegasus (A-D), Eos (E-H), Helios (I-J), and Aiolos (M-P) at different stages of retinal development. Expression of all four family members is detected at all stages analyzed. (Q) RT-PCR analysis show that Pegasus and Eos are strongly expressed throughout retinal development, whereas Helios is expressed at lower levels at E15, and appears to peak at E18. Aiolos expression was not detected by RT-PCR under these conditions. The identity of the PCR products was confirmed by sequencing.





***Supplementary Figure 4. Ikaros Inactivation does not increase cell death in the developing mouse retina***

Terminal dUTP Nick End Labeling (TUNEL; red) on retinal sections at E13 (A, B), E16 (C, D), and P1 (E, F) shows no increased cell death in  $IK^{-/-}$  retinas compared to wildtype littermates.

	Wildtype	IK -/-
E13	A	B
E16	C	D
P1	E	F

**Supplementary Table 1. List of antibodies used in the study**

<b>Antigen</b>	<b>Specificity</b>	<b>Dilution</b>	<b>Source</b>
Protein kinase C alpha	Mouse monoclonal	1:100	Santa Cruz
Islet 1	Mouse monoclonal	1:100	Dev. Studies Hybridoma bank
Cone opsin (Red and Green)	Rabbit polyclonal	1:10 000	From Dr. J. Nathans
Brn3b	Goat polyclonal	1:150	Santa Cruz
Pax6	Rabbit polyclonal	1:200	Chemicon
Lim1	Rabbit polyclonal	1:2000	From Dr. T. Jessell
NeuroD	Rabbit polyclonal	1:750	From Dr. J. Drouin
Phospho-H3	Rabbit polyclonal	1:200	Upstate
Calbindin D-28K	Rabbit polyclonal	1:200	Chemicon
Activated Caspase 3	Rabbit polyclonal	1:400	Sigma
Syntaxin	Mouse monoclonal	1:500	Sigma
Cyclin D3	Mouse monoclonal	1:100	Santa Cruz
PCNA	Mouse monoclonal	1:100	Zymed
Ikaros (4E9)	Mouse monoclonal	1:200	From Dr. K. Georgopoulos
Ikaros C-Terminal	Rabbit monoclonal	1:200	From Dr. S.Smale

**Supplementary Table 2. List of RT-PCR primers used in the study**

mIkaros forward	5' - AGC AAT GTC GCC AAA CGT AAG AGC - 3'
mIkaros reverse	5' - TTG ATG GCA TTG TTG ATG GCC TGG - 3'
mPegasus forward	5' - TGC ACC TAT GCC AGC AAA GGA ACG - 3'
mPegasus reverse	5' - TCT TGC TGC TTA AGG AAG ACC TGG - 3'
mEos forward	5' - TCA TTG ATC GTT TGG CCA ACA GCC - 3'
mEos reverse	5' - TGT GCC ACC AAC TCT ACG TCC TTT - 3'
mHelios forward	5' - GCT CCA CTC CTC AGA AGT TTG TGG - 3'
mHelios reverse	5' - GTC GTC CGT GGT TCG TGT TA - 3'
mAiolos forward	5' - TCG TCC TGG ACA GAT TAG CAA GC - 3'
mAiolos reverse	5' - ATA TCG GCC CGA GTA AGT GCT ATG - 3'
mB-actin forward	5' - GTC CAT CAC AAT GCC TGT GGT A - 3'
mB-actin reverse	5' - TGA ACC CTA AGG CCA ACC GTG AAA - 3'

## CHAPITRE 3. ARTICLE 2

### *The CNTF/LIF signalling pathway regulates developmental programmed cell death and differentiation of rod precursor cells in the mouse retina in vivo*

Jimmy Elliott<sup>1,3</sup>, Michel Cayouette<sup>1,2\*</sup> and Claude Gravel<sup>3,4</sup>

1 Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), 110, avenue des Pins Ouest  
Montréal, Québec , Canada, H2W 1R7

2 Département de Médecine, Faculté de Médecine, Université de Montréal

3 Laboratoire de Transfert de Gènes, Centre de Recherche Université Laval Robert-Giffard  
(CRULRG), 2601, de la Canardière, Beauport, Québec, Canada, G1J 2G3

4 Département de Psychiatrie, Faculté de Médecine, Université Laval, Cité Universitaire,  
Québec, Canada, G1K 7P4

Corresponding author :

Michel Cayouette, Cellular Neurobiology Research Unit, IRCM, 110, Avenue des Pins  
Ouest, Montreal, QC, H2W 1R7, Tel : 514-987-5757, Fax : 987-5761, email :  
michel.cayouette@ircm.qc.ca

**Contribution : Jimmy Elliott : Totalité des figures**

### 3.1 RÉSUMÉ

La mort cellulaire programmée est un procédé essentiel au développement du système nerveux. Cependant, les régulateurs extracellulaires de cette mort cellulaire développementale restent toutefois très méconnus. Dans cette étude, nous avons étudié le rôle de la voie de signalisation du CNTF/LIF durant le développement rétinien *in vivo*. Nous démontrons que l'exposition au CNTF durant le développement postnatal de la rétine *in vivo* retarde l'expression de la rhodopsine et résulte en un important déficit spécifique en photorécepteurs. Une analyse plus détaillée a révélé que l'exposition au CNTF durant le développement rétinien induit une augmentation importante de la mort cellulaire des précurseurs postmitotiques des photorécepteurs bâtonnets. De façon importante, nous montrons que le blocage de la voie du CNTF/LIF durant le développement de la rétine de souris *in vivo* résulte en une diminution significative de la mort cellulaire développementale. À l'aide d'une analyse clonale utilisant des vecteurs rétroviraux, nous démontrons que l'exposition au CNTF cause une réduction spécifique des clones contenant seulement des photorécepteurs sans toutefois affecter les autres types de clones. Inversement, le blocage de la voie CNTF/LIF induit une augmentation spécifique des clones contenant seulement des photorécepteurs. De plus, nous démontrons que la stimulation de la voie du CNTF/LIF contrôle l'expression génique des isoformes neuronale et endothéliale de la synthase d'oxide nitrique (NOS), et le blocage de la production d'oxide nitrique par un pré-traitement avec un inhibiteur de NOS abolie la mort cellulaire induite par CNTF. Ces résultats suggèrent donc que la voie de signalisation du CNTF/LIF agit via la régulation de la production d'oxide nitrique afin de moduler la mort cellulaire programmée des précurseurs postmitotiques des photorécepteurs bâtonnets.

**Mots-clés :** Rétine, mort cellulaire, développement, cytokine, spécification cellulaire, photorécepteurs, oxide nitrique

## 3.2 ABSTRACT

Natural cell death is critical for normal development of the nervous system, but the extracellular regulators of developmental cell death remain poorly characterized. Here, we studied the role of the CNTF/LIF signalling pathway during mouse retinal development *in vivo*. We show that exposure to CNTF during neonatal retinal development *in vivo* retards rhodopsin expression and results in an important and specific deficit in photoreceptor cells. Detailed analysis revealed that exposure to CNTF during retinal development causes a sharp increase in cell death of post-mitotic rod precursor cells. Importantly, we show that blocking the CNTF/LIF signalling pathway during mouse retinal development *in vivo* results in a significant reduction of naturally-occurring cell death. Using retroviral lineage analysis, we demonstrate that exposure to CNTF causes a specific reduction of clones containing only rods without affecting other clone types, whereas blocking the CNTF/LIF receptor complex causes a specific increase of clones containing only rods. In addition, we show that stimulation of the CNTF/LIF pathway positively regulates the expression of the neuronal and endothelial nitric oxide synthase (NOS) genes, and blocking nitric oxide production by pre-treatment with a NOS inhibitor abolishes CNTF-induced cell death. Taken together, these results indicate that the CNTF/LIF signalling pathway acts via regulation of nitric oxide production to modulate developmental programmed cell death of postmitotic rod precursor cells.

Keywords: Retina, cell death, development, cytokine, cell fate, photoreceptor, nitric oxide



### 3.3 INTRODUCTION

Through the processes of cell division, specification, differentiation, and programmed cell death, various cell types are generated in specific numbers to form the mature brain. Precise coordination of these processes is critical to the generation of a fully functional nervous system, as the slightest imbalance could lead to abnormal development and disease. The retina is an ideal system to study these processes as it is easily accessible, it has a relatively simple anatomy, and it contains a manageable number of cell types that can all be identified with molecular markers. Pioneering cell-lineage analyses using retroviral vectors or injection of tracers into individual retinal progenitor cells (RPCs) indicate that the earliest RPCs are multipotent and can give rise to all the different cell types in the retina (Holt et al., 1988; Turner and Cepko, 1987; Wetts and Fraser, 1988); astrocytes, by contrast, migrate into the retina from the optic nerve (Watanabe and Raff, 1988). These findings raised the important question of how multipotent RPCs choose between different fates and generate the correct proportion of retinal cell types.

During retinal development, naturally occurring programmed cell death is observed in successive waves during the first postnatal weeks (Young, 1984). As the cells become postmitotic and start to differentiate, apoptosis occurs in the ganglion cell layer, and progress to cells of the inner and then outer nuclear layer of the retina, peaking around postnatal day 7 in the latter (Young, 1984). Previous studies have suggested that naturally occurring cell death is significant and can even complicate the analysis of cell lineages in the retina (Voyvodic et al., 1995). Previous studies have shown that signalling through the low affinity neurotrophin receptor p75 contributes to regulate naturally occurring cell death of ganglion cells in the retina (Ding et al., 2001; Frade and Barde, 1999; Frade et al., 1996; Harada et al., 2005), but it remains unclear whether other signalling pathways could act to regulate natural cell death in other cell populations of the developing retina.

Members of the ciliary neurotrophic factor (CNTF)/leukemia inhibitory factor (LIF) subfamily of cytokines have been extensively studied over the past years for their potential role as environmental signals regulating retinal development. *In vitro* studies have shown

that CNTF can inhibit rhodopsin expression in newborn, postmitotic rod photoreceptor cells (Bhattacharya et al., 2004; Ezzeddine et al., 1997; Kirsch et al., 1996; Neophytou et al., 1997; Rhee et al., 2004). Also, the observation that rhodopsin-positive cells are more numerous in retinal explant cultures from neonatal CNTF-receptor  $\alpha$  (CNTF-R $\alpha$ ) knockout mice (Ezzeddine et al., 1997) or in explants from wild-type mice after blockade of STAT signalling (Rhee et al., 2004) has been interpreted as further support that the CNTF signalling pathway is acting mainly on the differentiation of rod photoreceptors. However, if the CNTF pathway was only controlling rhodopsin expression, one would expect precocious expression of rhodopsin in the CNTF-R $\alpha$  knockout retina, but not necessarily an increased number of rhodopsin-positive cells. Thus, the extra photoreceptors in the CNTF-R $\alpha$  knockout mouse suggests that stimulation of the CNTF-R $\alpha$  might also regulate cell death. Although CNTF is largely known for its anti-apoptotic activities on various neural cell populations including photoreceptors (Cayouette et al., 1998; Cayouette and Gravel, 1997; LaVail et al., 1992), previous results *in vitro* reported that CNTF can also act as a death-promoting factor on sympathetic neurons (Kessler et al., 1993).

In the nervous system, nitric oxide (NO) has been proposed to play a part in regulating various aspects of normal development, including cell proliferation, differentiation and death, as well as synaptogenesis (Gibbs, 2003; Hess et al., 1993; Roskams et al., 1994; Wang et al., 1995; Wu et al., 1994). In the retina, the enzymes that synthesize NO, the nitric oxide synthase (NOS), are expressed during development and their expression is maintained in adult (Goureau et al., 1997; Kim et al., 2000; Li et al., 2006; Patel et al., 1997; Sharma et al., 1997; Tsumamoto et al., 2002). Interestingly, light-induced photoreceptor degeneration requires NOS activity (Donovan et al., 2001), and inhibition of endogenous NOS in chick retinal cell cultures prevents the normal developmental cell death observed in the rod photoreceptor population (Goureau et al., 1999). These results suggest that NO may be involved in the regulation of naturally occurring cell death in the developing retina.

In this study, we tested the hypothesis that the CNTF/LIF signalling pathway might regulate programmed cell death of rod precursor cells *in vivo*. We show that stimulation of the CNTF/LIF signalling pathway during retinal development causes a specific and massive cell death of post-mitotic rod photoreceptor precursors and that blocking the pathway with a

CNTF-receptor dominant-negative reduces naturally occurring cell death. In addition, we show that exposure to CNTF during retinal development significantly increases the expression of the neuronal and endothelial nitric oxide synthase (NOS), whereas blocking the CNTF/LIF pathway reduces the expression of both NOS isoforms. Consequently, we report that blocking NO production with the NOS inhibitor L-NAME can abolish CNTF-induced cell death, and significantly reduce naturally occurring cell death in the developing retina. These results indicate that the CNTF/LIF signalling pathway regulates developmental rod photoreceptor cell death by controlling NO production during retinal development.

### 3.4 RESULTS

#### ***Exposure to CNTF during postnatal mouse retinal development in vivo leads to a specific photoreceptor cell deficit***

To examine the effects of a stimulation of the CNTF receptor complex on the postnatal development of photoreceptors in the murine retina *in vivo*, we first exposed the retina of mice from postnatal day 2 (P2) to increased levels of CNTF using a defective adenoviral vector (AdCNTF) encoding a secretable version of a *cntf* minigene, as described previously (Cayouette et al., 1998; Cayouette and Gravel, 1997). In all experiments, the contralateral eye was either left uninjected, or injected with a defective adenoviral vector encoding *E. coli*  $\beta$ -galactosidase (Ad-LacZ) as control. The viral vectors were delivered into the vitreous using a transretinal approach, and most infected cells were found located in the iris epithelium, cornea, ciliary body and pigmented epithelium, as previously shown (Cayouette et al., 1998; Cayouette and Gravel, 1997). Observations of retinal sections at P32 revealed that the photoreceptor layer of the Ad-CNTF-injected eye was remarkably thinner than that of the control retina and contained fewer photoreceptors (Fig. 1A, B), whereas retinas from non-injected eyes at P32 were not different from those of AdLacZ-injected eyes (Supplementary Figure 1). In addition, the photoreceptors in the Ad-CNTF-injected eyes did not fully develop as judged by the absence of organized outer segments (Fig. 1B). The other cell layers (INL and GCL) appeared unaffected, as we did not find any changes in their thickness.

In cultures of neonatal rat retina, it was previously reported that the decreased number of rhodopsin-positive ( $\text{rho}^+$ ) cells following exposure to CNTF was accompanied by an increase in the number of cells expressing bipolar cell markers (Ezzeddine et al., 1997). To verify whether CNTF overexposure *in vivo* could respecify some retinal cells to adopt the bipolar cell fate, we counted the number of cells expressing the bipolar cell markers protein kinase C alpha (PKC), Islet-1 (Figure 1C-F), and RET-B1 (not shown) on retinal sections from AdCNTF-infected or control eyes. No statistically significant changes were found in

the proportion of PKC-, Islet-1-, or RET-B1-positive cells in Ad-CNTF-treated retinas compared to controls (Fig. 1G, H, and not shown).

A recent study showed that CNTF can promote Müller glial cell genesis *in vitro* (Goureau et al., 2004). To determine the effect of CNTF exposure on Müller glial cell differentiation *in vivo*, we stained AdCNTF-injected and control retinas with GFAP, glutamine synthetase, and cyclin-D3, three markers of Müller glial cells. As expected (Wang et al., 2002a), we found that CNTF exposure caused an important increase in GFAP expression in Müller cells (not shown). However, we did not detect any apparent changes in the number of glutamine synthetase and cyclin-D3-positive cells following CNTF exposure during retinal development *in vivo* (Supplementary Figure 2). Interestingly, the position of the Müller cell bodies appeared slightly disorganized in some areas (Supplementary Figure 2), most likely due to the important loss of photoreceptor cells. Thus, it appears that exposure to CNTF *in vivo* stimulates GFAP expression, as previously reported, but does not significantly affect the number of Müller glial cells that develop. We also stained CNTF-exposed retinas with amacrine cell markers and did not detect any changes in the number of amacrine cells (not shown). Consistent with these observations, we found that total INL cell densities were not significantly affected in CNTF-exposed retinas ( $75.7 \pm 8.7$  cells/100 $\mu\text{m}$  in controls,  $69.0 \pm 4.4$  cells/100 $\mu\text{m}$  in Ad-CNTF retinas;  $P=0.3221$ ). Taken together, these results indicate that overexposure to CNTF causes a specific deficit in photoreceptor cells and does not affect generation of other retinal cell types in the mouse retina *in vivo*.

### ***The CNTF/LIF signalling pathway regulates rhodopsin expression in vivo***

There is strong evidence indicating that the CNTF/LIF signalling pathway regulates the onset of rhodopsin expression in culture (Ezzeddine et al., 1997; Kirsch et al., 1998b; Neophytou et al., 1997; Shuster and Farber, 1986). To determine the *in vivo* influence of the CNTF/LIF signalling pathway on the onset of opsin expression, we injected 250 ng of rat recombinant CNTF (rrCNTF) into one eye and recombinant  $\beta$ -Gal ( $r\beta$ -Gal), or nothing, into the contralateral eye of P2 mice, and analyzed the expression of rhodopsin at P3 or P9 by immunofluorescence. While numerous  $\text{rho}^+$  cells are detected in the uninjected and  $r\beta$ -Gal-injected retinas at P3 (Fig. 2A), the retina exposed to CNTF shows virtually no  $\text{rho}^+$  cells

(Fig. 2B), confirming that stimulation of the CNTF/LIF signalling pathway can block rhodopsin expression *in vivo*. Interestingly, observation of CNTF-injected retinas at P9 did not reveal any obvious changes in rhodopsin expression (not shown), suggesting that the blockade of rhodopsin expression requires sustained exposure to CNTF. Consistent with this hypothesis, retinas injected with the AdCNTF vector at P2 showed a marked reduction in rhodopsin expression up to 30 days after injection (Fig. 2C, D).

To determine whether an endogenous ligand of the CNTF/LIF signalling pathway is acting *in vivo* to block rhodopsin expression, as suggested by an *in vitro* study (Neophytou et al., 1997), we have constructed an adenoviral vector encoding the well-characterized dominant-negative ligand LIF05 (Hudson et al., 1996). First, we tested whether cells infected with this viral vector (AdLIF05) secreted the dominant-negative protein and can block signalling through the CNTF/LIF receptor complex. As shown in Figure 2E, the supernatant collected from AdLIF05-infected Vero cells, but not that of control-infected or non-infected cells, can efficiently block the phosphorylation of STAT-3 in the neuroblastoma cell line IMR-32 exposed to CNTF. These results show that the LIF05 secreted from AdLIF05-infected cells can block the signalling through the CNTF receptor complex. We then injected the AdLIF05 or the AdLacZ vector into the vitreous at P2, or left the eyes uninjected, and counted the number of rho<sup>+</sup> cells at P3 and P7 (Fig. 2 F, G). We found a significantly higher proportion of rho<sup>+</sup> cells in the retinas exposed to the LIF05 protein than in controls at both time points (Fig. 2 F, G). Taken together, these results suggest that an endogenous ligand of the CNTF/LIF receptor complex is present in the retina during normal postnatal development, and retards the expression of rhodopsin in some photoreceptor precursor cells.

***Overexposure to CNTF during postnatal retinal development causes a dramatic increase in cell death.***

Because the photoreceptor deficit caused by overexposure to CNTF during the early postnatal period is not compensated by a concomitant increase in the number of other retinal cell types, we have investigated the possibility that the photoreceptor deficit could result from an increase in cell death. For this purpose, the Ad-CNTF vector or AdLacZ control was injected into the vitreous of P2 mice, and the retinas were then collected and analyzed at P5,

P15, P21 or P32. The presence of apoptotic cells was detected using terminal dUTP nick-end labelling (TUNEL). As shown in Fig 3A, we observed a dramatic increase in the number of apoptotic cells (TUNEL<sup>+</sup>) at P5, 3 days after Ad-CNTF-injection. At P15, the number of apoptotic cells was back to normal. Interestingly a slight increase in apoptotic cells was again observed in the CNTF-treated retinas at P21 (Fig. 3A). However, this second wave of cell death does not appear to contribute much to the overall loss of photoreceptor cells since retinas from AdCNTF-injected were already reduced to only 4-5 rows of photoreceptor nuclei at P15 (compared to 11-12 rows in controls), and less than one row of photoreceptors was further lost between P15 and P32. These results indicate that overexposing the early postnatal retina to CNTF results in an important apoptotic loss of cells, and that the deficit in photoreceptors seen in adults following AdCNTF injection at P2 is essentially complete by P15.

We found no deficit in photoreceptors at P32 or later following intravitreal injection of AdCNTF at P12 or later suggesting that overexposure to CNTF is particularly detrimental before P12, when photoreceptor production and differentiation is taking place. Indeed, histological analysis of retinas of P32 animals that received the Ad-CNTF vector in one eye at either P0, P2, P5 or P8 revealed a strong correlation ( $R^2 = 0.9263$ ) between the thickness of the photoreceptor layer at P32 and the age of the animal at the time of injection (Fig. 3B), indicating that the earlier the retina is exposed to CNTF, the larger the deficit in photoreceptors.

To better evaluate the time course of the apoptotic response, P2 mice were injected into the vitreous of one eye with 250ng of rat recombinant CNTF (rrCNTF), the other eye being left uninjected, or injected with 250ng of recombinant *E. coli*  $\beta$ -Galactosidase (r $\beta$ -Gal) as control. Eyes were collected at various intervals post-injection (p.i), and retinal sections processed for TUNEL. At 10.5h p.i., the proportion of TUNEL<sup>+</sup> cells was similar in the retina of rrCNTF-injected eyes and that of controls (not shown). However, at 20h p.i., the eyes injected with the CNTF protein showed many more apoptotic retinal cells than the controls (Fig. 3 C, D), and the content of cytoplasmic histone-associated DNA fragments was more than 11 times higher in CNTF-treated retinas than in the control retinas, as

revealed by ELISA ( $P < 0.0007$ ; not shown). The majority of these TUNEL<sup>+</sup> cells were located in the neuroblastic layer (Fig. 3C, D). As shown in Figure 3E, a dose-response curve revealed that the proportion of apoptotic cells is increasing with increasing doses of injected rCNTF. Interestingly, 9 days after injection of 250ng rCNTF, we did not detect any difference in the number of TUNEL<sup>+</sup> cells, or in the photoreceptor layer thickness, between the retinas of rCNTF-injected and control-injected eyes (not shown). This indicates that a single injection of rCNTF induces a rapid but transient wave of apoptotic cell death in the retina, and that cells dying during this transient period are either replaced or not sufficiently numerous to cause a histologically detectable reduction in ONL thickness.



***Stimulation of the CNTF/LIF signalling pathway during retinogenesis induces post-mitotic photoreceptor precursor cell death***

To determine whether the apoptotic cells observed following CNTF administration at P2 were proliferating or post-mitotic, we injected 250 ng of rrCNTF into the vitreous of P2 mice, collected and sectioned the retinas 20 hours later, and processed the tissues for detection of both proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and apoptosis using TUNEL. As shown in Figure 4, we found that rrCNTF-injected eyes contained numerous PCNA-positive cells (PCNA<sup>+</sup>) as well as many TUNEL<sup>+</sup> cells. Three-dimensional orthogonal plans (Fig 4A-C) and colocalization analysis (Fig 4D, E) revealed that TUNEL<sup>+</sup> cells observed in the rrCNTF-injected eye were largely PCNA-negative, although some TUNEL<sup>+</sup> cells were PCNA<sup>+</sup> (Fig. 4E), which most likely represent a basal level of cell death in proliferating progenitors, as this is also observed in control retinas. In addition, similar experiments in which bromodeoxyuridine (BrdU) was injected 1 hour before the intravitreal injection of rrCNTF revealed that very few cells were both TUNEL<sup>+</sup> and BrdU<sup>+</sup> (Supplementary Figure 3). In both experiments, three-dimensional analysis was done to confirm the presence or absence of co-localization. Together with our finding that only photoreceptors are depleted following long-term CNTF overexposure, these results suggest that the large majority of the cells undergoing apoptosis in early postnatal retinas overexposed to CNTF are immature, postmitotic photoreceptor cells.

***The pro-apoptotic effect of CNTF requires the stimulation of the CNTF-receptor complex***

We next asked whether the increase in apoptotic cells seen in the developing retina following CNTF administration requires stimulation of the CNTF receptor complex. First, we injected intravitreally 250 ng of recombinant human leukemia inhibitory factor (rhLIF), a cytokine distantly related to CNTF with only 50% homology at the amino acid level, but signalling through the complex formed by the LIFR $\beta$  and gp130 receptor subunits, the two signalling  $\beta$  components of the tripartite CNTF receptor complex (Bazan, 1991). At 20 hours p.i., retinal sections were analyzed by TUNEL. As seen following rrCNTF injection, intravitreal injection of rhLIF resulted in a massive amount of cell death in the ventricular

zone (not shown). In contrast, retinal sections from eyes injected with 250 ng of recombinant murine interleukin-6 (rmIL-6), a cytokine also signalling through a gp130-associated receptor complex but not using the LIFR $\beta$  subunit, were indistinguishable from those of control r $\beta$ -Gal-injected eyes, showing no increase in TUNEL<sup>+</sup> cells 20 hours p.i. (not shown).

To directly test the hypothesis that the pro-apoptotic effect of CNTF requires the stimulation of the CNTF-receptor complex, and to determine the specificity of this effect, we first injected one eye of P1 mice with either the AdLIF05 vector or the control AdLacZ vector, whereas the contralateral eye remained uninjected. Twenty-four hours later, the animals received a second injection in both eyes with 100 ng of rrCNTF. To confirm the success of the rrCNTF injection, fluorescent micro beads were mixed to the protein suspension. All the eyes injected with AdLIF05 only, as well as those injected with Ad-LIF05 followed by rrCNTF, did not show any increase in the number of apoptotic cells, compared to eyes injected with AdLacZ only (Fig. 5A-D). In contrast, eyes injected with the Ad-LacZ vector that were subsequently injected with rrCNTF showed the expected increase in apoptotic cells (Fig. 5E, F). In all the eyes injected with the rrCNTF protein, micro beads were found in the vitreous, confirming the success of the injection. These results show that the increase in cell death observed following CNTF administration can be blocked by pre-exposure to a dominant-negative ligand of the CNTF/LIF receptor complex, confirming that the pro-apoptotic effect of CNTF is mediated by signalling through the LIFR $\beta$ -gp130 complex.

***Stimulation of the CNTF/LIF signalling pathway contributes to normal programmed cell death in the developing retina***

Programmed cell death occurs in many cell populations during normal retinal development, including a specific population of photoreceptor precursor cells called inner rods that is located in the outermost part of the INL (Young, 1984). For this cell type, the peak of apoptosis is observed around P7, when these dying cells account for more than 50% of the total number of apoptotic cells seen at this age (Young, 1984). To test whether a blockade of the CNTF/LIF signaling pathway *in vivo* could reduce the normal programmed cell death of

photoreceptor precursor cells (or inner rods) observed during retinal development, eyes were injected at P2 with AdLIF05, or with AdLacZ, or were left uninjected, eyes were collected at P7, and retinal sections were processed for TUNEL. We found that retinas exposed to the dominant negative ligand LIF05 displayed a reduced number of apoptotic cells in the outer portion of the ventricular zone (Fig. 6A, B) compared to uninjected or AdLacZ-injected controls. This region contains mostly post-mitotic rod precursor cells, or inner rods (Young, 1984). Cell death in other retinal layers was unaffected (see Fig. 6B). To obtain a quantitative estimate of this reduction, retinas were dissociated upon collection, and the cell suspension plated on slides, stained by TUNEL, and the proportion of TUNEL<sup>+</sup> cells counted. Overall, we found that exposure to the LIF05 protein *in vivo* reduces apoptosis of developing retinal cells by about 65% over that of control retinas (Fig. 6C; P=0.0016, N=7). A similar decrease in the number of TUNEL<sup>+</sup> cells was found when counting cells on retinal sections. Thus, blocking the CNTF/LIF signalling pathway during retinal development *in vivo* with the LIF05 protein reduces the normal programmed cell death seen in P7 retinas, most likely that of post-mitotic photoreceptor precursor cells.

These results suggests that one or more endogenous ligand(s) acting through the CNTF/LIF receptor complex could be responsible for a significant fraction of cell death observed at this age. Endogenous expression of LIF was previously reported in the developing retina (Neophytou et al., 1997), but whether other ligands of the CNTF/LIF receptor complex are expressed remained unknown. Thus, to determine whether such ligands are expressed in the developing retina, we conducted a RT-PCR analysis using primers specific for various members of the CNTF cytokine family on mRNA extracts from P2 and P7 retinas. We found that in addition to CNTF, mRNAs encoding both Cytokine-like factor (CLF) and Cadiotrophin-like cytokine (CLC) are present at these time points (Fig. 6D). Also, intravitreal injection of recombinant CLC/CLF at P2 produced the same pro-apoptotic effects as recombinant CNTF (not shown), consistent with a potential role of one or more members of this family in the developmental cell death of photoreceptor precursors.

***Stimulation of the CNTF/LIF signalling pathway selectively reduces the generation of photoreceptor-only clones without affecting the generation of other types of clones***

Although increasing CNTF concentration in the retina early after birth causes a profound deficit in rod photoreceptors, we found no changes in the thickness or cell density of the INL (Fig. 1), and immunostaining for bipolar cell markers (Fig. 2), or Müller (supplementary Figure 2), and amacrine cell markers (not shown) did not reveal any changes. This suggested to us that the subset of cells (largely postmitotic, and rhodopsin-negative) that undergo apoptosis specifically give rise to photoreceptors. To directly investigate this possibility, we used a replication-defective murine retroviral vector encoding human placental alkaline phosphatase (pCLE-AP) (Gaiano et al., 2000) to study the influence of CNTF on cell lineage *in vivo*.

P1 mice were first injected into the subretinal space of both eyes with the retroviral vector so as to genetically tag some proliferating progenitor cells. Three days later, one of the two eyes was injected into the vitreous with either 250ng of rrCNTF, or 250 ng rβGal as control (Fig. 7A). Recombinant CNTF injection was chosen over AdCNTF because such a procedure causes only a transient increase in cell death peaking 20 hours after injection, allowing us to rule out any effects due to the delayed cell death observed between P15 and P32 following Ad-CNTF injection (Fig. 4A). Retinas were collected at P21 and the composition of alkaline-phosphatase-positive clone population was analyzed. Because progenitor cells are labelled with the retroviral vector before CNTF exposure, any of the genetically labelled daughter cells undergoing apoptosis following CNTF administration will be missing from the clonal population at the time of analysis. Thus, even though rrCNTF injection causes only a transient increase in cell death, it would permanently affect clonal composition.

As expected (Turner and Cepko, 1987; Turner et al., 1990), three types of labelled clones were obtained in both control and rrCNTF-treated retinas: clones containing cells located only in the ONL (ONL-only clones), clones containing cells located only in the INL (INL-only clones), and clones containing cells located in both the INL and ONL (ONL+INL clones) (Fig. 7 B-F). Quantitative analysis of the relative proportions of the various clones containing photoreceptors in the experimental retinas revealed a specific and significant reduction of the proportion of ONL-only clones in the rrCNTF-treated retinas, whereas the relative proportion of ONL+INL clones was found similar to that of controls (Fig. 7G). This

suggests that the majority of photoreceptor precursors that died following overexposure to CNTF were born from progenitors generating only photoreceptors, and not from progenitors generating both INL and ONL cells.

These results raise the possibility that the photoreceptor precursors dying from normal programmed cell death resulting from stimulation of the CNTF/LIF receptor complex are born from progenitors generating only photoreceptors. If this hypothesis were true, one would expect that blockade of the CNTF/LIF receptor complex would result in an increased proportion of ONL-only clones. To test this hypothesis, eyes of P1 mice were injected with the retrovirus, and a day later were injected into the vitreous with either the AdLIF05 or the AdLacZ vector. After computation of over a thousand clones from 4 retinas, statistical analysis confirmed a significant relative increase of ONL-only clones in eyes injected with AdLIF05, while the relative proportion of ONL+INL clones remained unchanged. (Fig. 7H). The ONL-only clones observed in LIF05-treated eyes ranged from 1 to 5 cells, as in the controls, and the distribution of clone size was unchanged. These results are consistent with the hypothesis that photoreceptor precursors born from progenitors generating only photoreceptors, and not those born from progenitors generating both photoreceptors and INL cells, are affected by programmed cell death involving signalling through the CNTF/LIF receptor complex.

#### ***The CNTF/LIF signalling pathway regulates retinal cell death by controlling nitric oxide production***

Because previous evidence suggests that increased NO production can trigger the death of photoreceptors (Donovan et al., 2001; Goureau et al., 1999; Ju et al., 2001), and that NO synthases can be regulated by cytokines via JAK/STAT signalling (Aktan, 2004; Dell'Albani et al., 2003), we wanted to test whether stimulation of the CNTF/LIF signalling pathway might regulate cell death by controlling NO production.

If increased signalling through the CNTF/LIF signalling pathway causes apoptosis of photoreceptor precursors *in vivo* by stimulating the production of NO, then increasing NO production in the developing retina by other means should also increase cell death of the

precursors, and reducing NO production should decrease it. To test this hypothesis, we first injected NOC-18, a NO donor, into the vitreous of P2 animals, and then counted the number of TUNEL<sup>+</sup> cells at P3. We found that NOC-18 dramatically increased the number of apoptotic cells compared to controls (Fig. 8A), and the location of the apoptotic cells was not different from that of apoptotic cells observed following rrCNTF injections. In contrast, intraperitoneal injections of L-NAME, an inhibitor of NOS, significantly reduced the number of TUNEL<sup>+</sup> cells detected in the retina compared to controls (Fig 8B). Together, these results show that increasing NO production during retinal development causes an increase in cell death, similar to results obtained when stimulating the CNTF/LIF pathway, whereas blocking NO production with a NOS inhibitor significantly reduce natural cell death, similar to results obtained when blocking the CNTF/LIF pathway.

If exposure to CNTF during retinal development causes cell death by increasing production of NO, the prediction is that blocking NOS would be sufficient to abolish the pro-apoptotic effects of CNTF overexposure during retinal development. Consistent with this hypothesis, we found that co-injection of L-NAME together with the CNTF protein in the vitreous of P2 mice can significantly abolish the CNTF-induced cell death seen at P3 compared to injection of CNTF alone (Fig. 8C). These results indicate that NOS activity is necessary for CNTF-mediated developmental cell death.

Finally, we tested whether stimulating or blocking the CNTF/LIF signalling pathway could regulate the expression of NOS. Analysis of mRNA extracted at P3 from retinas treated with rrCNTF at P2 reveals that stimulation of the CNTF/LIF signalling pathway causes a significant increase in the expression of mRNA encoding both nNOS and eNOS isoform expression at P3 (Fig. 8E), whereas iNOS isoform expression did not change (not shown). Conversely, blocking the CNTF/LIF signalling pathway by injecting AdLIF05 at P2, resulted in a significant reduction in the expression of both nNOS and eNOS at P7 (Fig. 8F). Taken together, these results suggest that stimulation of the CNTF/LIF signalling pathway increases the expression of NOS in the developing retina, which in turn increases the production of NO and leads to photoreceptor precursor cell death.

### 3.5 DISCUSSION

In this study, we have stimulated or blocked the CNTF/LIF signalling pathway at different stages of postnatal mouse retinal development to study the role of this pathway in retinal cell death and differentiation *in vivo*. We found that the CNTF/LIF signalling pathway participates in the regulation of opsin expression *in vivo*, and to the programmed cell death of a sub-population of post-mitotic precursor cells committed to the rod photoreceptor lineage via stimulation of NO production. We propose that the CNTF/LIF signalling pathway act during development to fine-tune the numerical balance of photoreceptors.

#### ***Regulation of photoreceptor cell differentiation by the CNTF/LIF signalling pathway***

Previous *in vitro* studies have shown that stimulation of the CNTF/LIF signalling pathway in rodents reduces the number of cells expressing rhodopsin (Ezzeddine et al., 1997; Neophytou et al., 1997; Ozawa et al., 2004). In addition, retinal explants from CNTFR $\alpha$  *-/-* newborn mice show a slight increase in the number of rhodopsin-positive cells after 10 days in culture (Ezzeddine et al., 1997), and blockade of STAT signalling in explants from wild-type newborn mice also results in more rhodopsin-positive cells over controls (Rhee et al., 2004). In an *in vitro* assay, Neophytou et al. provided evidence that stimulation of the CNTF pathway acts by regulating the onset of rhodopsin expression, rather than influencing cell-fate decisions in dissociated cultures (Neophytou et al., 1997). In agreement with these results, we found that overexposure to CNTF during retinal development *in vivo* reduces the expression of rhodopsin, whereas blocking the stimulation of the CNTF/LIF pathway with the dominant-negative LIF05 accelerates the appearance of rhodopsin-positive cells. Since previous studies have shown that rods can delay their final differentiation for several days after they become post-mitotic (Morrow et al., 1998), our *in vivo* results suggest that the CNTF/LIF signalling pathway may play an important part in this process.

In a previous study, when cultures of newborn rat retinal cells were overexposed to CNTF,

the number of cells expressing markers of bipolar cells was found to increase (Ezzeddine et al., 1997). Exposure of rat retinal explants to high concentrations of CNTF also resulted in an increased number of cells expressing bipolar cell markers, but also revealed that a significant number of these cells were located in the photoreceptor layer and had photoreceptor cell morphology, suggesting that exposure to high concentrations of CNTF may induce aberrant bipolar cell marker expression in some photoreceptor cells (Schulz-Key et al., 2002). In the present study, although we observed a reduction of rhodopsin-positive cells and delayed expression of rhodopsin after overexposure to CNTF *in vivo*, we did not find evidence for increased number of cells expressing bipolar cell markers and did not observe any cells in the photoreceptor layer expressing bipolar cell markers. The nature of the discrepancy between our *in vivo* findings in the mouse retina and these previous *in vitro* results in rat retina remains unclear. In addition to possible species-specific differences, it is possible that the concentrations achieved in the eye following injection of rrCNTF or AdCNTF vectors are not as high as those used in these studies.

A recent study suggested that addition of CNTF to cell cultures of mouse retinal cells causes an increase in the number of Müller glial cells (Goureau et al., 2004). Here, although we find that exposure to CNTF during retinal development *in vivo* causes an increase in GFAP expression, as reported in this cell culture study (Goureau et al., 2004), we did not find evidence that CNTF exposure increased the number of Müller cells generated, as the number of cells expressing markers of Müller glial cells did not appear different following exposure to CNTF (Supplementary Figure 2) and the number of Müller cells generated in the lineage experiments was not changed after exposure to CNTF (clones contained  $2.4 \pm 1.3\%$  of Müller cells in CNTF-treated eyes, compared to  $2.0 \pm 0.5\%$  in r $\beta$ -Gal-injected eyes). Thus, at least in the mouse retina *in vivo*, stimulation of the CNTF/LIF signalling pathway appears to act by modulating the timing of rhodopsin expression, but does not induce cell-fate changes.



***Regulation of naturally occurring cell death in the developing retina by the CNTF/LIF signalling pathway***

Addition of CNTF or LIF to developing sympathetic neurons of the rat superior cervical ganglion in culture causes neuronal cell death in a dose-dependent manner, an effect mediated by the classic CNTF receptor (Kessler et al., 1993). Similarly, in our study, we showed that increasing the concentration of CNTF in the postnatal mouse retina *in vivo* during the period of rod cell generation and differentiation, results in the dose-dependent apoptotic death of many postmitotic rhodopsin-negative rod precursor cells, and that a sustained overexposure beginning shortly after birth leads to a profound deficit in photoreceptors in the mature retina, while other retinal cell types are numerically unaffected. It is likely that this pro-apoptotic effect of CNTF is mediated by signalling through the CNTF/LIF receptor complex, based on the following observations. 1) A similar pro-apoptotic effect is seen with LIF, a protein with relatively low sequence homology to CNTF but using the same transducing components (i.e. LIFR $\beta$  and gp130), whereas administration of purified murine IL-6, an interleukin of the same family that uses gp130 but not LIFR $\beta$ , has no effect on apoptosis. 2) Prior exposure to the LIF05 protein, a dominant-negative ligand of the CNTF/LIF signalling complex, abolishes the pro-apoptotic effect of CNTF and also reduces the number of photoreceptor precursors triggering naturally occurring cell death.

In the rhodopsin knockout mouse, the absence of rhodopsin results in a complete absence of rod outer segments, and a progressive loss of photoreceptors (Humphries et al., 1997; Lem et al., 1999). Could the massive deficit in photoreceptors seen following stimulation of the CNTF/LIF receptor complex be only secondary to the blockade in rhodopsin expression? Our results strongly argue against this possibility. First, in the rhodopsin knockout mice, significant photoreceptor degeneration only begins around P15 (Humphries et al., 1997; Lem et al., 1999), whereas we have shown that immature retinas exposed to Ad-CNTF from P2 already have an important reduction of more than half the normal ONL thickness as early as P9. Second, a single injection of rrCNTF causes a dramatic increase in cell death as early as 20 hours after injection; such a rapid response is unlikely to be the result of an indirect effect from a blockade of rhodopsin expression. Third, CNTF-induced apoptosis in the immature

retina is observed at P1 following injection of rrCNTF at P0 (not shown), when we hardly detect any rho<sup>+</sup> cells at P1 in the untreated retinas. So, while we do indeed see a second wave of increased apoptosis between P15 and P21 following administration of the Ad-CNTF vector at P2 that could be the result of prolonged blockade of rhodopsin expression achieved by prolonged exposure to CNTF, this secondary wave contributes minimally to the photoreceptor deficit since most cell loss has already occurred by P9, many days before the beginning of photoreceptor loss in rhodopsin knockout mice.

An interesting observation in our study is that overexposure to CNTF leads to a specific cell death of post-mitotic photoreceptor precursor cells. In cell lineage tracing experiments using retroviral vectors, we found that the proportion of clones containing only photoreceptor cells was dramatically reduced following overexposure to CNTF, whereas that of other types of clones was unaffected. These results suggest that post-mitotic precursors committed to the rod photoreceptor lineage are specifically responding to this increase in retinal CNTF by triggering a cell death program. Moreover, these results suggest that postmitotic rod precursors born from progenitors generating only ONL cells are different from those generated from progenitors giving rise to ONL + INL cells, at least relative to their response to environmental signals regulating cell survival. Interestingly, photoreceptor-only clones are the most numerous types of clones found in retinal lineage studies (Holt et al., 1988; Turner and Cepko, 1987; Turner et al., 1990; Wetts and Fraser, 1988), suggesting that a certain amount of cell death might be necessary in these clones to fine-tune the numerical balance of photoreceptors.

### ***Mechanism of CNTF-induced developmental cell death***

In this report, we provide a potential mechanism by which stimulation of the CNTF/LIF pathway might lead to photoreceptor precursor cell death. We found that the CNTF/LIF pathway can positively regulate the expression of neuronal and endothelial NOS, and that the pro-apoptotic effects of a stimulation of the CNTF/LIF pathway during retinal development can be blocked by a pan-NOS inhibitor. In addition, developmental retinal cell death is increased or decreased with a NO donor or a NOS inhibitor respectively. These

results strongly suggest that stimulation of the CNTF/LIF signalling pathway during retinal development leads to an increase in NO production by stimulation of NOS expression, which in turn triggers developmental cell death of photoreceptor precursors. But which retinal cell type could respond to a CNTF ligand by increasing NO production? The prediction is that this cell type would require the presence of the CNTFR $\alpha$ . However, the presence of the CNTFR $\alpha$  protein and the responsiveness of rod photoreceptors or precursors to members of the CNTF family ligands is still controversial. Numerous studies have reported either the presence of the protein, or the expression (Ju et al., 2000; Rhee and Yang, 2003; Schulz-Key et al., 2002; Valter et al., 2003) or absence thereof (Beltran et al., 2005; Harada et al., 2002; Kirsch et al., 1997; Wahlin et al., 2004) of the gene encoding this receptor subunit in developing and adult rodent photoreceptors. Nonetheless, recent results showed that stimulation of the CNTF signalling pathway induces a strong STAT3 activation in postmitotic immature rod photoreceptors within minutes after stimulation (Rhee et al., 2004), suggesting that overexposure to CNTF in our study might act directly on postmitotic immature photoreceptor cells. It is also possible, however, that the pro-apoptotic effects of CNTF are indirect. One possible candidate cell type for such indirect effects is the retinal ganglion cell (RGC). It is clear that RGCs express CNTFR $\alpha$  (Kirsch et al., 1997) and can respond to CNTF (Meyer-Franke et al., 1995). Interestingly, a recent study has shown that NOS is expressed in RGCs and that RGCs can produce NO (Tsumamoto et al., 2002). Together with data showing that NO can induce cell death of both mature and developing photoreceptors (Donovan et al., 2001; Goureau et al., 1999; Ju et al., 2001), these results suggest that a CNTF ligand might stimulate NOS expression in RGCs and the release of NO, which could act to induce cell death in adjacent developing photoreceptor precursor cells.

In retinal cell culture experiments, increased cell death was not reported following addition of CNTF. How can we reconcile these results with our findings *in vivo*? First, it is possible that increased cell death in culture went undetected, as dying cells tend to detach from the culture plate and neighbouring cells *in vitro*. Second, because our data suggest that the induction of cell death *in vivo* after exposure to CNTF might occur indirectly via RGCs, it is possible that these RGCs, or another cell type responsible for NO production following stimulation of the CNTF/LIF pathway, are either not present -or have died- under the culture conditions used. Third, as the effects of CNTF requires NO production, it is likely that NO

rapidly diffuse away from the culture medium *in vitro*, thereby preventing the induction of cell death.

What could be the downstream events that lead to cell death in postmitotic photoreceptor precursor cells following NO production? Two pro-apoptotic Bcl-2 family members, Bak and Bax, are apparently implicated in developmental photoreceptor apoptosis (Hahn et al., 2003). Indeed, it has been reported that the double knockout mouse (Bak *-/-*, Bax *-/-*), shows an almost complete block of natural cell death in the immature INL at P7 (Hahn et al., 2003). Interestingly, in the Bax *-/-* retina, overall cell death is reduced in the INL, but not in the inner rods population (photoreceptor precursors), suggesting that both Bak and Bax are required for normal photoreceptor cell death at P7 (Hahn et al., 2003). When we blocked the CNTF/LIF signalling pathway using LIF05, we found a reduced number of cell death in the inner rods population located in the outer INL, whereas cell death in the inner part of the INL was not affected. Consistent with previous results in the Bak and Bax knockouts, RT-PCR analysis on retinas injected with rrCNTF revealed an increase in Bak, but not Bax mRNA, compared to control (Supplementary Figure 4). These observations suggest that blocking the CNTF receptor complex might regulate Bak signalling, which would explain the specific blockade of apoptosis in photoreceptor precursor cells, but not in other cell types.

### ***Ligands mediating developmental retinal cell death***

As the CNTF protein does not have a leader signal sequence and is not normally secreted by cells *in vitro* (Stockli et al., 1989), it seems more likely that other ligands signalling through the CNTF/LIF pathway mediate the *in vivo* effects. One potential candidate is LIF, which has been shown to be expressed in the postnatal retina (Neophytou et al., 1997), and injection of rrLIF also increase developmental cell death (not shown). Other candidates include Cardiotrophin-like cytokine (CLC), which, in association with Cytokine-like factor (CLF), or with the soluble form of CNTFR $\alpha$ , can generate soluble composite cytokines which also bind and activate the CNTF receptor complex (Elson et al., 2000; Lelievre et al., 2001; Plun-Favreau et al., 2001). In addition, a new cytokine recently discovered that is

closely related to CNTF, named Neuropeitin, is expressed during embryonic development of the nervous system including the retina and can also activate the CNTF/LIF signalling pathway (Derouet et al., 2004). Using RT-PCR, we confirmed in this study that CLC and CLF are expressed in the retina, and intravitreal injection of CLC and CLF in neonatal mouse caused a sharp increase in cell death similar to that observed with injections of CNTF. Thus, we suggest that these secreted ligands such as LIF, CLC, or CLF, might be the natural stimulators of the CNTF/LIF signalling pathway in vivo. Future studies should help determine directly whether one or more of these factors is involved in the regulation of the developmental cell death of rod photoreceptors.

### ***Conclusions***

As photoreceptor cells are the major cell type in the retina, composing more than 70% of all the retinal cells, and that photoreceptor-only clones are the major type of clones observed in lineage experiments, it is likely that a certain amount of programmed cell death is required to fine tune the numerical balance between photoreceptors and other retinal cell types. A detailed analysis of natural cell death in the developing retina suggested that programmed cell death has a profound effect on shaping retinal cell numbers (Voyvodic et al., 1995). Based on our findings, we propose that, in addition to the low-affinity neurotrophin receptor p75NTR, the CNTF/LIF signalling pathway plays a critical part in regulating this process.

## 3.6 MATERIALS AND METHODS

### *Animals*

All animal work was carried in accordance with Université Laval and Canadian Institute of Health Research guidelines. C57/B16J and Balb/C were used for this study. Mice were injected at different postnatal day and were kept under cyclic light (12 hr light/dark) until sacrifice.

### *Viral vectors and intraocular injections*

Injections were performed under stereomicroscopy using a glass capillary as previously described (Cayouette and Gravel, 1997). The volume of the injection was maintained between 0.5 and 1  $\mu$ l, and the inoculum was delivered with a varistaltic pump at 0.5  $\mu$ l/min. The titer of adenoviral vectors were: AdCNTF ( $2.9 \times 10^7$  Transducing units (TUs)), AdLacZ ( $2 \times 10^7$  TUs) and AdLIF05 ( $2.5 \times 10^8$  TUs). The procedures for construction and purification of adenoviral vectors has been described elsewhere (Cayouette and Gravel, 1997; Vilquin et al., 1995). Purified rat recombinant CNTF (rrCNTF, PeproTech), mouse recombinant leukemia inhibitory factor (mrLIF, Peprotech), rat Interleukin-6 (IL-6, Peprotech) or recombinant E. coli  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -Gal, Life Technologies) was injected into the vitreous at different concentrations (see text) diluted in a physiological buffer. All animals injected with AdCNTF or rrCNTF into one eye received a control injection of vehicle, r $\beta$ -Gal or AdLacZ into the contralateral eye, so that one eye could always serve as an internal control.

For lineage analysis, mice were injected at P1 with 1  $\mu$ l of pCLE-AP (Gaiano et al., 1999), a replication-incompetent retrovirus encoding human placental alkaline phosphatase in both eyes. The retroviral vector was prepared as previously described (Cayouette et al., 2001). At

P4, 250 ng rrCNTF was injected into the vitreous of the left eye and the right eye was injected with r $\beta$ -Galactosidase as control. For AdLIF05 experiments, mice were injected into the vitreous with 0.5  $\mu$ l of AdLIF05 or AdLacZ the day after retroviral vector injection. The eyes were collected at P21 and sectioned.

### ***Histology and Immunohistochemistry***

Animals were sacrificed and eyes were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde, cryoprotected in sucrose 30% and both eyes frozen and embedded in the same block. Cryostat sections (12  $\mu$ m) encompassing the 2 retinas were collected on poly-L-lysine coated slides. Some sections were stained with hematoxylin-eosin for histological analysis, or processed for immunofluorescence. Sections were pre-incubated for 30 minutes in PBS, 0,2% Triton X-100, and 10% horse serum and then incubated overnight at 4°C with primary antibodies: anti-opsin antibody rho 1D4 (1:100; (Molday and MacKenzie, 1983), anti Islet-1 monoclonal antibody (1:100; from Dev. Studies Hybridoma bank), anti protein kinase C (PKC) (1:100; Santa Cruz) or anti-RET-B1 antibody (1:20, (Barnstable, 1980)) diluted in PBS, 0,1% Triton X-100, and 5% horse serum. Bound antibodies were detected with Goat anti-mouse Alexa 488 (1:500, Molecular Probes) in PBS or by incubation for 2 hours in donkey anti-rabbit or anti-mouse biotinylated IgG antibody (1:500, Jackson immunoresearch), followed by 1 hr incubation in streptavidin-FITC (1:1000, Jackson immunoresearch) in PBS. Sections were mounted in Mowiol containing 5 $\mu$ g/ml propidium iodide, 6  $\mu$ g/ml DAPI or 1 $\mu$ g/ml Hoescht and 25 units RNase A, and observed under a fluorescence microscope (Nikon TE2000-U or Leica DM6000B).

For alkaline phosphatase detection, retinal sections were first immersed in PBS at 65°C for 1 hour, and then in a solution of 4-nitro blue tetrazolium chloride (NBT/BCIP, Roche) at 37°C until the desired level of staining was achieved (typically 1-2 hours).

### ***Dominant-negative LIF05 construction and functional assay***

Human LIF cDNA was altered using oligonucleotide-mediated mutagenesis so that the encoded protein have the following substitutions: A117E, D120R, I121K, G124N, S127L, Q25L, S28E, Q32A and S36K. The mutated cDNA was then inserted into an E1-deleted Ad5 genome under control of the cytomegalovirus immediate-early promoter. The resulting viral vector (AdLIF05) was tested for its capacity to confer production and secretion of the CNTF receptor dominant-negative ligand to infected cells. For this purpose, supernatants from AdLIF05-infected, AdLacZ-infected or sham-infected Vero cells (ATCC number CCL-81) cultured in DMEM without serum were added in various amounts to the culture medium of the neuroblastoma cell line IMR-32, that express the tripartite CNTF receptor complex (Bartoe and Nathanson, 2002) (J.E. and C.G, unpublished). The culture medium was then supplemented with 50 pM rrCNTF for 20 minutes, the cells collected and protein extracts prepared and analyzed for their content in total and phosphorylated STAT-3

### ***Western blots***

Cells were harvested, sonicated and lysed in a TRIS-EDTA buffer: 0.25 M TRIS pH 7.6, 10 mM EDTA with Complete<sup>TM</sup> protease inhibitor cocktail (Roche). 80 µg of protein samples were separated by electrophoresis on an 8% SDS-PAGE gels for 60 min. and then transferred onto Immobilon membranes (Millipore, Bedford, MA) for 60 min at 100 mV in 10% methanol transfer buffer. The membranes were blocked with 5% milk in PBS, 0.1% Triton, pH 7.4. Immunoblotting with the rabbit anti-phospho-STAT3 (Cell Signalling Technology) or rabbit anti-STAT3 (1:1000, Upstate) was performed at 4 °C overnight in PBS, 0.05% Triton with 1% milk. The primary antibody was detected with an HRP-conjugated donkey anti-rabbit (1: 10,000) (Jackson Immunoresearch) in PBS-Triton 0.05%. Detection of bound antibodies was visualized with ECL kit (Perkin Elmer Life Science)



### ***TUNEL, PCNA labelling and Cell Death ELISA***

To detect apoptotic cells, retinal sections were processed for Terminal dUTP-Nick End Labelling (TUNEL), using the Apoptag® Plus kit (Serologicals Corp.) according to the recommendations of the manufacturer.

For the TUNEL-PCNA double labelling, TUNEL was performed before the PCNA detection. After TUNEL labelling sections were incubated for an hour in urea 0.8M at 65°C for antigen recovery. Sections were then rinsed in PBS and permeabilized for 30 minutes in PBS-Triton 0.2% containing 10% horse serum, then incubated overnight at 4°C in the anti-PCNA monoclonal antibody (1:100, Zymed laboratories inc.) diluted in PBS-Triton 0.2% containing 5% Horse serum. Primary antibodies were detected as described above and slides were mounted with Mowiol, and 3 regions of retina per animal were analyzed by acquiring Z-stacks. Colocalization analysis and orthogonal plans were made using the Velocity®3.6 software (Improvision).

Quantification of cell death was done using the Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche biochemicals). Retinas were individually trypsinized, rinsed in PBS, and the cells resuspended in the supplied lysis buffer. The lysate was centrifuged at 20 000 x g for 10 min, and the supernatant diluted 1:15 before processing for ELISA assay following the recommendations of the manufacturer. The amount of soluble nucleosomes in each sample was used as an estimate of apoptotic rate in the retina and was normalized with the total protein content. Retinas from control or rrCNTF-treated eyes with or without 800ng of L-NAME were compared. Statistical comparisons were done using the student's T-test.

### ***RT-PCR***

Retinas were pooled by group of 3, and total RNA was extracted from each pool using the RNeasy kit (Qiagen). 4 µg of RNA was reverse-transcribed in a volume of 20µl and 1 µl of

the cDNA mixture subjected to 30 round of PCR amplification using 200 nM of primers. 6µl of cDNA were used for NOS, Bax and Bak amplifications and 2 µl for GADPH. Primers used were:

mCNTF forward	5'-TGTCGACAAGTAAATCCACA-3'
mCNTF reverse	5'-GGAGCACCACATTAATACC-3'
mCNTFR forward	5'-GTGAATTCGTCAAAGGTGAT-3'
mCNTFR reverse	5'-CTACTACCCCAATACCTACA-3'
mCLC forward	5'-CGAGCCTGACTTCAATCCTC-3'
mCLC reverse	5'-GAAACCATGTGCCTCCAAGT-3'
mCLF forward	5'-AGCAGTCAGGAGACAATCTG-3'
mCLF reverse	5'-GAGGACATCAGATCTTGCTG-3'

For NOS, amplicons from RT-PCR were fractionated on 2% agarose gels, and blotted onto nylon membranes. Southern Blot analysis was performed with probes generated by PCR and end-labelled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP. The result was visualized and quantified with the Personal Molecular imager FX (Bio-Rad).

### ***Retinal cell dissociation and quantitative analysis***

Retinas were dissected in PBS and dissociated as described (Cayouette et al., 2003), and resuspended in PBS. 150 000 cells in 200 µl were plated on slides using a cytopspin (5min at 700 rpm) and then fixed with 4% paraformaldehyde. The cells were immediately post-fixed in an ethanol: acetic acid (95:5) solution and processed for TUNEL and rhodopsin immunohistochemistry as described above. Individual retinal cytopspins were observed under fluorescence microscope (Nikon Eclipse TE2000-U) and cells were counted in three regions with using Metamorph® (Universal imaging corporation<sup>TM</sup>).

### *Morphometric analysis*

The outer nuclear layer (ONL) column height (Michon et al., 1991) was measured by counting the number of rows of photoreceptor nuclei making up the ONL at 100-125  $\mu\text{m}$  intervals from the ora serrata to the optic nerve head on five hematoxylin-eosin stained sections spaced 60  $\mu\text{m}$  apart. The mean of these values was used as the estimate of ONL column height for each eye. Statistical comparisons were done using Student's T-test. For the PKC and Islet-1 immunolabelling, cells were counted (INL total cells and positive cells) on three half retina per animal.

### 3.7 ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Caroline Paquet and Ann Lorain for expert technical assistance, Drs Robert Molday and Colin Barnstable for providing the Rho1D4 and Ret-B1 antibodies, and Martin Raff for comments on the manuscript. This work was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research (M.C. and C.G.) and the Foundation Fighting Blindness – Canada (M.C.). M.C. is a W.K. Stell Scholar of the Foundation Fighting Blindness – Canada.

### 3.8 REFERENCES

- Barnstable, C. J. (1980). Monoclonal antibodies which recognize different cell types in the rat retina. *Nature* **286**, 231-5.
- Bartoe, J. L., and Nathanson, N. M. (2002). Independent roles of SOCS-3 and SHP-2 in the regulation of neuronal gene expression by leukemia inhibitory factor. *Brain Res Mol Brain Res* **107**, 108-19.
- Bazan, J. F. (1991). Neuropoietic cytokines in the hematopoietic fold. *Neuron* **7**, 197-208.
- Bhattacharya, S., Dooley, C., Soto, F., Madson, J., Das, A. V., and Ahmad, I. (2004). Involvement of Ath3 in CNTF-mediated differentiation of the late retinal progenitors. *Mol Cell Neurosci* **27**, 32-43.
- Cayouette, M., Barres, B. A., and Raff, M. (2003). Importance of intrinsic mechanisms in cell fate decisions in the developing rat retina. *Neuron* **40**, 897-904.
- Cayouette, M., Behn, D., Sendtner, M., Lachapelle, P., and Gravel, C. (1998). Intraocular gene transfer of ciliary neurotrophic factor prevents death and increases responsiveness of rod photoreceptors in the retinal degeneration slow mouse. *J Neurosci* **18**, 9282-93.
- Cayouette, M., and Gravel, C. (1997). Adenovirus-mediated gene transfer of ciliary neurotrophic factor can prevent photoreceptor degeneration in the retinal degeneration (rd) mouse. *Hum Gene Ther* **8**, 423-30.
- Cayouette, M., Whitmore, A. V., Jeffery, G., and Raff, M. (2001). Asymmetric segregation of Numb in retinal development and the influence of the pigmented epithelium. *J Neurosci* **21**, 5643-51.
- Derouet, D., Rousseau, F., Alfonsi, F., Froger, J., Hermann, J., Barbier, F., Perret, D., Diveu, C., Guillet, C., Preisser, L., Dumont, A., Barbado, M., Morel, A., deLapeyriere, O., Gascan, H., and Chevalier, S. (2004). Neuropoietin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4827-32.
- Ding, J., Hu, B., Tang, L. S., and Yip, H. K. (2001). Study of the role of the low-affinity neurotrophin receptor p75 in naturally occurring cell death during development of the rat retina. *Dev Neurosci* **23**, 390-8.
- Elson, G. C., Lelievre, E., Guillet, C., Chevalier, S., Plun-Favreau, H., Froger, J., Suard, I., de Coignac, A. B., Delneste, Y., Bonnefoy, J. Y., Gauchat, J. F., and Gascan, H. (2000). CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci* **3**, 867-72.

- Ezzeddine, Z. D., Yang, X., DeChiara, T., Yancopoulos, G., and Cepko, C. L. (1997). Postmitotic cells fated to become rod photoreceptors can be respecified by CNTF treatment of the retina. *Development* **124**, 1055-67.
- Frade, J. M., and Barde, Y. A. (1999). Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord. *Development* **126**, 683-90.
- Frade, J. M., Rodriguez-Tebar, A., and Barde, Y. A. (1996). Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* **383**, 166-8.
- Frederick, J., Bronson, J. D., and Baehr, W. (2000). Animal models of inherited retinal diseases. *Methods Enzymol* **316**, 515-26.
- Gaiano, N., Kohtz, J. D., Turnbull, D. H., and Fishell, G. (1999). A method for rapid gain-of-function studies in the mouse embryonic nervous system. *Nat Neurosci* **2**, 812-9.
- Gupta, S. K., Jollimore, C. A., McLaren, M. J., Inana, G., and Kelly, M. E. (1997). Mammalian retinal pigment epithelial cells in vitro respond to the neurokinins ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor. *Biochem Cell Biol* **75**, 119-25.
- Hahn, P., Lindsten, T., Ying, G. S., Bennett, J., Milam, A. H., Thompson, C. B., and Dunaief, J. L. (2003). Proapoptotic bcl-2 family members, Bax and Bak, are essential for developmental photoreceptor apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 3598-605.
- Harada, C., Harada, T., Nakamura, K., Sakai, Y., Tanaka, K., and Parada, L. F. (2005). Effect of p75(NTR) on the regulation of naturally occurring cell death and retinal ganglion cell number in the mouse eye. *Dev Biol*.
- Holt, C. E., Bertsch, T. W., Ellis, H. M., and Harris, W. A. (1988). Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth date. *Neuron* **1**, 15-26.
- Hudson, K. R., Vernallis, A. B., and Heath, J. K. (1996). Characterization of the receptor binding sites of human leukemia inhibitory factor and creation of antagonists. *J Biol Chem* **271**, 11971-8.
- Humphries, M. M., Rancourt, D., Farrar, G. J., Kenna, P., Hazel, M., Bush, R. A., Sieving, P. A., Sheils, D. M., McNally, N., Creighton, P., Erven, A., Boros, A., Gulya, K., Capecchi, M. R., and Humphries, P. (1997). Retinopathy induced in mice by targeted disruption of the rhodopsin gene. *Nat Genet* **15**, 216-9.
- Kessler, J. A., Ludlam, W. H., Freidin, M. M., Hall, D. H., Michaelson, M. D., Spray, D. C., Dougherty, M., and Batter, D. K. (1993). Cytokine-induced programmed death of cultured sympathetic neurons. *Neuron* **11**, 1123-32.
- Kirsch, M., Fuhrmann, S., Wiese, A., and Hofmann, H. D. (1996). CNTF exerts opposite effects on in vitro development of rat and chick photoreceptors. *Neuroreport* **7**, 697-700.

- Kirsch, M., Schulz-Key, S., Wiese, A., Fuhrmann, S., and Hofmann, H. (1998). Ciliary neurotrophic factor blocks rod photoreceptor differentiation from postmitotic precursor cells in vitro. *Cell Tissue Res* **291**, 207-16.
- LaVail, M. M., Unoki, K., Yasumura, D., Matthes, M. T., Yancopoulos, G. D., and Steinberg, R. H. (1992). Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11249-53.
- Lelievre, E., Plun-Favreau, H., Chevalier, S., Froger, J., Guillet, C., Elson, G. C., Gauchat, J. F., and Gascan, H. (2001). Signaling pathways recruited by the cardiotrophin-like cytokine/cytokinelike factor-1 composite cytokine: specific requirement of the membrane-bound form of ciliary neurotrophic factor receptor alpha component. *J Biol Chem* **276**, 22476-84.
- Lem, J., Krasnoperova, N. V., Calvert, P. D., Kosaras, B., Cameron, D. A., Nicolo, M., Makino, C. L., and Sidman, R. L. (1999). Morphological, physiological, and biochemical changes in rhodopsin knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 736-41.
- Meyer-Franke, A., Kaplan, M. R., Pfrieger, F. W., and Barres, B. A. (1995). Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron* **15**, 805-19.
- Michon, J. J., Li, Z. L., Shioura, N., Anderson, R. J., and Tso, M. O. (1991). A comparative study of methods of photoreceptor morphometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **32**, 280-4.
- Molday, R. S., and MacKenzie, D. (1983). Monoclonal antibodies to rhodopsin: characterization, crossreactivity, and application as structural probes. *Biochemistry* **22**, 653-60.
- Morrow, E. M., Belliveau, M. J., and Cepko, C. L. (1998). Two phases of rod photoreceptor differentiation during rat retinal development. *J Neurosci* **18**, 3738-48.
- Neophytou, C., Vernallis, A. B., Smith, A., and Raff, M. C. (1997). Muller-cell-derived leukaemia inhibitory factor arrests rod photoreceptor differentiation at a postmitotic pre-rod stage of development. *Development* **124**, 2345-54.
- Ozawa, Y., Nakao, K., Shimazaki, T., Takeda, J., Akira, S., Ishihara, K., Hirano, T., Oguchi, Y., and Okano, H. (2004). Downregulation of STAT3 activation is required for presumptive rod photoreceptor cells to differentiate in the postnatal retina. *Mol Cell Neurosci* **26**, 258-70.
- Plun-Favreau, H., Elson, G., Chabbert, M., Froger, J., deLapeyriere, O., Lelievre, E., Guillet, C., Hermann, J., Gauchat, J. F., Gascan, H., and Chevalier, S. (2001). The ciliary neurotrophic factor receptor alpha component induces the secretion of and is required for functional responses to cardiotrophin-like cytokine. *Embo J* **20**, 1692-703.

Schulz-Key, S., Hofmann, H. D., Beisenherz-Huss, C., Barbisch, C., and Kirsch, M. (2002). Ciliary neurotrophic factor as a transient negative regulator of rod development in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 3099-108.

Shuster, T. A., and Farber, D. B. (1986). Rhodopsin phosphorylation in developing normal and degenerative mouse retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **27**, 264-8.

Stockli, K. A., Lottspeich, F., Sendtner, M., Masiakowski, P., Carroll, P., Gotz, R., Lindholm, D., and Thoenen, H. (1989). Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature* **342**, 920-3.

Sung, C. H., Makino, C., Baylor, D., and Nathans, J. (1994). A rhodopsin gene mutation responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa results in a protein that is defective in localization to the photoreceptor outer segment. *J Neurosci* **14**, 5818-33.

Turner, D. L., and Cepko, C. L. (1987). A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* **328**, 131-6.

Turner, D. L., Snyder, E. Y., and Cepko, C. L. (1990). Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron* **4**, 833-45.

Vilquin, J. T., Guerette, B., Kinoshita, I., Roy, B., Goulet, M., Gravel, C., Roy, R., and Tremblay, J. P. (1995). FK506 immunosuppression to control the immune reactions triggered by first-generation adenovirus-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther* **6**, 1391-401. Voyvodic, J. T., Burne, J. F., and Raff, M. C. (1995). Quantification of normal cell death in the rat retina: implications for clone composition in cell lineage analysis. *Eur J Neurosci* **7**, 2469-78.

Wahlin, K. J., Campochiaro, P. A., Zack, D. J., and Adler, R. (2000). Neurotrophic factors cause activation of intracellular signaling pathways in Muller cells and other cells of the inner retina, but not photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 927-36.

Watanabe, T., and Raff, M. C. (1988). Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature* **332**, 834-7.

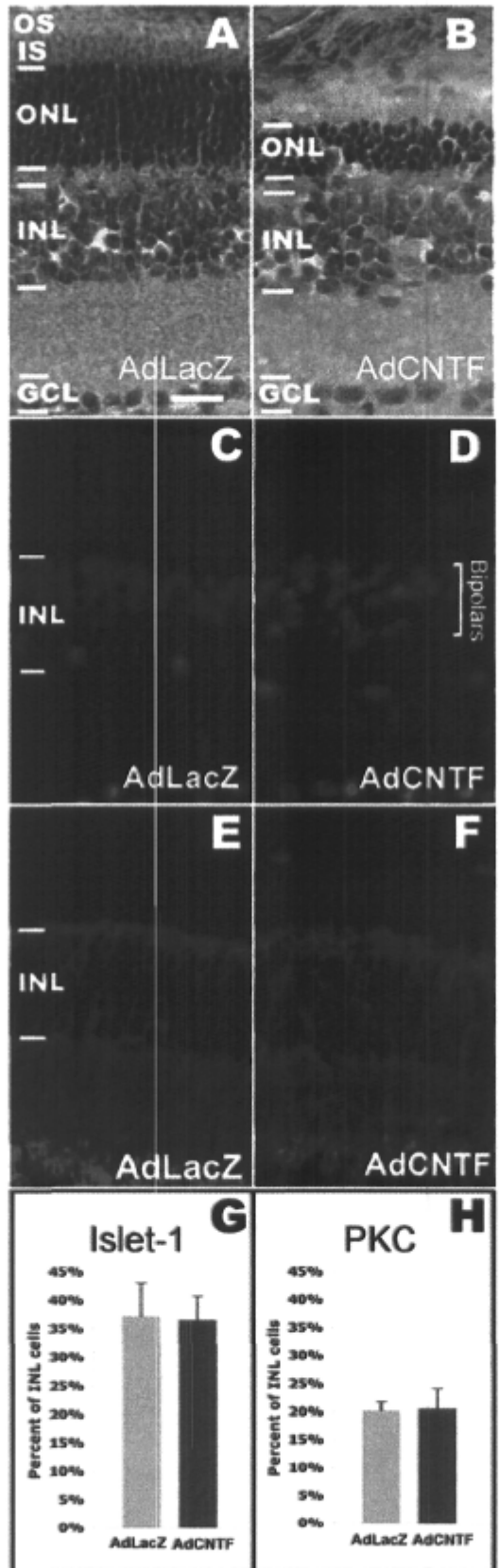
Wetts, R., and Fraser, S. E. (1988). Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina. *Science* **239**, 1142-5.

Young, R. W. (1984). Cell death during differentiation of the retina in the mouse. *J Comp Neurol* **229**, 362-73.

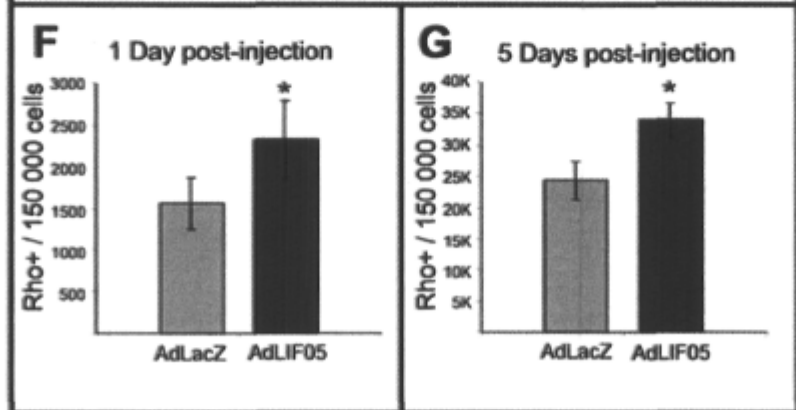
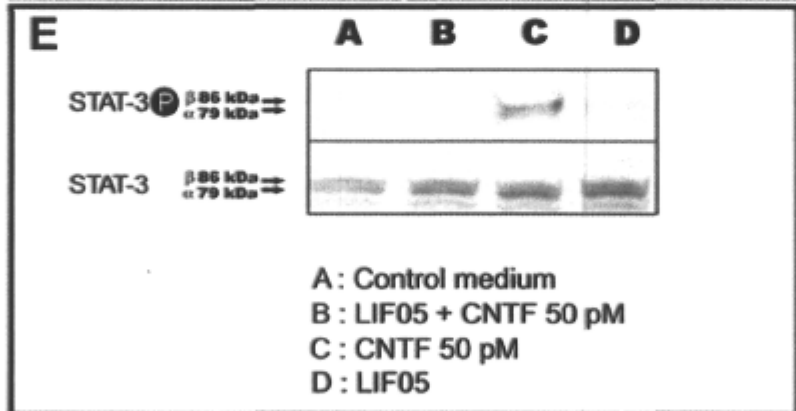
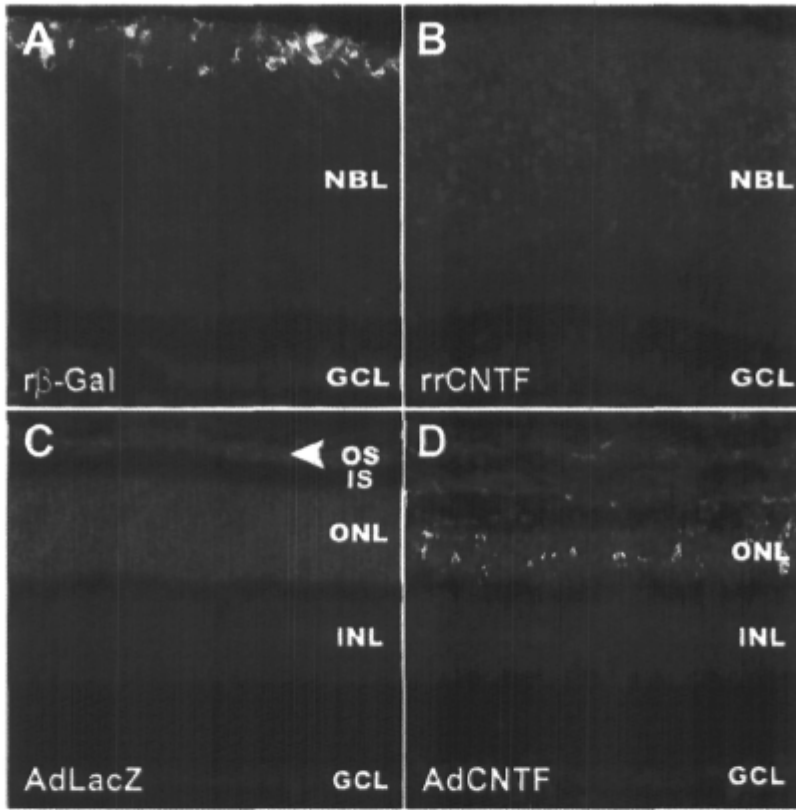


### 3.9 FIGURES

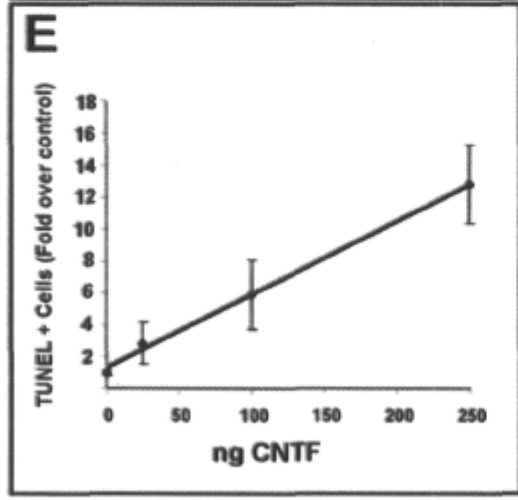
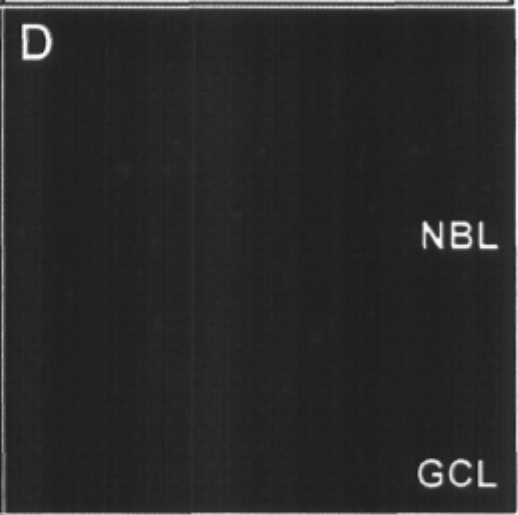
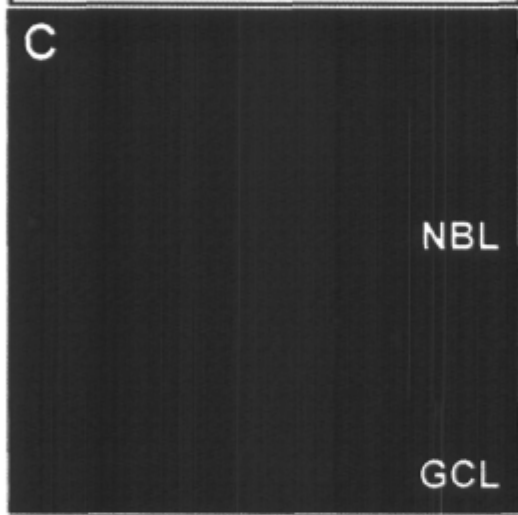
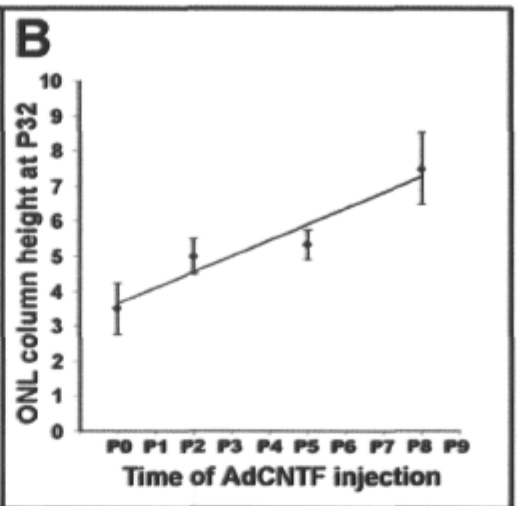
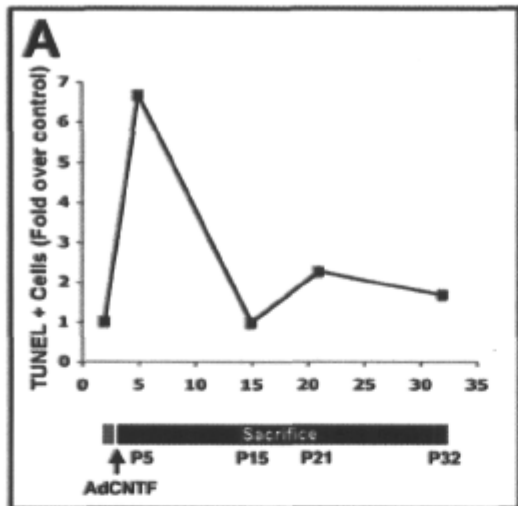
**Figure 1.** Exposure to CNTF during retinal development *in vivo* leads to photoreceptor deficit in the mature retina, but does not affect bipolar cell production. Hematoxylin-eosin staining of retinal sections from eyes of a P32 mouse injected at P2 with AdLacZ into the left eye (A) and AdCNTF into the right eye (B). (A) In the control retina, the number of photoreceptor rows (ONL column height) has reached its adult value of 11-12 rows. In contrast, the retina exposed to the AdCNTF vector shows an important reduction in ONL column height. (C-E) P21 retinal sections from eyes injected with AdLacZ (C, E) or AdCNTF (D, F) at P2 show similar number of bipolar cells, as revealed by immunostaining for Islet-1 (C, D; bipolar cells are pointed by the bracket; other positive cells are subsets of amacrine cells and ganglion cells), and PKC-alpha (E, F). (G, H) The retinas exposed to CNTF have a similar number of Islet-1 (G) and PKC-positive cells (H) than controls. Scale bar = 25  $\mu$ m.



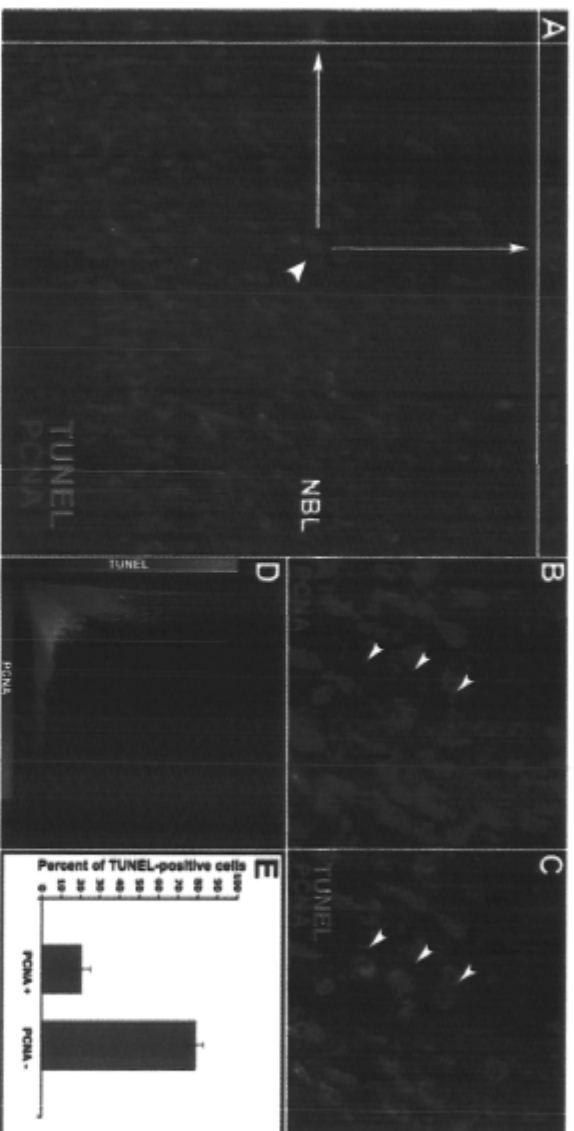
**Figure 2.** The CNTF/LIF signalling pathway regulates the timing of rhodopsin expression *in vivo*. (A, B) Rhodopsin immunostaining on retinal sections from P3 (A, B) and P32 (C, D) mice injected into the vitreous at P2 with r $\beta$ -Gal (A), rrCNTF (B), AdLacZ (C), or AdCNTF (D). At P3, rhodopsin-positive cells are detected in the control retina (A), whereas essentially no rhodopsin-positive cells are detected in the rrCNTF-injected eyes (B). At P32, control retinas injected with AdLacZ at P2 show rhodopsin concentrated exclusively in the outer segments (OS) of photoreceptors (arrowhead). In contrast, eyes injected with AdCNTF at P2 display only a few rhodopsin-positive cell bodies in the ONL, and no rhodopsin-positive OS are detected (D). (E) Western blot analysis of STAT-3 phosphorylated isoforms  $\alpha$  and  $\beta$  (STAT-3P) in IMR-32 Neuroblastoma cell line. STAT-3 phosphorylation indicates CNTF/LIF signalling pathway activation. Supernatant from non-infected (lane A), AdLIF05-infected (lane B and D), or AdLacZ-infected (lane C) Vero cells was used to grow IMR-32 cells. When rrCNTF is added to the medium of supernatant from AdLIF05-infected cells, STAT-3 is not phosphorylated (lane B). In contrast, when rrCNTF is added to medium of supernatant from AdLacZ-infected cells, STAT-3 is phosphorylated, as expected (lane C). Control medium from non-infected cells (lane A) and the medium from AdLIF05-infected cells only (lane D), does not induce STAT-3 phosphorylation. Total STAT-3 was used at loading control. (F, G) Number of rhodopsin-positive cells 1 day (F) or 5 days (G) following intravitreal injection of the AdLacZ control vector into the left eye and the AdLIF05 vector into the right eye at P2. The AdLIF05-injected eyes show significantly more rhodopsin-positive cells at both time points (\*  $p < 0.05$ , Student's paired t-test).



**Figure 3.** Overexposure to CNTF during retinal development *in vivo* leads to increased retinal cell death. (A) Timecourse of apoptotic cell death during retinal development following intravitreal injection of AdCNTF at P2. Animals were sacrificed at P5, P15, P21 and P32 and retinal sections processed for TUNEL. Note that P5 retinas already contain about 7 times more TUNEL-positive cells than controls. The number of apoptotic is back to that of controls at P15 and then a second, less important, wave of apoptotic cells is observed between P15 and P32. (B) Quantitative analysis of ONL column height, indicative of photoreceptor layer thickness, in P32 retinas injected at P0, P2, P5 or P8 with the AdCNTF vector. The ONL column height at P32 in eyes injected with AdCNTF during postnatal development is correlated to the time of AdCNTF injection. ( $R^2 = 0.9263$ ). (C, D) Detection of apoptotic cells by TUNEL on P3 retinal sections from eyes injected at P2 with r $\beta$ Gal (C) or rrCNTF (D). The sections are counterstained with Hoechst to reveal the cell nuclei (blue). The number of apoptotic cells in the neuroblast layer (NBL) of retinas exposed to CNTF is sharply increased (D), whereas apoptosis in the ganglion cell layer (GCL) is not affected. (E) A dose-response curve shows that the proportion of apoptotic cells increases as the concentration of injected rrCNTF increases.

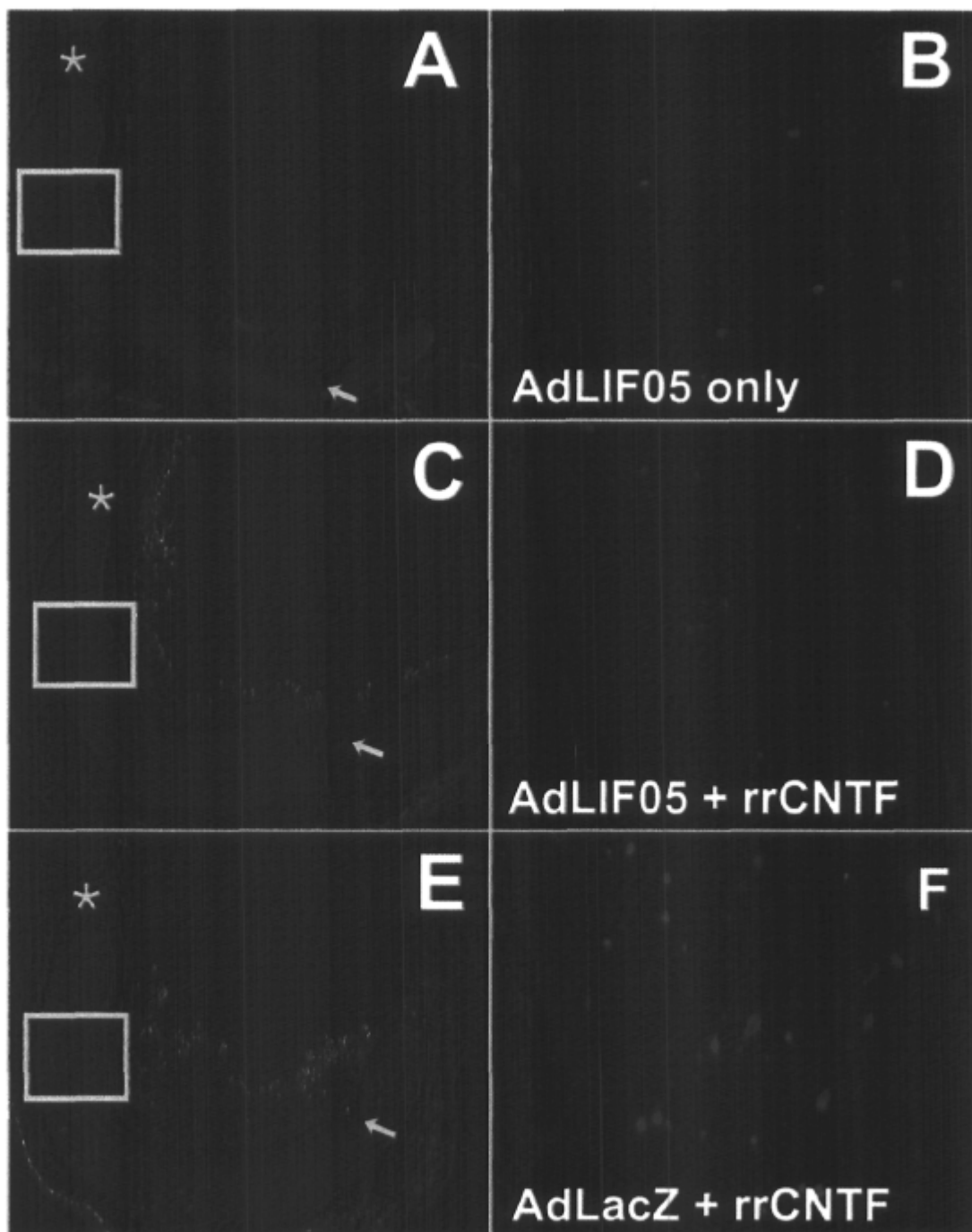


**Figure 4.** CNTF overexposure during retinal development *in vivo* induces cell death of postmitotic cells. (A) Orthogonal representation of a Z-stack reconstruction of a double labelling for TUNEL and PCNA on P3 retinal sections of an eye injected with rrCNTF at P2. TUNEL-positive cells (Red) are found mainly in the neuroblast layer (NBL) where proliferative (PCNA-positive, Green) and some newly postmitotic cells are located. Examination of TUNEL-positive cells in three dimensions show the absence of PCNA staining. An example of a TUNEL-positive cell is shown (arrowhead) and the arrows point to the X-Z and Y-Z view of that cell. (B, C) High magnification image showing TUNEL+/PCNA- cells (arrowheads). (D) Scattered colocalization plot for TUNEL (red) and PCNA (green) shows a low colocalization factor (Pearson's coefficient  $0.306 \pm 0.04$ ). (E) Manual counting also indicates that most TUNEL-positive cells are not PCNA-positive.

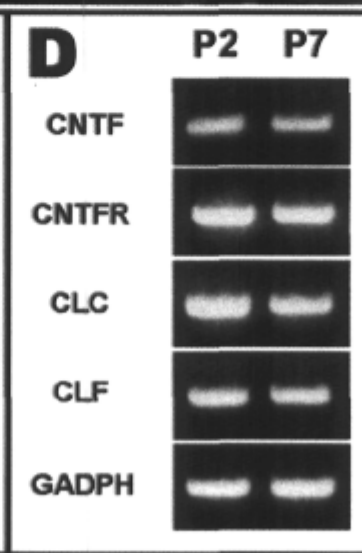
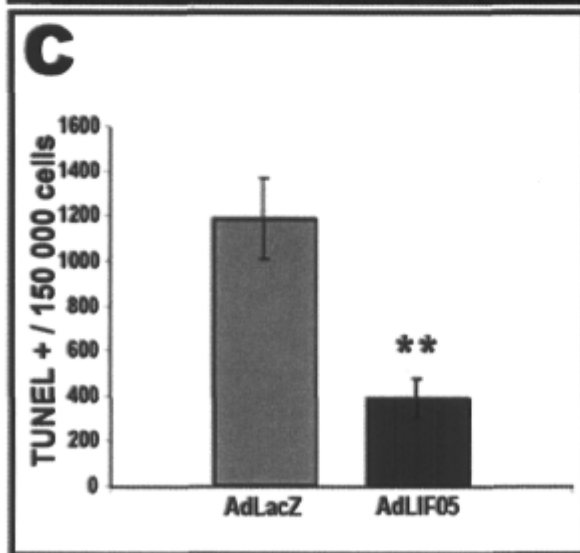
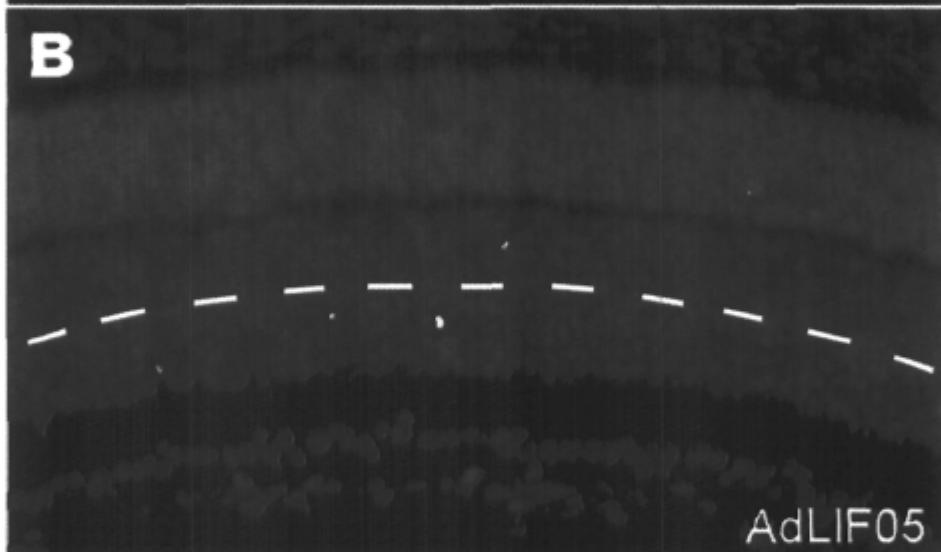
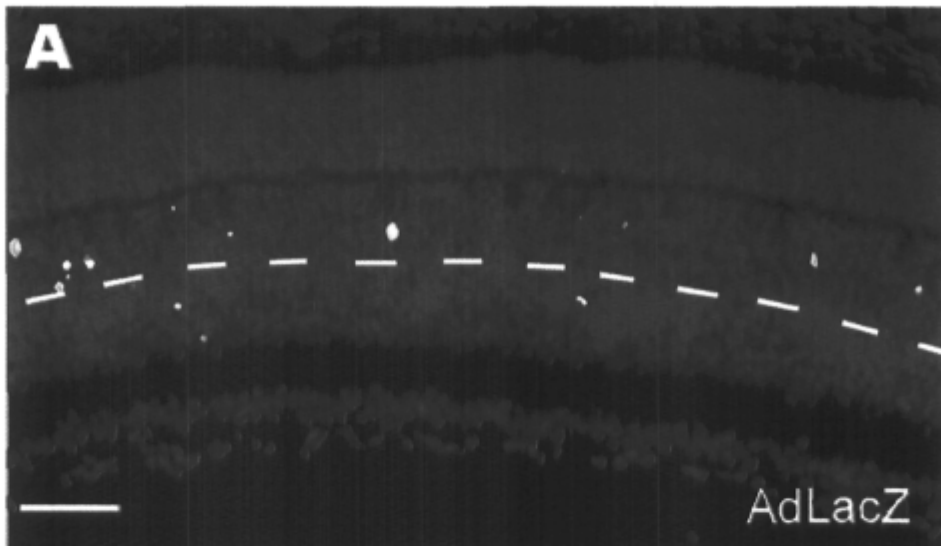




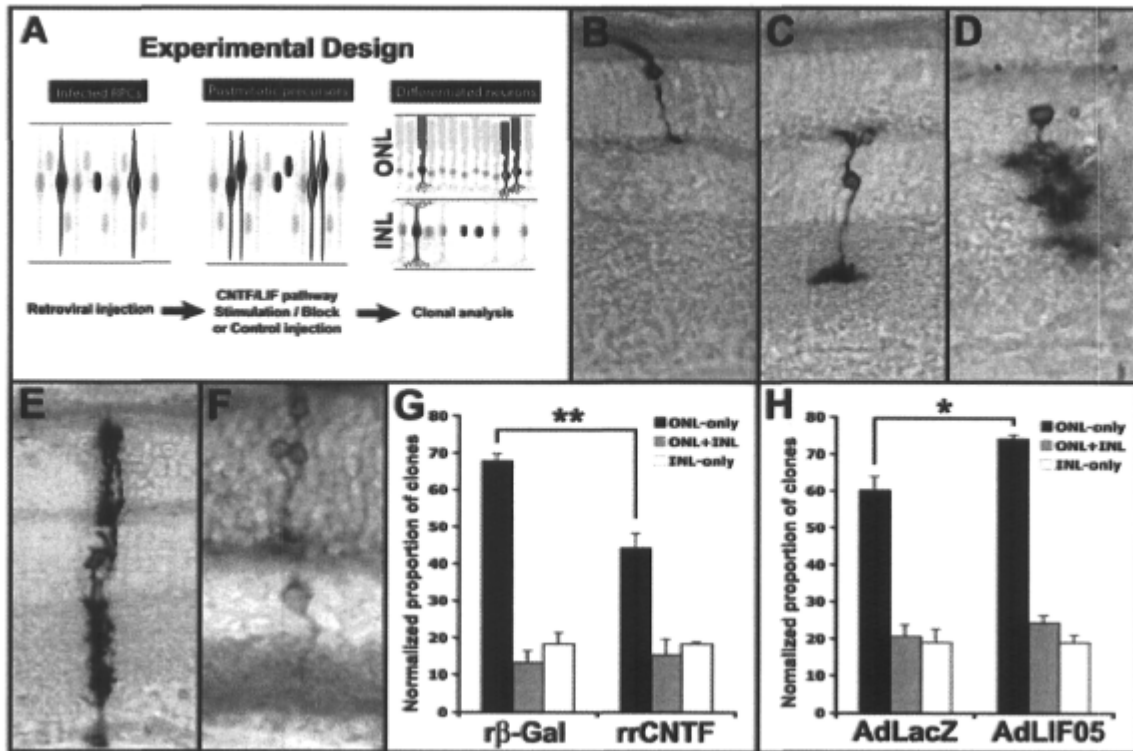
**Figure 5.** CNTF-induced retinal cell death is abolished by prior exposure to the LIF05 dominant-negative ligand. Eyes were injected at P1 with AdLIF05 (A, B and C, D) or AdLacZ (E, F), and 24 hours later injected with 100ng of rrCNTF mixed with red fluorospheres (C, D, and E, F) or left uninjected (A, B). Detection of the fluorospheres confirms the success of the rrCNTF injection. (red in A, C, E). As expected, the injection of AdLIF05 does not increase cell death (A, B). However, prior exposure to AdLIF05 completely abolishes the ability of rrCNTF to induce cell death (C, D). As expected, injection of rrCNTF increases apoptosis in a retina previously exposed to the control AdLacZ vector (E, F). The optic nerve head is shown by an asterisk in A, C, and E, whereas the injection site is shown by an arrow. White boxes indicate blown-up regions shown in B, D, and F.



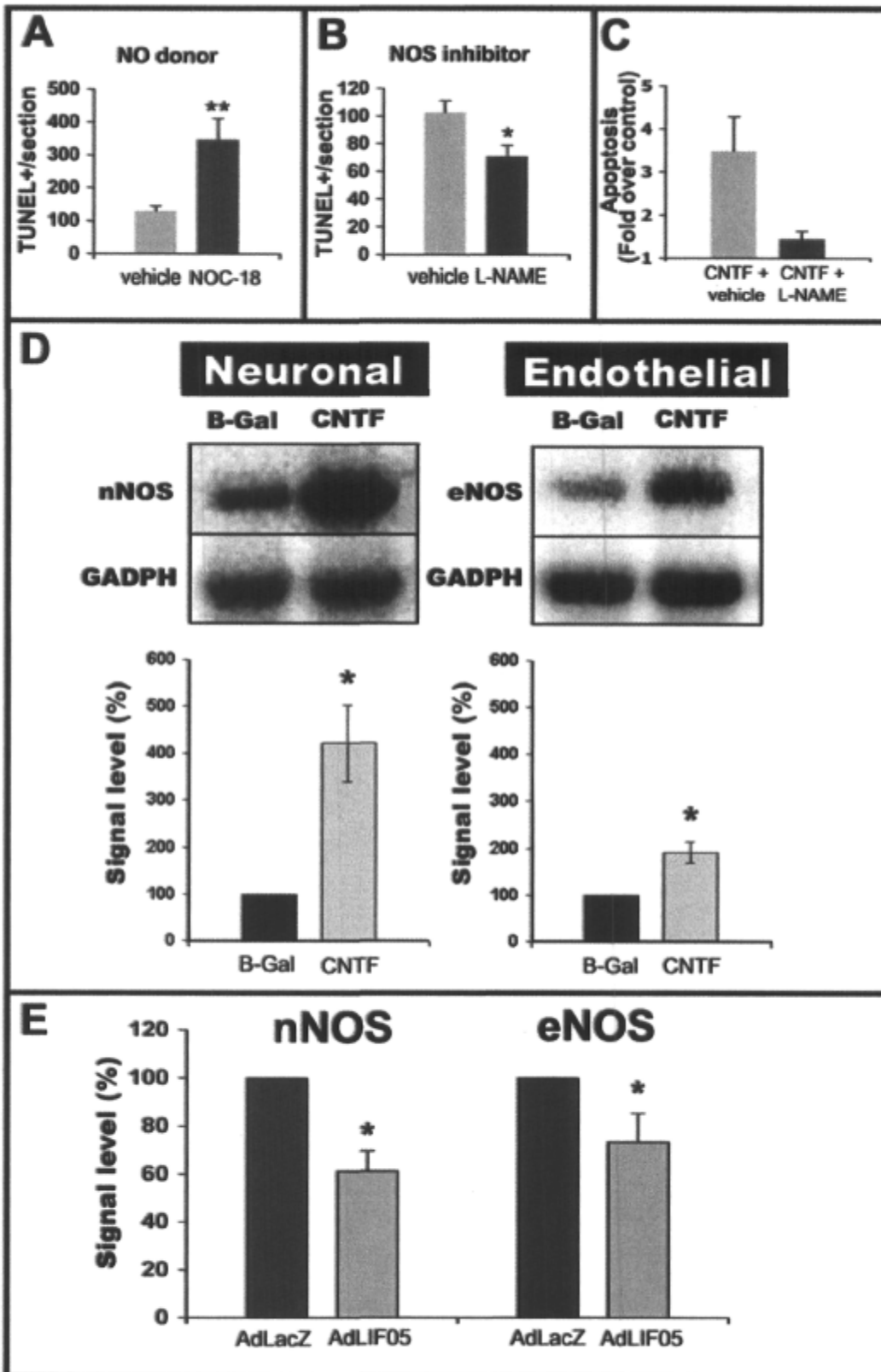
**Figure 6.** Blocking the CNTF/LIF signalling pathway during retinal development *in vivo* reduces naturally occurring programmed cell death. Terminal dUTP Nick End Labelling (TUNEL) on retinal sections from eyes injected at P2 with AdLacZ (A) or AdLIF05 (B) and analyzed at P7. The sections are stained with propidium iodide to reveal the cell nuclei (red). (A) Retinal sections from animals injected with AdLacZ at P2 (or left uninjected; not shown) display apoptotic cells that are mostly located in the outermost part of the INL corresponding to the inner rods region (above the broken white line). (B) In AdLIF05-injected eyes very few apoptotic cells are observed in the outer INL, whereas normal apoptosis is still observed in the inner part of the INL (below the broken white line). (C) Quantification of total retinal cell death at P7 after injection of AdLIF05 or control vector at P2 revealed a more than 60% decrease in the number of apoptotic cells in AdLIF05-injected eyes relative to the controls (\*\*  $p < 0.01$ ). Retinal cell death in uninjected eyes was not significantly different from Ad-Lac-injected eyes (not shown). (D) RT-PCR shows that CNTF, the receptor CTNFR $\alpha$ , as well as the CNTF/LIF signaling pathway ligands cardiotrophin-like cytokine (CLC) and cytokine-like factor (CLF) are expressed in the retina at P2 and P7.



**Figure 7.** The development of photoreceptor-only clones is specifically affected by manipulation of the CNTF/LIF signalling pathway during retinal development *in vivo*. (A) Schematic representation of the experimental design. Retinal progenitors are infected at P1 with a retroviral vector (left panel; colored cells), then 3 days later the eyes are injected with rrCNTF, the dominant-negative LIF05, or with control solutions (middle panel), and at P21 the clones are analyzed (right panel). (B-F) Examples of clones containing a photoreceptor (B), a bipolar cell (C), an amacrine cell (D), a Müller cell (E), or three photoreceptors and a bipolar cell (F). (G, H) Quantification of clone types by retroviral lineage analysis in rrCNTF-injected eyes (G) or AdLIF05-injected eyes (H). Clones were classified as containing only photoreceptors (ONL-only), a mixture of photoreceptors and cells located in the INL (ONL + INL), or only cells located in the INL (INL-only). The proportions of each clone types is normalized against INL-only clones, which do not die (see text), to avoid misrepresentation of proportions caused by dying cells. A significant and specific reduction of the proportion of ONL-only clones is observed in the eyes injected with rrCNTF (F;  $P=0.0022$ ), whereas a significant and specific increase in ONL-only clones is observed in the eyes injected with the AdLIF05 vector (G;  $P=0.0217$ ). Each condition represents clones computed from at least 3 different animals. The number of clones analyzed was: 510 clones for AdLacZ, 993 clones for AdLIF05, 322 clones for r $\beta$ -Gal, 531 clones for rrCNTF.



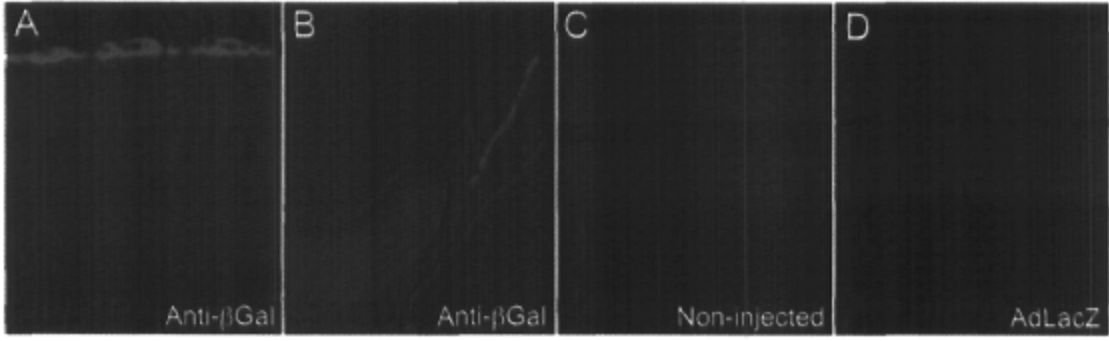
**Figure 8.** CNTF/LIF signaling pathway causes apoptosis by regulating NO production through neuronal (n) and endothelial (e) Nitric Oxide Synthase (NOS) expression. (A) Intravitreal injection of a NO donor (NOC-18) at P2 sharply increase cell death as detected by TUNEL at P3. (B) In contrast, intraperitoneal injections of a NOS inhibitor (L-NAME) at P6 significantly decrease naturally-occurring cell death in the retina. (C) Co-injection of L-NAME and rrCNTF abolishes CNTF-induced cell death. Uninjected eyes were not significantly different from vehicle-injected (not shown). Semi-quantitative analysis of nNOS and eNOS isoforms mRNA levels in P3 (D) and P7 (E) retinas from eyes injected with r $\beta$ -Gal or rrCNTF (D) and AdLacZ or AdLIF05 (E). Signal intensity was analyzed with a phosphoimager, and the relative expression of nNOS and eNOS was normalized against GADPH.





***Supplementary Figure 1***

AdLacZ-infected eyes express  $\beta$ -Gal and do not show tissue loss. (A, B) Anti  $\beta$ -Galactosidase immunohistochemistry shows  $\beta$ -Gal-positive cells (green) in the retinal pigment epithelium (A) and the iris (B) following intravitreal injection of AdLacZ. (C, D) Retinas from AdLacZ-injected eyes (C) do not show any detectable tissue loss compared to non-injected eyes (D).

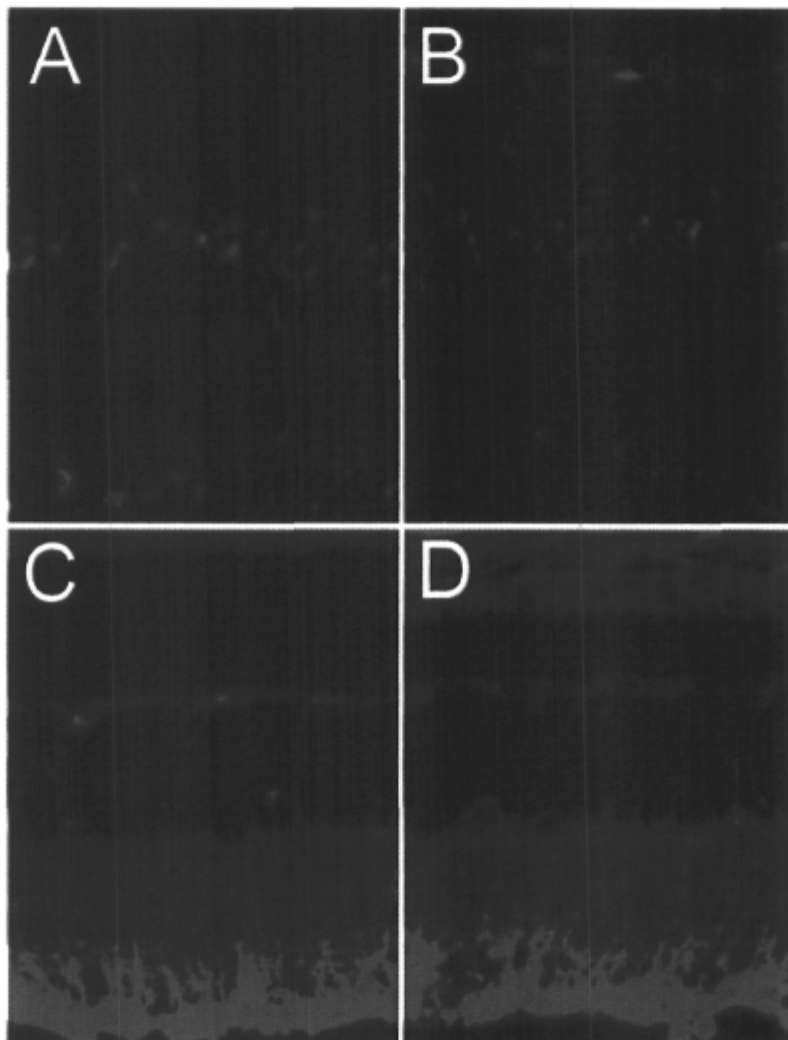


### ***Supplementary Figure 2***

CNTF exposure during retinal development does not increase Müller cell genesis. Retinal sections from eyes injected with AdLacZ (A, C) and AdCNTF (B, D) stained with the molecular markers of Müller cells cyclin-D3 (A, B) and glutamine synthetase (C, D). Similar numbers of Müller cell marker-positive cells are found in both conditions. Nuclei were stained with Hoechst (blue). Staining in the ganglion cell layer in (A) and outer plexiform layer in (C) is due to non-specific binding of secondary antibodies to blood vessels.

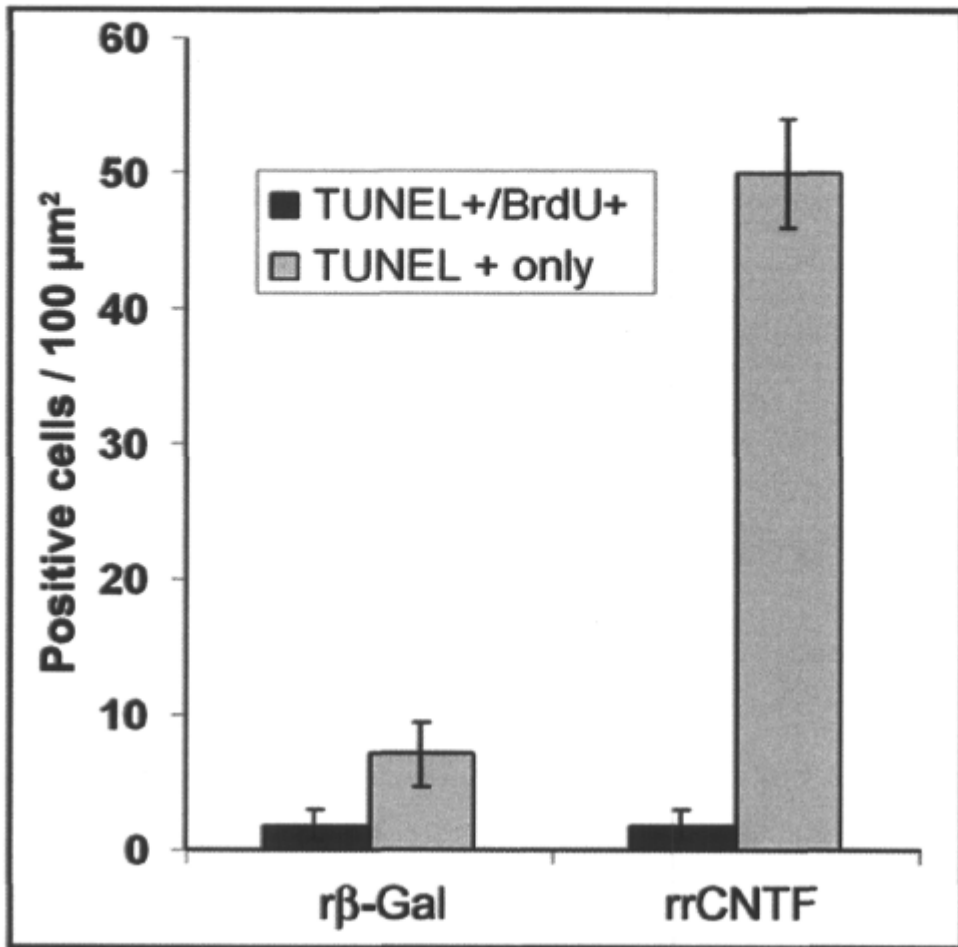
AdLacZ

AdCNTF



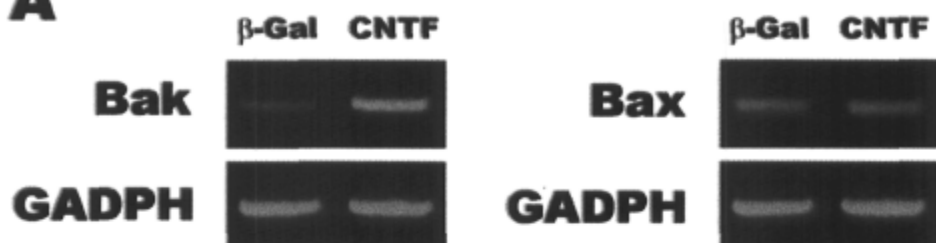
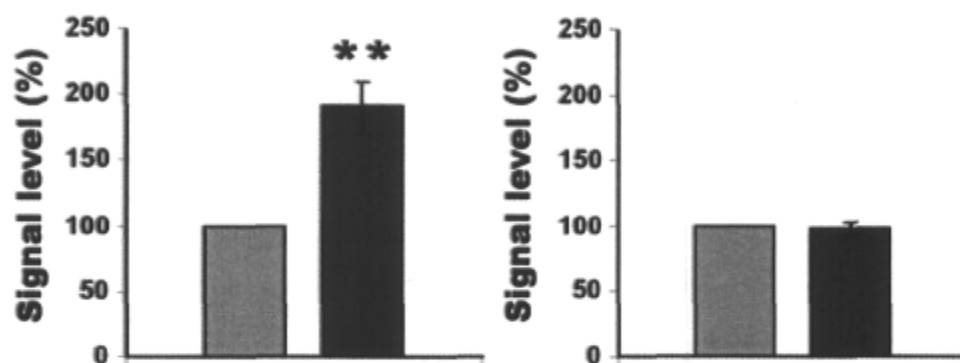
### ***Supplementary Figure 3***

Quantitative analysis of the proportion of TUNEL-positive cells and BrdU-positive cells at P3. Mice received an intraperitoneal injection of BrdU at P2, followed one hour later by an intravitreal injection of r $\beta$ -Galactosidase or rrCNTF. TUNEL and BrdU labelling was done 20 hours later and the number of TUNEL-positive and BrdU-positive cells was counted on retinal sections.



***Supplementary Figure 4***

Semi-quantitative RT-PCR analysis of Bak and Bax mRNA levels in P3 retinas from eyes injected at P2 with r $\beta$ -Gal or rrCNTF (A). The relative expression of Bak, but not Bax, is increased after rrCNTF injection compared to r $\beta$ -Gal-injected eyes (B).

**A****B**



## CHAPITRE 4. DISCUSSION GÉNÉRALE

Dans cette thèse, la contribution des facteurs environnementaux et intrinsèques a été abordé sur divers aspects du développement rétinien. Ces facteurs ont une influence importante sur la prolifération, la spécification cellulaire ainsi que la mort cellulaire. La rétine en développement subit une foule de changements environnementaux principalement dû aux facteurs sécrétés par les cellules nouvellement différenciées. Il a été démontré cependant que la rétine possède un caractère intrinsèque très important contrôlant divers aspect de son développement. Nous avons démontré pour la première fois un mécanisme par lequel les CPRs changeraient au cours du temps de manière à produire la diversité cellulaire. Nous avons montré que la protéine Ikaros confère une compétence temporelle précoce aux CPRs. Cette étude a révélé que la simple réintroduction de cette protéine est suffisante pour redonner une compétence temporelle précoce chez les CPRs tardifs indépendamment du potentiel prolifératif. Ce phénomène est particulièrement intéressant dans le domaine de la médecine régénérative où un des principaux enjeux est de manipuler les cellules souches afin de permettre la production du type cellulaire d'intérêt sans causer une prolifération anormale menant à la formation de tumeurs. Ce type de protéine semble hautement conservé durant l'évolution ce qui dénote son importance dans la production de la diversité cellulaire. Nous avons aussi démontré l'importance des ligands de la voie de signalisation du CNTF/LIF dans la différenciation et l'apoptose développementale des photorécepteurs. Cette étude a révélé des différences avec des expériences du même type faites en culture. Cela suggère donc qu'il faut être prudent dans les interprétations des résultats *in vitro*, surtout à ce qui a trait aux facteurs environnementaux et réitère l'importance d'effectuer en parallèle, lorsque c'est possible, des expériences *in vivo*. L'administration intraoculaire de CNTF comme stratégie thérapeutique a été proposé comme prometteuse dans le traitement des dégénérescences rétinienne. Cependant, nos résultats suggèrent qu'il faut être prudent en ce qui a trait au moment de l'administration. En effet, l'application de CNTF a un effet neuroprotecteur chez les photorécepteurs différenciés mais peut cependant avoir un effet pro-apoptotique lorsqu'administré au cours du développement.

## **Partie 1 :**

Dans la première partie de cette thèse, j'ai démontré le rôle du facteur de transcription Ikaros dans la compétence temporelle précoce des CPRs. L'étude des souris dont le gène *ikaros* a été inactivé a révélé qu'elles génèrent moins de cellules produites tôt au cours du développement sans toutefois affecter la production des cellules produites tardivement. De plus, lorsque Ikaros est réintroduit chez les CPRs tardifs il s'avère suffisant pour leur redonner la compétence à générer des cellules précoces. L'ensemble de ces résultats suggère donc un modèle dans lequel l'expression d'Ikaros est à la fois nécessaire et suffisante pour conférer une compétence temporelle précoce aux CPRs.

### *Expression temporelle d'Ikaros*

L'analyse de l'expression d'Ikaros au cours du temps a révélé qu'il est exprimé dans la majorité des CPRs précoces et plus tard devient restreint aux cellules différenciées précoces et n'est finalement plus exprimé chez les CPRs tardifs. L'analyse de l'ARNm s'est avérée quelque peu différente. En effet, il semble que l'ARNm ne soit pas présent chez les cellules différenciées (Amacrine, Horizontales et RGCs) contrairement à la protéine qui est présente dans ces cellules jusqu'à la maturation finale de la rétine (P12). De plus, il y a présence de l'ARNm chez les photorécepteurs au cours de la maturation de la rétine tandis que la protéine y est absente. La divergence entre l'ARNm et la protéine reste difficile à expliquer. Plusieurs hypothèses demeurent envisageables. Il est possible que la protéine soit très stable au sein des cellules différenciées et demeure présente mais n'est plus produite à partir de l'ARNm. En effet, comme Ikaros se lie à des complexes plutôt imposants contrôlant le remodelage de la chromatine, il est possible que ces complexes augmentent le degré de stabilité de la protéine. Nous avons d'ailleurs observé qu'à partir de la maturation de la rétine jusqu'à la vie adulte, l'expression d'Ikaros semble diminuer chez les cellules différenciées, possiblement dû à une dégradation progressive de la protéine. Un autre facteur important est la séquence de la sonde utilisée. Dans cette étude nous avons utilisé la séquence codante complète du gène. Il est possible que cette sonde ne reconnaisse pas les isoformes plus courtes produites par épissage alternatif de l'ARNm. Cela pourrait d'ailleurs

constituer un mécanisme par lequel la protéine pourrait jouer un rôle différent au sein des cellules différenciées. Une meilleure caractérisation de l'expression de chacune des isoformes pourrait être réalisée en utilisant différentes sondes spécifiques à chacune des isoformes. Pour ce qui est de la présence de l'ARNm au sein des photorécepteurs chez l'adulte, il est possible que des modifications post-transcriptionnelles au niveau de la région 3' non-codante de l'ARNm rendent la traduction impossible. Ce phénomène a d'ailleurs été observé dans la rétine et joue un rôle dans la spécification cellulaire (Decembrini et al., 2006). Il se pourrait aussi qu'une isoforme agissant comme dominant négatif soit exprimée par les photorécepteurs mais non reconnue par les anticorps disponibles. Une meilleure caractérisation des isoformes ainsi que l'inactivation conditionnelle chez les cellules différenciées pourrait permettre une meilleure caractérisation du rôle d'Ikaros chez l'adulte.

### ***Mutants Ikaros et compensation potentielle***

L'étude des mutants pour le gène Ikaros nous a révélé une diminution de la production des cellules Amacrines, Horizontales et RGCs qui ont toute la caractéristique commune d'être produites tôt au cours du développement. Cela suggère qu' Ikaros puisse contrôler la compétence temporelle des CPRs en agissant en amont de gènes nécessaires à la spécification de ces types cellulaires. Chez ces mutants environ 70% de ces cellules sont tout de même produites normalement soulevant la possibilité d'une compensation potentielle par les autres membres de la famille d'Ikaros. L'hybridation *in situ* à partir de sondes spécifiques a révélé que Pegasus, Eos et Helios sont aussi exprimés durant le développement embryonnaire. L'analyse de la souris hétérozygote IK DN/+ a d'ailleurs démontré un phénotype légèrement plus prononcé que la souris IK -/-, sans toutefois abolir la production des cellules précoces. Il a été démontré que la protéine IK DN est capable d'interférer avec les fonctions de Helios et Aiolos (Winandy et al., 1995), cependant cette interférence n'a jamais été démontré pour les autres membres. Il est donc possible que cette compensation puisse s'effectuer via Eos ou Pegasus aussi présents au cours du développement embryonnaire. Il serait particulièrement intéressant d'étudier la souris mutante IK Plastic (Plstc) ayant une mutation ponctuelle dans le site de liaison à l'ADN et agissant aussi comme dominant négatif. Comparativement à la protéine IK DN dont tout le domaine de liaison a été délété, la protéine IK Plstc est beaucoup plus stable et efficace dans ses

interactions avec les autres isoformes ou les autres membres (Papathanasiou et al., 2003). Ces souris ont un phénotype encore plus prononcé que les souris IK DN et la mutation est létale au jour embryonnaire 16.

### ***Expression ectopique d'Ikaros***

Les expériences de gain de fonction ont montré que l'expression d'Ikaros est suffisante pour redonner une compétence précoce au CPRs tardifs. En effet, suite à l'expression ectopique d'Ikaros *in vivo* chez les CPRs postnataux, nous avons observé la production de cellules Horizontales qui ne sont jamais générées après la naissance, de même qu'une augmentation substantielle de la production de cellules amacrines dont seulement une mince proportion est normalement générée, et ce, sans affecter le nombre de division des CPRs. Pour ce qui est des RGCs, nous avons démontré *in vitro* qu'en diminuant l'influence des cellules environnantes il est possible d'en induire la production en redonnant la compétence aux CPRs.

### ***Mécanisme de régulation de compétence médié par Ikaros***

Le mécanisme par lequel Ikaros pourrait contrôler la compétence temporelle reste encore inconnu. Dans le système hématopoïétique, il s'avère principalement jouer un rôle de répresseur de l'activité génique. Il a été démontré capable de s'associer avec le complexe des histones déacétylase (HDAC) régulant ainsi la conformation de la chromatine (Koipally et al., 1999). Cependant il pourrait aussi agir aussi comme un potentiateur de l'expression génique en recrutant des complexes de remodelage de la chromatine (Swi/Snf) (Harker et al., 2002; Koipally et al., 2002). Dans la rétine, il pourrait donc réprimer l'expression de gènes induisant la spécification des cellules tardives ou encore potentialiser l'expression de gènes importants dans la spécification des cellules précoces. Un rôle d'activateur s'avère plausible puisque nous avons observé que chez les souris IK *-/-*, les niveaux d'expression des gènes importants dans la spécification des cellules précoces sont réduits significativement. Cependant, afin de confirmer une telle affirmation, des essais fonctionnels s'avèrent nécessaires afin de déterminer si Ikaros peut agir spécifiquement sur l'expression de ces gènes.

### ***Modèle général***

Basé sur ces résultats, nous proposons un modèle où chez les clones multipotents, les CPRs expriment Ikaros dès le tout début du développement de manière à générer les cellules précoces. Plus tard les CPRs vont arrêter d'exprimer Ikaros au moment de la production des cellules tardives par un mécanisme toujours inconnu. Ce modèle pourrait être validé en créant une souris dont un gène rapporteur est inséré à la place du gène Ikaros (e.g.  $\beta$ -Gal Knock In). Ainsi, il serait possible d'en isoler les progéniteurs Ikaros positifs et d'en suivre le développement en microscopie en temps réel tout en les comparant aux progéniteurs Ikaros négatifs. De plus, il serait possible d'étudier l'expression génique de ces 2 populations par microarrays et ainsi obtenir des informations importantes sur les facteurs de différenciation spécifiant la production de cellules précoces vs tardives. Ces données pourraient aussi permettre d'identifier d'autres facteurs de compétence importants pour la production de cellules tardives. En effet, les autres protéines importantes pour l'identité temporelle tardive des neuroblastes chez la Drosophile ont des orthologues chez les mammifères. Particulièrement le gène Castor, le dernier des facteurs exprimés chez les neuroblastes, est aussi exprimé dans la rétine de façon complémentaire à Ikaros lui suggérant un rôle potentiel dans la compétence temporelle tardive des CPRs (Blackshaw et al., 2004).

### ***Perspectives d'avenir***

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés principalement au rôle d'Ikaros dans le développement rétinien. Cependant, des données préliminaires nous ont révélé qu'il est aussi exprimé dans d'autres régions de neurogénèse, ce qui lui suggère un rôle dans d'autres parties du système nerveux. Cette découverte ouvre la porte à un mécanisme général de compétence temporelle pour les progéniteurs neuronaux. De plus, dans les stratégies thérapeutiques utilisant les cellules souches, un tel mécanisme pourrait être utilisé. La simple réintroduction d'un gène de compétence pourrait augmenter le potentiel de différenciation des cellules souches sans toutefois influencer leur potentiel prolifératif.

## Partie 2 :

Dans la deuxième partie de cette thèse, je me suis intéressé au rôle de la voie de signalisation du CNTF/LIF durant le développement postnatal de la rétine de souris. Contrairement aux études précédentes lui démontrant un rôle neuroprotecteur au sein de la rétine adulte, cette étude a démontré que chez la rétine immature cette voie contrôle spécifiquement l'apoptose des précurseurs postmitotiques des photorécepteurs bâtonnets en plus de contrôler leur différenciation.

### *Contrôle de la différenciation cellulaire*

Des études précédentes ont démontré chez le rongeur que la stimulation de la voie du CNTF/LIF en culture cause une diminution spécifique du nombre de cellules exprimant la rhodopsine (Ezzeddine et al., 1997; Neophytou et al., 1997; Ozawa et al., 2004). Certains ont aussi rapporté que cette diminution est accompagnée par une augmentation de cellules exprimant des marqueurs de cellules bipolaires et cellules de Müller suggérant un rôle à cette voie de signalisation dans la spécification cellulaire (Ezzeddine et al., 1997; Goureau et al., 2004; Schulz-Key et al., 2002).

Notre étude du rôle de la voie du CNTF/LIF *in vivo* a révélé de façon similaire qu'elle contrôle la différenciation des photorécepteurs en bloquant l'expression de la rhodopsine. Cependant, suite à la stimulation de cette voie, aucune augmentation significative des cellules bipolaires et Müllers n'a été observée. Ce qui suggère que cet effet n'est observé qu'*in vitro* et n'a pas lieu en condition *in vivo*. Il a d'ailleurs été rapporté qu'à haute concentration, la stimulation au CNTF peut induire l'expression aberrante de marqueurs de cellules bipolaires chez certains photorécepteurs ce qui pourrait expliquer les résultats précédents. Pour ce qui est des cellules de Müller, nous avons observé une augmentation de l'expression de la Glial fibrillary acidic protein (GFAP) sans toutefois observer une augmentation de leur nombre.

### ***Apoptose développementale des photorécepteurs***

Dans cette étude nous avons démontré que l'augmentation de la concentration de CNTF dans la rétine postnatale cause une apoptose spécifique dose-dépendante des précurseurs postmitotiques des photorécepteurs bâtonnets. Malgré que le CNTF soit mieux connu pour son rôle anti-apoptotique dans la rétine adulte, une étude a déjà démontré qu'il peut causer l'apoptose des neurones sympathiques de manière dose-dépendante (Kessler et al., 1993). Nous avons démontré que cette voie est active au cours du développement postnatal rétinien et participe à l'apoptose développementale des photorécepteurs. En stimulant ou en bloquant la signalisation via le complexe du récepteur de CTNF, nous avons démontré que cette voie induit spécifiquement la mort cellulaire des photorécepteurs générés à partir de clones contenant uniquement des photorécepteurs sans affecter les clones mixtes contenant un ou des photorécepteurs ainsi qu'un autre type cellulaire. Il apparaît donc que les photorécepteurs issus de ces différents types de progéniteurs répondent différemment à la stimulation au CNTF suggérant qu'ils sont intrinsèquement différents, ce qui n'avait jamais été démontré auparavant.

### ***Mécanismes de la mort cellulaire induite par CNTF***

Étonnamment, l'effet pro-apoptotique n'a jamais été observé dans les cultures d'explants de rétines ou en culture dissociées. La disparité avec les expériences *in vitro* nous a aidé dans la recherche de mécanismes pouvant médier cet apoptose. Premièrement, cela suggérait que l'effet soit indirect et passe via un autre type cellulaire possiblement les RGCs, qui dégénèrent en explant suite à l'axotomie, éliminant ainsi tout effet indirect via celles-ci. De plus, on sait qu'elles expriment le CNTFR $\alpha$  (Kirsch et al., 1997) et peuvent répondre à la stimulation au CNTF (Meyer-Franke et al., 1995).

Cherchant un candidat médiateur des effets de CNTF qui soit et labile *in vitro* et capable de médier l'apoptose des photorécepteurs, notre attention s'est portée sur le gaz oxyde nitrique (NO), une étude ayant précédemment démontré que les photorécepteurs sont sensibles à ce

gaz (Donovan et al., 2001). Nous avons démontré que l'apoptose induite par CNTF se produit effectivement suite à la production de NO. Cette augmentation de la production de NO se fait via l'augmentation de l'expression des enzymes de synthèse du NO (NOS), et plus spécifiquement les isoformes endothéliale (eNOS) et neuronale (nNOS). Le préblocage de la production de NO par un inhibiteur des NOS (L-NAME) abolie complètement l'apoptose induite par CNTF. De plus, l'injection intrapéritonéale de cet inhibiteur des NOS réduit significativement l'apoptose développementale des photorécepteurs. L'ensemble de ces expériences démontrent encore une fois que cette voie de signalisation joue un rôle majeur dans l'apoptose des photorécepteurs.

Il serait intéressant de déterminer dans quelles cellules l'augmentation de l'expression des NOS s'effectue. Vraisemblablement, il se pourrait que ce soit via les RGCs car une étude à démontré qu'elles expriment les isoformes eNOS et nNOS. Elles seraient donc capable d'induire la production de NO suite à l'augmentation de l'expression des NOS (Tsumamoto et al., 2002). Cela expliquerait les différences observées entre les expériences en culture et celles faites *in vivo*.

Quant aux mécanismes intracellulaires menant à l'apoptose développementale des photorécepteurs, il semblerait que les deux facteurs pro-apoptiques Bax et Bak seraient impliqués. En effet, la double inactivation de ces deux gènes bloque totalement l'apoptose développementale au jour postnatal 7 (Hahn et al., 2003). Par contre l'inactivation de Bax ou de Bak n'affecte pas l'apoptose développementale des photorécepteurs. Chez les souris Bak *-/-* l'apoptose n'est nullement affectée tandis que chez les souris Bax *-/-* seulement l'apoptose des autres types cellulaires est affectée (Mosinger Ogilvie et al., 1998). Cela suggère qu'ils sont tous deux requis. Nos analyses semi-quantitatives en RT-PCR ont révélé que la stimulation au CNTF induit spécifiquement l'augmentation de l'expression de Bak sans toutefois affecter l'expression de Bax. Cela suggère donc que la voie de signalisation du CNTF/LIF contrôle spécifiquement l'expression de Bak ce qui expliquerait pourquoi le blocage de la signalisation via le complexe réduit précisément l'apoptose développementale des photorécepteurs sans affecter celle des autres types cellulaires. Il serait intéressant de déterminer si l'apoptose induite suite à la stimulation au CNTF est complètement abolie chez les souris Bak *-/-*. Si oui, cela confirmerait ainsi notre hypothèse.



### *Ligands potentiels*

Il apparaît évident que les effets médiés par la voie de signalisation du CNTF/LIF passent par un autre ligand que le CNTF puisque celui-ci ne possède pas de séquence signal lui permettant d'être sécréter. Un candidat potentiel pourrait être le LIF (Neophytou et al., 1997) ou encore une nouvelle protéine récemment découverte nommée neuropoïetine (NP) (Derouet et al., 2004) qui utilisent tous deux la même voie de signalisation que le CNTF et sont aussi exprimés dans la rétine postnatale. D'autres ligands possibles pourraient être le CLC et le CLF démontré comme étant capable de s'associer afin d'induire la signalisation via le complexe du récepteur au CNTF (Elson et al., 2000; Lelievre et al., 2001; Plun-Favreau et al., 2001). Nous avons observé que l'injection conjointe de CLC et CLF reproduit exactement les effets observés avec le CNTF. Il serait d'ailleurs intéressant d'investiguer le phénotype des souris CLC mutantes qui meurent 24 heures après la naissance et qui n'ont encore jamais été investiguées au niveau de la rétine (Alexander et al., 1999). Finalement, il se peut qu'un ou plusieurs de ces ligands soient actifs au cours du développement et soient responsables des effets observés au niveau des photorécepteurs. Des études plus poussées pourraient permettre de déterminer exactement les facteurs impliqués.

### *Perspectives d'avenir*

Notre étude a permis de mieux comprendre les mécanismes contrôlant l'apoptose développementale des photorécepteurs. Ces informations seront sans doute utiles pour une meilleure compréhension des dégénérescences rétiniennes affectant les photorécepteurs. De plus, la relation entre la stimulation au CNTF et la production de NO est nouvelle et pourrait potentiellement participer à l'effet neuroprotecteur du CNTF dans la rétine mature ainsi que dans d'autres systèmes. Cependant, une investigation plus poussée des mécanismes neuroprotecteurs sous-jacents s'avèrerait nécessaire.

## RÉFÉRENCES

- Agoston, D. V., Szemes, M., Dobi, A., Palkovits, M., Georgopoulos, K., Gyorgy, A., and Ring, M. A. (2007). Ikaros is expressed in developing striatal neurons and involved in enkephalinergic differentiation. *J Neurochem*.
- Aktan, F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 75, 639-653.
- Alexander, W. S., Rakar, S., Robb, L., Farley, A., Willson, T. A., Zhang, J. G., Hartley, L., Kikuchi, Y., Kojima, T., Nomura, H., *et al.* (1999). Suckling defect in mice lacking the soluble haemopoietin receptor NR6. *Curr Biol* 9, 605-608.
- Alexiades, M. R., and Cepko, C. (1996). Quantitative analysis of proliferation and cell cycle length during development of the rat retina. *Dev Dyn* 205, 293-307.
- Allsopp, T. (1993). Life and death in the nervous system. *Trends Neurosci* 16, 1-3.
- Bae, S., Bessho, Y., Hojo, M., and Kageyama, R. (2000). The bHLH gene Hes6, an inhibitor of Hes1, promotes neuronal differentiation. *Development* 127, 2933-2943.
- Barde, Y. A. (1989). Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* 2, 1525-1534.
- Barnstable, C. J. (1980). Monoclonal antibodies which recognize different cell types in the rat retina. *Nature* 286, 231-235.
- Barres, B. A., Hart, I. K., Coles, H. S., Burne, J. F., Voyvodic, J. T., Richardson, W. D., and Raff, M. C. (1992). Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 70, 31-46.
- Bartoe, J. L., and Nathanson, N. M. (2002). Independent roles of SOCS-3 and SHP-2 in the regulation of neuronal gene expression by leukemia inhibitory factor. *Brain Res Mol Brain Res* 107, 108-119.
- Bazan, J. F. (1991). Neuropoietic cytokines in the hematopoietic fold. *Neuron* 7, 197-208.
- Belliveau, M. J., Young, T. L., and Cepko, C. L. (2000). Late retinal progenitor cells show intrinsic limitations in the production of cell types and the kinetics of opsin synthesis. *J Neurosci* 20, 2247-2254.
- Beltran, W. A., Rohrer, H., and Aguirre, G. D. (2005). Immunolocalization of ciliary neurotrophic factor receptor alpha (CNTFRalpha) in mammalian photoreceptor cells. *Mol Vis* 11, 232-244.

- Bhattacharya, S., Dooley, C., Soto, F., Madson, J., Das, A. V., and Ahmad, I. (2004). Involvement of Ath3 in CNTF-mediated differentiation of the late retinal progenitors. *Mol Cell Neurosci* 27, 32-43.
- Blackshaw, S., Harpavat, S., Trimarchi, J., Cai, L., Huang, H., Kuo, W. P., Weber, G., Lee, K., Fraioli, R. E., Cho, S. H., *et al.* (2004). Genomic analysis of mouse retinal development. *PLoS Biol* 2, E247.
- Bonni, A., Frank, D. A., Schindler, C., and Greenberg, M. E. (1993). Characterization of a pathway for ciliary neurotrophic factor signaling to the nucleus. *Science* 262, 1575-1579.
- Boulton, T. G., Zhong, Z., Wen, Z., Darnell, J. E., Jr., Stahl, N., and Yancopoulos, G. D. (1995). STAT3 activation by cytokines utilizing gp130 and related transducers involves a secondary modification requiring an H7-sensitive kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6915-6919.
- Brody, T., and Odenwald, W. F. (2000). Programmed transformations in neuroblast gene expression during *Drosophila* CNS lineage development. *Dev Biol* 226, 34-44.
- Brown, K. E., Baxter, J., Graf, D., Merkschlager, M., and Fisher, A. G. (1999). Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. *Mol Cell* 3, 207-217.
- Brown, K. E., Guest, S. S., Smale, S. T., Hahm, K., Merkschlager, M., and Fisher, A. G. (1997). Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell* 91, 845-854.
- Brown, N. L., Kanekar, S., Vetter, M. L., Tucker, P. K., Gemza, D. L., and Glaser, T. (1998). Math5 encodes a murine basic helix-loop-helix transcription factor expressed during early stages of retinal neurogenesis. *Development* 125, 4821-4833.
- Burmeister, M., Novak, J., Liang, M. Y., Basu, S., Ploder, L., Hawes, N. L., Vidgen, D., Hoover, F., Goldman, D., Kalnins, V. I., *et al.* (1996). Ocular retardation mouse caused by Chx10 homeobox null allele: impaired retinal progenitor proliferation and bipolar cell differentiation. *Nat Genet* 12, 376-384.
- Cajal, S R. (1892) *The Structure of the Retina*. Translated by S.A. Thorpe and M. Glickstein Springfield, Il., Thomas, 1972
- Cayouette, M., Barres, B. A., and Raff, M. (2003). Importance of intrinsic mechanisms in cell fate decisions in the developing rat retina. *Neuron* 40, 897-904.
- Cayouette, M., Behn, D., Sendtner, M., Lachapelle, P., and Gravel, C. (1998). Intraocular gene transfer of ciliary neurotrophic factor prevents death and increases responsiveness of rod photoreceptors in the retinal degeneration slow mouse. *J Neurosci* 18, 9282-9293.

- Cayouette, M., and Gravel, C. (1997). Adenovirus-mediated gene transfer of ciliary neurotrophic factor can prevent photoreceptor degeneration in the retinal degeneration (rd) mouse. *Hum Gene Ther* 8, 423-430.
- Cayouette, M., Poggi, L., and Harris, W. A. (2006). Lineage in the vertebrate retina. *Trends Neurosci*.
- Cayouette, M., Whitmore, A. V., Jeffery, G., and Raff, M. (2001). Asymmetric segregation of Numb in retinal development and the influence of the pigmented epithelium. *J Neurosci* 21, 5643-5651.
- Cepko, C. L. (1999). The roles of intrinsic and extrinsic cues and bHLH genes in the determination of retinal cell fates. *Curr Opin Neurobiol* 9, 37-46.
- Cepko, C. L., Austin, C. P., Yang, X., Alexiades, M., and Ezzeddine, D. (1996). Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 589-595.
- Chen, J., Flannery, J. G., LaVail, M. M., Steinberg, R. H., Xu, J., and Simon, M. I. (1996). bcl-2 overexpression reduces apoptotic photoreceptor cell death in three different retinal degenerations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7042-7047.
- Chen, J., Rattner, A., and Nathans, J. (2005). The rod photoreceptor-specific nuclear receptor Nr2e3 represses transcription of multiple cone-specific genes. *J Neurosci* 25, 118-129.
- Chen, S., Wang, Q. L., Nie, Z., Sun, H., Lennon, G., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., and Zack, D. J. (1997). Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron* 19, 1017-1030.
- Christopherson, I., Piechoki, M., Liu, G., Ratner, S., and Galy, A. (2001). Regulation of L-selectin expression by a dominant negative Ikaros protein. *J Leukoc Biol* 69, 675-683.
- Cobb, B. S., Morales-Alcelay, S., Kleiger, G., Brown, K. E., Fisher, A. G., and Smale, S. T. (2000). Targeting of Ikaros to pericentromeric heterochromatin by direct DNA binding. *Genes Dev* 14, 2146-2160.
- Cobb, B. S., and Smale, S. T. (2005). Ikaros-family proteins: in search of molecular functions during lymphocyte development. *Curr Top Microbiol Immunol* 290, 29-47.
- Cortes, M., Wong, E., Koipally, J., and Georgopoulos, K. (1999). Control of lymphocyte development by the Ikaros gene family. *Curr Opin Immunol* 11, 167-171.
- Dakubo, G. D., and Wallace, V. A. (2004). Hedgehogs and retinal ganglion cells: organizers of the mammalian retina. *Neuroreport* 15, 479-482.
- Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M., and Stark, G. R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415-1421.

- Davis, S., Aldrich, T. H., Stahl, N., Pan, L., Taga, T., Kishimoto, T., Ip, N. Y., and Yancopoulos, G. D. (1993). LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science* 260, 1805-1808.
- Decembrini, S., Andreazzoli, M., Vignali, R., Barsacchi, G., and Cremisi, F. (2006). Timing the generation of distinct retinal cells by homeobox proteins. *PLoS Biol* 4, e272.
- DeChiara, T. M., Vejsada, R., Poueymirou, W. T., Acheson, A., Suri, C., Conover, J. C., Friedman, B., McClain, J., Pan, L., Stahl, N., and et al. (1995). Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell* 83, 313-322.
- Dell'Albani, P., Santangelo, R., Torrisi, L., Nicoletti, V. G., and Giuffrida Stella, A. M. (2003). Role of the JAK/STAT signal transduction pathway in the regulation of gene expression in CNS. *Neurochem Res* 28, 53-64.
- Derouet, D., Rousseau, F., Alfonsi, F., Froger, J., Hermann, J., Barbier, F., Perret, D., Diveu, C., Guillet, C., Preisser, L., et al. (2004). Neuropoietin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4827-4832.
- Ding, J., Hu, B., Tang, L. S., and Yip, H. K. (2001). Study of the role of the low-affinity neurotrophin receptor p75 in naturally occurring cell death during development of the rat retina. *Dev Neurosci* 23, 390-398.
- Donovan, M., Carmody, R. J., and Cotter, T. G. (2001). Light-induced photoreceptor apoptosis in vivo requires neuronal nitric-oxide synthase and guanylate cyclase activity and is caspase-3-independent. *J Biol Chem* 276, 23000-23008.
- Dumortier, A., Jeannet, R., Kirstetter, P., Kleinmann, E., Sellars, M., dos Santos, N. R., Thibault, C., Barths, J., Ghysdael, J., Punt, J. A., et al. (2006). Notch activation is an early and critical event during T-Cell leukemogenesis in Ikaros-deficient mice. *Mol Cell Biol* 26, 209-220.
- Durand, B., Fero, M. L., Roberts, J. M., and Raff, M. C. (1998). p27Kip1 alters the response of cells to mitogen and is part of a cell-intrinsic timer that arrests the cell cycle and initiates differentiation. *Curr Biol* 8, 431-440.
- Durand, B., and Raff, M. (2000). A cell-intrinsic timer that operates during oligodendrocyte development. *Bioessays* 22, 64-71.
- Dyer, M. A., and Cepko, C. L. (2000). p57(Kip2) regulates progenitor cell proliferation and amacrine interneuron development in the mouse retina. *Development* 127, 3593-3605.
- Dyer, M. A., and Cepko, C. L. (2001a). p27Kip1 and p57Kip2 regulate proliferation in distinct retinal progenitor cell populations. *J Neurosci* 21, 4259-4271.
- Dyer, M. A., and Cepko, C. L. (2001b). The p57(Kip2) cyclin kinase inhibitor is expressed by a restricted set of amacrine cells in the rodent retina. *J Comp Neurol* 429, 601-614.

Dyer, M. A., Livesey, F. J., Cepko, C. L., and Oliver, G. (2003). Prox1 function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina. *Nat Genet* 34, 53-58.

Elson, G. C., Lelievre, E., Guillet, C., Chevalier, S., Plun-Favreau, H., Froger, J., Suard, I., de Coignac, A. B., Delneste, Y., Bonnefoy, J. Y., *et al.* (2000). CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci* 3, 867-872.

ERPI, C., Être humain: Origines, anatomie, psychologie et culture. Édition du Renouveau pédagogique ed. 2005. Canada.

Ezzat, S., Mader, R., Fischer, S., Yu, S., Ackerley, C., and Asa, S. L. (2006). An essential role for the hematopoietic transcription factor Ikaros in hypothalamic-pituitary-mediated somatic growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2214-2219.

Ezzeddine, Z. D., Yang, X., DeChiara, T., Yancopoulos, G., and Cepko, C. L. (1997). Postmitotic cells fated to become rod photoreceptors can be respecified by CNTF treatment of the retina. *Development* 124, 1055-1067.

Frade, J. M., and Barde, Y. A. (1999). Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord. *Development* 126, 683-690.

Frade, J. M., Rodriguez-Tebar, A., and Barde, Y. A. (1996). Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 383, 166-168.

Fujitani, Y., Fujitani, S., Luo, H., Qiu, F., Burlison, J., Long, Q., Kawaguchi, Y., Edlund, H., MacDonald, R. J., Furukawa, T., *et al.* (2006). Ptf1a determines horizontal and amacrine cell fates during mouse retinal development. *Development* 133, 4439-4450.

Furukawa, T., Kozak, C. A., and Cepko, C. L. (1997a). rax, a novel paired-type homeobox gene, shows expression in the anterior neural fold and developing retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3088-3093.

Furukawa, T., Morrow, E. M., and Cepko, C. L. (1997b). Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* 91, 531-541.

Furukawa, T., Mukherjee, S., Bao, Z. Z., Morrow, E. M., and Cepko, C. L. (2000). rax, Hes1, and notch1 promote the formation of Muller glia by postnatal retinal progenitor cells. *Neuron* 26, 383-394.

Gaiano, N., Kohtz, J. D., Turnbull, D. H., and Fishell, G. (1999). A method for rapid gain-of-function studies in the mouse embryonic nervous system. *Nat Neurosci* 2, 812-819.

Gaiano, N., Nye, J. S., and Fishell, G. (2000). Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* 26, 395-404.

- Gao, F. B., and Raff, M. (1997). Cell size control and a cell-intrinsic maturation program in proliferating oligodendrocyte precursor cells. *J Cell Biol* 138, 1367-1377.
- Gearing, D. P., Gough, N. M., King, J. A., Hilton, D. J., Nicola, N. A., Simpson, R. J., Nice, E. C., Kelso, A., and Metcalf, D. (1987). Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *Embo J* 6, 3995-4002.
- Georgopoulos, K. (2002). Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nat Rev Immunol* 2, 162-174.
- Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J. H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., and Sharpe, A. (1994). The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 79, 143-156.
- Georgopoulos, K., Moore, D. D., and Derfler, B. (1992). Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. *Science* 258, 808-812.
- Gibbs, S. M. (2003). Regulation of neuronal proliferation and differentiation by nitric oxide. *Mol Neurobiol* 27, 107-120.
- Gomez-del Arco, P., Koipally, J., and Georgopoulos, K. (2005). Ikaros SUMOylation: switching out of repression. *Mol Cell Biol* 25, 2688-2697.
- Gonzalez-Hoyuela, M., Barbas, J. A., and Rodriguez-Tebar, A. (2001). The autoregulation of retinal ganglion cell number. *Development* 128, 117-124.
- Goureau, O., Regnier-Ricard, F., Desire, L., and Courtois, Y. (1999). Role of nitric oxide in photoreceptor survival in embryonic chick retinal cell culture. *J Neurosci Res* 55, 423-431.
- Goureau, O., Regnier-Ricard, F., Jonet, L., Jeanny, J. C., Courtois, Y., and Chany-Fournier, F. (1997). Developmental expression of nitric oxide synthase isoform I and III in chick retina. *J Neurosci Res* 50, 104-113.
- Goureau, O., Rhee, K. D., and Yang, X. J. (2004). Ciliary neurotrophic factor promotes muller glia differentiation from the postnatal retinal progenitor pool. *Dev Neurosci* 26, 359-370.
- Grosskortenhaus, R., Pearson, B. J., Marusich, A., and Doe, C. Q. (2005). Regulation of temporal identity transitions in *Drosophila* neuroblasts. *Dev Cell* 8, 193-202.
- Grosskortenhaus, R., Robinson, K. J., and Doe, C. Q. (2006). Pdm and Castor specify late-born motor neuron identity in the NB7-1 lineage. *Genes Dev* 20, 2618-2627.
- Hahm, K., Cobb, B. S., McCarty, A. S., Brown, K. E., Klug, C. A., Lee, R., Akashi, K., Weissman, I. L., Fisher, A. G., and Smale, S. T. (1998). Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes Dev* 12, 782-796.

Hahn, K., Ernst, P., Lo, K., Kim, G. S., Turck, C., and Smale, S. T. (1994). The lymphoid transcription factor LyF-1 is encoded by specific, alternatively spliced mRNAs derived from the Ikaros gene. *Mol Cell Biol* *14*, 7111-7123.

Hahn, P., Lindsten, T., Ying, G. S., Bennett, J., Milam, A. H., Thompson, C. B., and Dunaief, J. L. (2003). Proapoptotic bcl-2 family members, Bax and Bak, are essential for developmental photoreceptor apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *44*, 3598-3605.

Hanashima, C., Li, S. C., Shen, L., Lai, E., and Fishell, G. (2004). Foxg1 suppresses early cortical cell fate. *Science* *303*, 56-59.

Harada, C., Harada, T., Nakamura, K., Sakai, Y., Tanaka, K., and Parada, L. F. (2005). Effect of p75(NTR) on the regulation of naturally occurring cell death and retinal ganglion cell number in the mouse eye. *Dev Biol*.

Harada, C., Harada, T., Nakamura, K., Sakai, Y., Tanaka, K., and Parada, L. F. (2006). Effect of p75NTR on the regulation of naturally occurring cell death and retinal ganglion cell number in the mouse eye. *Dev Biol* *290*, 57-65.

Harada, T., Harada, C., Kohsaka, S., Wada, E., Yoshida, K., Ohno, S., Mamada, H., Tanaka, K., Parada, L. F., and Wada, K. (2002). Microglia-Muller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J Neurosci* *22*, 9228-9236.

Harker, N., Naito, T., Cortes, M., Hostert, A., Hirschberg, S., Tolaini, M., Roderick, K., Georgopoulos, K., and Kioussis, D. (2002). The CD8alpha gene locus is regulated by the Ikaros family of proteins. *Mol Cell* *10*, 1403-1415.

Hatakeyama, J., and Kageyama, R. (2004). Retinal cell fate determination and bHLH factors. *Semin Cell Dev Biol* *15*, 83-89.

Hatakeyama, J., Tomita, K., Inoue, T., and Kageyama, R. (2001a). Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type. *Development* *128*, 1313-1322.

Hatakeyama, J., Tomita, K., Inoue, T., and Kageyama, R. (2001b). Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type. *Development* *128*, 1313-1322.

Haverkamp, S., and Wassle, H. (2000). Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol* *424*, 1-23.

Hess, D. T., Patterson, S. I., Smith, D. S., and Skene, J. H. (1993). Neuronal growth cone collapse and inhibition of protein fatty acylation by nitric oxide. *Nature* *366*, 562-565.

Hirano, T., Matsuda, T., and Nakajima, K. (1994). Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the interleukin 6 related cytokine subfamily. *Stem Cells* *12*, 262-277.



- Hojo, M., Ohtsuka, T., Hashimoto, N., Gradwohl, G., Guillemot, F., and Kageyama, R. (2000). Glial cell fate specification modulated by the bHLH gene *Hes5* in mouse retina. *Development* *127*, 2515-2522.
- Holt, C. E., Bertsch, T. W., Ellis, H. M., and Harris, W. A. (1988). Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth date. *Neuron* *1*, 15-26.
- Holtmann, B., Wiese, S., Samsam, M., Grohmann, K., Pennica, D., Martini, R., and Sendtner, M. (2005). Triple knock-out of CNTF, LIF, and CT-1 defines cooperative and distinct roles of these neurotrophic factors for motoneuron maintenance and function. *J Neurosci* *25*, 1778-1787.
- Hudson, K. R., Vernallis, A. B., and Heath, J. K. (1996). Characterization of the receptor binding sites of human leukemia inhibitory factor and creation of antagonists. *J Biol Chem* *271*, 11971-11978.
- Humphries, M. M., Rancourt, D., Farrar, G. J., Kenna, P., Hazel, M., Bush, R. A., Sieving, P. A., Sheils, D. M., McNally, N., Creighton, P., *et al.* (1997). Retinopathy induced in mice by targeted disruption of the rhodopsin gene. *Nat Genet* *15*, 216-219.
- Inoue, T., Hojo, M., Bessho, Y., Tano, Y., Lee, J. E., and Kageyama, R. (2002). *Math3* and *NeuroD* regulate amacrine cell fate specification in the retina. *Development* *129*, 831-842.
- Ip, N. Y., Nye, S. H., Boulton, T. G., Davis, S., Taga, T., Li, Y., Birren, S. J., Yasukawa, K., Kishimoto, T., Anderson, D. J., and *et al.* (1992). CNTF and LIF act on neuronal cells via shared signaling pathways that involve the IL-6 signal transducing receptor component gp130. *Cell* *69*, 1121-1132.
- Isshiki, T., Pearson, B., Holbrook, S., and Doe, C. Q. (2001). *Drosophila* neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny. *Cell* *106*, 511-521.
- James, J., Das, A. V., Rahnenfuhrer, J., and Ahmad, I. (2004). Cellular and molecular characterization of early and late retinal stem cells/progenitors: differential regulation of proliferation and context dependent role of Notch signaling. *J Neurobiol* *61*, 359-376.
- Jensen, A. M., and Wallace, V. A. (1997). Expression of Sonic hedgehog and its putative role as a precursor cell mitogen in the developing mouse retina. *Development* *124*, 363-371.
- Jeppesen, P. (1997). Histone acetylation: a possible mechanism for the inheritance of cell memory at mitosis. *Bioessays* *19*, 67-74.
- Ju, W. K., Chung, I. W., Kim, K. Y., Gwon, J. S., Lee, M. Y., Oh, S. J., and Chun, M. H. (2001). Sodium nitroprusside selectively induces apoptotic cell death in the outer retina of the rat. *Neuroreport* *12*, 4075-4079.
- Ju, W. K., Lee, M. Y., Hofmann, H. D., Kirsch, M., Oh, S. J., Chung, J. W., and Chun, M. H. (2000). Increased expression of ciliary neurotrophic factor receptor alpha mRNA in the ischemic rat retina. *Neurosci Lett* *283*, 133-136.

- Kahn, M. A., Huang, C. J., Caruso, A., Barresi, V., Nazarian, R., Condorelli, D. F., and de Vellis, J. (1997). Ciliary neurotrophic factor activates JAK/Stat signal transduction cascade and induces transcriptional expression of glial fibrillary acidic protein in glial cells. *J Neurochem* 68, 1413-1423.
- Kambadur, R., Koizumi, K., Stivers, C., Nagle, J., Poole, S. J., and Odenwald, W. F. (1998). Regulation of POU genes by castor and hunchback establishes layered compartments in the *Drosophila* CNS. *Genes Dev* 12, 246-260.
- Kaufmann, C., Yoshida, T., Perotti, E. A., Landhuis, E., Wu, P., and Georgopoulos, K. (2003). A complex network of regulatory elements in Ikaros and their activity during hemolymphopoiesis. *Embo J* 22, 2211-2223.
- Kelley, C. M., Ikeda, T., Koipally, J., Avitahl, N., Wu, L., Georgopoulos, K., and Morgan, B. A. (1998). Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors. *Curr Biol* 8, 508-515.
- Kessler, J. A., Ludlam, W. H., Freidin, M. M., Hall, D. H., Michaelson, M. D., Spray, D. C., Dougherty, M., and Batter, D. K. (1993). Cytokine-induced programmed death of cultured sympathetic neurons. *Neuron* 11, 1123-1132.
- Kim, J., Sif, S., Jones, B., Jackson, A., Koipally, J., Heller, E., Winandy, S., Viel, A., Sawyer, A., Ikeda, T., *et al.* (1999). Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity* 10, 345-355.
- Kim, J., Wu, H. H., Lander, A. D., Lyons, K. M., Matzuk, M. M., and Calof, A. L. (2005). GDF11 controls the timing of progenitor cell competence in developing retina. *Science* 308, 1927-1930.
- Kim, K. Y., Ju, W. K., Oh, S. J., and Chun, M. H. (2000). The immunocytochemical localization of neuronal nitric oxide synthase in the developing rat retina. *Exp Brain Res* 133, 419-424.
- Kirsch, M., Fuhrmann, S., Wiese, A., and Hofmann, H. D. (1996). CNTF exerts opposite effects on in vitro development of rat and chick photoreceptors. *Neuroreport* 7, 697-700.
- Kirsch, M., Lee, M. Y., Meyer, V., Wiese, A., and Hofmann, H. D. (1997). Evidence for multiple, local functions of ciliary neurotrophic factor (CNTF) in retinal development: expression of CNTF and its receptors and in vitro effects on target cells. *J Neurochem* 68, 979-990.
- Kirsch, M., Schulz-Key, S., Wiese, A., Fuhrmann, S., and Hofmann, H. (1998a). Ciliary neurotrophic factor blocks rod photoreceptor differentiation from postmitotic precursor cells in vitro. *Cell Tissue Res* 291, 207-216.
- Kirsch, M., Schulz-Key, S., Wiese, A., Fuhrmann, S., and Hofmann, H. (1998b). Ciliary neurotrophic factor blocks rod photoreceptor differentiation from postmitotic precursor cells in vitro. *Cell Tissue Res* 291, 207-216.

- Kirstetter, P., Thomas, M., Dierich, A., Kastner, P., and Chan, S. (2002). Ikaros is critical for B cell differentiation and function. *Eur J Immunol* 32, 720-730.
- Klug, C. A., Morrison, S. J., Masek, M., Hahm, K., Smale, S. T., and Weissman, I. L. (1998). Hematopoietic stem cells and lymphoid progenitors express different Ikaros isoforms, and Ikaros is localized to heterochromatin in immature lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 657-662.
- Koipally, J., and Georgopoulos, K. (2002). A molecular dissection of the repression circuitry of Ikaros. *J Biol Chem* 277, 27697-27705.
- Koipally, J., Heller, E. J., Seavitt, J. R., and Georgopoulos, K. (2002). Unconventional potentiation of gene expression by Ikaros. *J Biol Chem* 277, 13007-13015.
- Koipally, J., Renold, A., Kim, J., and Georgopoulos, K. (1999). Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *Embo J* 18, 3090-3100.
- Kolb, H., and Nelson, R. (1981). Amacrine cells of the cat retina. *Vision Res* 21, 1625-1633.
- Kolb, H., Zhang, L., Dekorver, L., and Cuenca, N. (2002). A new look at calretinin-immunoreactive amacrine cell types in the monkey retina. *J Comp Neurol* 453, 168-184.
- Korenjak, M., and Brehm, A. (2005). E2F-Rb complexes regulating transcription of genes important for differentiation and development. *Curr Opin Genet Dev* 15, 520-527.
- LaVail, M. M., Unoki, K., Yasumura, D., Matthes, M. T., Yancopoulos, G. D., and Steinberg, R. H. (1992). Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11249-11253.
- Lelievre, E., Plun-Favreau, H., Chevalier, S., Froger, J., Guillet, C., Elson, G. C., Gauchat, J. F., and Gascan, H. (2001). Signaling pathways recruited by the cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 composite cytokine: specific requirement of the membrane-bound form of ciliary neurotrophic factor receptor alpha component. *J Biol Chem* 276, 22476-22484.
- Lem, J., Krasnoperova, N. V., Calvert, P. D., Kosaras, B., Cameron, D. A., Nicolo, M., Makino, C. L., and Sidman, R. L. (1999). Morphological, physiological, and biochemical changes in rhodopsin knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 736-741.
- Lessard, J., Wu, J. I., Ranish, J. A., Wan, M., Winslow, M. M., Staahl, B. T., Wu, H., Aebersold, R., Graef, I. A., and Crabtree, G. R. (2007). An Essential Switch in Subunit Composition of a Chromatin Remodeling Complex during Neural Development. *Neuron* 55, 201-215.
- Li, M., Sendtner, M., and Smith, A. (1995). Essential function of LIF receptor in motor neurons. *Nature* 378, 724-727.

- Li, S., Mo, Z., Yang, X., Price, S. M., Shen, M. M., and Xiang, M. (2004). Foxn4 controls the genesis of amacrine and horizontal cells by retinal progenitors. *Neuron* 43, 795-807.
- Li, S., Tay, D., Shu, S., Bao, X., Wu, Y., Wang, X., and Yip, H. K. (2006). Endothelial nitric oxide synthase is expressed in amacrine cells of developing human retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 2141-2149.
- Lillien, L., and Cepko, C. (1992). Control of proliferation in the retina: temporal changes in responsiveness to FGF and TGF alpha. *Development* 115, 253-266.
- Liu, W., Khare, S. L., Liang, X., Peters, M. A., Liu, X., Cepko, C. L., and Xiang, M. (2000). All Brn3 genes can promote retinal ganglion cell differentiation in the chick. *Development* 127, 3237-3247.
- Liu, W., Mo, Z., and Xiang, M. (2001). The Ath5 proneural genes function upstream of Brn3 POU domain transcription factor genes to promote retinal ganglion cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1649-1654.
- Livesey, F. J., and Cepko, C. L. (2001). Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nat Rev Neurosci* 2, 109-118.
- Marquardt, T., and Gruss, P. (2002). Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends Neurosci* 25, 32-38.
- Martin, D. P., Ito, A., Horigome, K., Lampe, P. A., and Johnson, E. M., Jr. (1992). Biochemical characterization of programmed cell death in NGF-deprived sympathetic neurons. *J Neurobiol* 23, 1205-1220.
- Masu, Y., Wolf, E., Holtmann, B., Sendtner, M., Brem, G., and Thoenen, H. (1993). Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature* 365, 27-32.
- Mathers, P. H., Grinberg, A., Mahon, K. A., and Jamrich, M. (1997). The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development. *Nature* 387, 603-607.
- Mears, A. J., Kondo, M., Swain, P. K., Takada, Y., Bush, R. A., Saunders, T. L., Sieving, P. A., and Swaroop, A. (2001). Nrl is required for rod photoreceptor development. *Nat Genet* 29, 447-452.
- Meyer-Franke, A., Kaplan, M. R., Pfrieger, F. W., and Barres, B. A. (1995). Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron* 15, 805-819.
- Michon, J. J., Li, Z. L., Shioura, N., Anderson, R. J., and Tso, M. O. (1991). A comparative study of methods of photoreceptor morphometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32, 280-284.
- Molday, R. S., and MacKenzie, D. (1983). Monoclonal antibodies to rhodopsin: characterization, cross-reactivity, and application as structural probes. *Biochemistry* 22, 653-660.

- Molnar, A., and Georgopoulos, K. (1994). The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* *14*, 8292-8303.
- Morgan, B., Sun, L., Avitahl, N., Andrikopoulos, K., Ikeda, T., Gonzales, E., Wu, P., Neben, S., and Georgopoulos, K. (1997). Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *Embo J* *16*, 2004-2013.
- Morikawa, Y. (2005). Oncostatin M in the development of the nervous system. *Anat Sci Int* *80*, 53-59.
- Morrow, E. M., Belliveau, M. J., and Cepko, C. L. (1998). Two phases of rod photoreceptor differentiation during rat retinal development. *J Neurosci* *18*, 3738-3748.
- Morrow, E. M., Furukawa, T., Lee, J. E., and Cepko, C. L. (1999). NeuroD regulates multiple functions in the developing neural retina in rodent. *Development* *126*, 23-36.
- Mosinger Ogilvie, J., Deckwerth, T. L., Knudson, C. M., and Korsmeyer, S. J. (1998). Suppression of developmental retinal cell death but not of photoreceptor degeneration in Bax-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *39*, 1713-1720.
- Mu, X., Fu, X., Sun, H., Beremand, P. D., Thomas, T. L., and Klein, W. H. (2005a). A gene network downstream of transcription factor Math5 regulates retinal progenitor cell competence and ganglion cell fate. *Dev Biol* *280*, 467-481.
- Mu, X., Fu, X., Sun, H., Liang, S., Maeda, H., Frishman, L. J., and Klein, W. H. (2005b). Ganglion cells are required for normal progenitor- cell proliferation but not cell-fate determination or patterning in the developing mouse retina. *Curr Biol* *15*, 525-530.
- Nelander, S., Larsson, E., Kristiansson, E., Mansson, R., Nerman, O., Sigvardsson, M., Mostad, P., and Lindahl, P. (2005). Predictive screening for regulators of conserved functional gene modules (gene batteries) in mammals. *BMC Genomics* *6*, 68.
- Neophytou, C., Vernallis, A. B., Smith, A., and Raff, M. C. (1997). Muller-cell-derived leukaemia inhibitory factor arrests rod photoreceptor differentiation at a postmitotic pre-rod stage of development. *Development* *124*, 2345-2354.
- Nichogiannopoulou, A., Trevisan, M., Neben, S., Friedrich, C., and Georgopoulos, K. (1999). Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice. *J Exp Med* *190*, 1201-1214.
- Nishida, A., Furukawa, A., Koike, C., Tano, Y., Aizawa, S., Matsuo, I., and Furukawa, T. (2003). Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat Neurosci* *6*, 1255-1263.
- Novotny, T., Eiselt, R., and Urban, J. (2002). Hunchback is required for the specification of the early sublineage of neuroblast 7-3 in the Drosophila central nervous system. *Development* *129*, 1027-1036.

- O'Neill, D. W., Schoetz, S. S., Lopez, R. A., Castle, M., Rabinowitz, L., Shor, E., Krawchuk, D., Goll, M. G., Renz, M., Seelig, H. P., *et al.* (2000). An ikaros-containing chromatin-remodeling complex in adult-type erythroid cells. *Mol Cell Biol* 20, 7572-7582.
- Ohsawa, R., and Kageyama, R. (2007). Regulation of retinal cell fate specification by multiple transcription factors. *Brain Res.*
- Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R. (1999). *Hes1* and *Hes5* as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *Embo J* 18, 2196-2207.
- Oppenheim, R. W., Prevette, D., Yin, Q. W., Collins, F., and MacDonald, J. (1991). Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor. *Science* 251, 1616-1618.
- Ozawa, Y., Nakao, K., Shimazaki, T., Takeda, J., Akira, S., Ishihara, K., Hirano, T., Oguchi, Y., and Okano, H. (2004). Downregulation of STAT3 activation is required for presumptive rod photoreceptor cells to differentiate in the postnatal retina. *Mol Cell Neurosci* 26, 258-270.
- Papathanasiou, P., Perkins, A. C., Cobb, B. S., Ferrini, R., Sridharan, R., Hoyne, G. F., Nelms, K. A., Smale, S. T., and Goodnow, C. C. (2003). Widespread failure of hematolymphoid differentiation caused by a recessive niche-filling allele of the Ikaros transcription factor. *Immunity* 19, 131-144.
- Patel, J. I., Gentleman, S. M., Jen, L. S., and Garey, L. J. (1997). Nitric oxide synthase in developing retinas and after optic tract section. *Brain Res* 761, 156-160.
- Pearson, B. J., and Doe, C. Q. (2003). Regulation of neuroblast competence in *Drosophila*. *Nature* 425, 624-628.
- Pearson, B. J., and Doe, C. Q. (2004). Specification of temporal identity in the developing nervous system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 619-647.
- Penfold, P. L., and Provis, J. M. (1986). Cell death in the development of the human retina: phagocytosis of pyknotic and apoptotic bodies by retinal cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 224, 549-553.
- Peng, G. H., Ahmad, O., Ahmad, F., Liu, J., and Chen, S. (2005). The photoreceptor-specific nuclear receptor Nr2e3 interacts with Crx and exerts opposing effects on the transcription of rod versus cone genes. *Hum Mol Genet* 14, 747-764.
- Perdomo, J., Holmes, M., Chong, B., and Crossley, M. (2000). Eos and pegasus, two members of the Ikaros family of proteins with distinct DNA binding activities. *J Biol Chem* 275, 38347-38354.
- Perron, M., and Harris, W. A. (2000). Determination of vertebrate retinal progenitor cell fate by the Notch pathway and basic helix-loop-helix transcription factors. *Cell Mol Life Sci* 57, 215-223.

Peterson, W. M., Wang, Q., Tzekova, R., and Wiegand, S. J. (2000). Ciliary neurotrophic factor and stress stimuli activate the Jak-STAT pathway in retinal neurons and glia. *J Neurosci* 20, 4081-4090.

Plun-Favreau, H., Elson, G., Chabbert, M., Froger, J., deLapeyriere, O., Lelievre, E., Guillet, C., Hermann, J., Gauchat, J. F., Gascan, H., and Chevalier, S. (2001). The ciliary neurotrophic factor receptor alpha component induces the secretion of and is required for functional responses to cardiotrophin-like cytokine. *Embo J* 20, 1692-1703.

Poggi, L., Vitorino, M., Masai, I., and Harris, W. A. (2005). Influences on neural lineage and mode of division in the zebrafish retina in vivo. *J Cell Biol* 171, 991-999.

Raff, M. C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356, 397-400.

Rapaport, D. H., Rakic, P., and LaVail, M. M. (1996). Spatiotemporal gradients of cell genesis in the primate retina. *Perspect Dev Neurobiol* 3, 147-159.

Rapaport, D. H., Wong, L. L., Wood, E. D., Yasumura, D., and LaVail, M. M. (2004). Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol* 474, 304-324.

Rhee, K. D., Goureau, O., Chen, S., and Yang, X. J. (2004). Cytokine-induced activation of signal transducer and activator of transcription in photoreceptor precursors regulates rod differentiation in the developing mouse retina. *J Neurosci* 24, 9779-9788.

Rhee, K. D., and Yang, X. J. (2003). Expression of cytokine signal transduction components in the postnatal mouse retina. *Mol Vis* 9, 715-722.

Roger, J., Brajeul, V., Thomasseau, S., Hienola, A., Sahel, J. A., Guillonnet, X., and Goureau, O. (2006). Involvement of Pleiotrophin in CNTF-mediated differentiation of the late retinal progenitor cells. *Dev Biol* 298, 527-539.

Roskams, A. J., Brecht, D. S., Dawson, T. M., and Ronnett, G. V. (1994). Nitric oxide mediates the formation of synaptic connections in developing and regenerating olfactory receptor neurons. *Neuron* 13, 289-299.

Schulz-Key, S., Hofmann, H. D., Beisenherz-Huss, C., Barbisch, C., and Kirsch, M. (2002). Ciliary neurotrophic factor as a transient negative regulator of rod development in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 3099-3108.

Sharma, R. K., Perez, M. T., and Ehinger, B. (1997). Immunocytochemical localisation of neuronal nitric oxide synthase in developing and transplanted rabbit retinas. *Histochem Cell Biol* 107, 449-458.

Sheedlo, H. J., and Turner, J. E. (1996). Influence of a retinal pigment epithelial cell factor(s) on rat retinal progenitor cells. *Brain Res Dev Brain Res* 93, 88-99.

Shen, Q., Wang, Y., Dimos, J. T., Fasano, C. A., Phoenix, T. N., Lemischka, I. R., Ivanova, N. B., Stifani, S., Morrissey, E. E., and Temple, S. (2006). The timing of cortical

- neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nat Neurosci* 9, 743-751.
- Shuster, T. A., and Farber, D. B. (1986). Rhodopsin phosphorylation in developing normal and degenerative mouse retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27, 264-268.
- Stahl, N., Davis, S., Wong, V., Taga, T., Kishimoto, T., Ip, N. Y., and Yancopoulos, G. D. (1993). Cross-linking identifies leukemia inhibitory factor-binding protein as a ciliary neurotrophic factor receptor component. *J Biol Chem* 268, 7628-7631.
- Stahl, N., and Yancopoulos, G. D. (1994). The tripartite CNTF receptor complex: activation and signaling involves components shared with other cytokines. *J Neurobiol* 25, 1454-1466.
- Stewart, C. L., Kaspar, P., Brunet, L. J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F., and Abbondanzo, S. J. (1992). Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 359, 76-79.
- Stockli, K. A., Lottspeich, F., Sendtner, M., Masiakowski, P., Carroll, P., Gotz, R., Lindholm, D., and Thoenen, H. (1989). Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature* 342, 920-923.
- Sun, L., Liu, A., and Georgopoulos, K. (1996). Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *Embo J* 15, 5358-5369.
- Symes, A. J., Rao, M. S., Lewis, S. E., Landis, S. C., Hyman, S. E., and Fink, J. S. (1993). Ciliary neurotrophic factor coordinately activates transcription of neuropeptide genes in a neuroblastoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 572-576.
- Taranova, O. V., Magness, S. T., Fagan, B. M., Wu, Y., Surzenko, N., Hutton, S. R., and Pevny, L. H. (2006). SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. *Genes Dev* 20, 1187-1202.
- Tomita, K., Ishibashi, M., Nakahara, K., Ang, S. L., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R. (1996). Mammalian hairy and Enhancer of split homolog 1 regulates differentiation of retinal neurons and is essential for eye morphogenesis. *Neuron* 16, 723-734.
- Tomita, K., Moriyoshi, K., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R. (2000). Mammalian achaete-scute and atonal homologs regulate neuronal versus glial fate determination in the central nervous system. *Embo J* 19, 5460-5472.
- Tsumamoto, Y., Yamashita, K., Takumida, M., Okada, K., Mukai, S., Shinya, M., Yamashita, H., and Mishima, H. K. (2002). In situ localization of nitric oxide synthase and direct evidence of NO production in rat retinal ganglion cells. *Brain Res* 933, 118-129.
- Turner, D. L., and Cepko, C. L. (1987). A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 328, 131-136.



- Turner, D. L., Snyder, E. Y., and Cepko, C. L. (1990). Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron* 4, 833-845.
- Valter, K., Bisti, S., and Stone, J. (2003). Location of CNTFRalpha on outer segments: evidence of the site of action of CNTF in rat retina. *Brain Res* 985, 169-175.
- Vilquin, J. T., Guerette, B., Kinoshita, I., Roy, B., Goulet, M., Gravel, C., Roy, R., and Tremblay, J. P. (1995). FK506 immunosuppression to control the immune reactions triggered by first-generation adenovirus-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther* 6, 1391-1401.
- Voyvodic, J. T., Burne, J. F., and Raff, M. C. (1995). Quantification of normal cell death in the rat retina: implications for clone composition in cell lineage analysis. *Eur J Neurosci* 7, 2469-2478.
- Wahlin, K. J., Adler, R., Zack, D. J., and Campochiaro, P. A. (2001). Neurotrophic signaling in normal and degenerating rodent retinas. *Exp Eye Res* 73, 693-701.
- Wahlin, K. J., Campochiaro, P. A., Zack, D. J., and Adler, R. (2000). Neurotrophic factors cause activation of intracellular signaling pathways in Muller cells and other cells of the inner retina, but not photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 927-936.
- Wahlin, K. J., Lim, L., Grice, E. A., Campochiaro, P. A., Zack, D. J., and Adler, R. (2004). A method for analysis of gene expression in isolated mouse photoreceptor and Muller cells. *Mol Vis* 10, 366-375.
- Waid, D. K., and McLoon, S. C. (1998). Ganglion cells influence the fate of dividing retinal cells in culture. *Development* 125, 1059-1066.
- Wang, J. H., Nichogiannopoulou, A., Wu, L., Sun, L., Sharpe, A. H., Bigby, M., and Georgopoulos, K. (1996). Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity* 5, 537-549.
- Wang, T., Xie, Z., and Lu, B. (1995). Nitric oxide mediates activity-dependent synaptic suppression at developing neuromuscular synapses. *Nature* 374, 262-266.
- Wang, Y., Dakubo, G. D., Thurig, S., Mazerolle, C. J., and Wallace, V. A. (2005). Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog locally controls proliferation and the timing of RGC development in the embryonic mouse retina. *Development*.
- Wang, Y., Smith, S. B., Ogilvie, J. M., McCool, D. J., and Sarthy, V. (2002a). Ciliary neurotrophic factor induces glial fibrillary acidic protein in retinal Muller cells through the JAK/STAT signal transduction pathway. *Curr Eye Res* 24, 305-312.
- Wang, Y. P., Dakubo, G., Howley, P., Campsall, K. D., Mazarolle, C. J., Shiga, S. A., Lewis, P. M., McMahon, A. P., and Wallace, V. A. (2002b). Development of normal retinal organization depends on Sonic hedgehog signaling from ganglion cells. *Nat Neurosci* 5, 831-832.

- Watanabe, T., and Raff, M. C. (1988). Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature* 332, 834-837.
- Watanabe, T., and Raff, M. C. (1992). Diffusible rod-promoting signals in the developing rat retina. *Development* 114, 899-906.
- Wetts, R., and Fraser, S. E. (1988). Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina. *Science* 239, 1142-1145.
- Winandy, S., Wu, P., and Georgopoulos, K. (1995). A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma. *Cell* 83, 289-299.
- Wong, R. O., and Hughes, A. (1987). Developing neuronal populations of the cat retinal ganglion cell layer. *J Comp Neurol* 262, 473-495.
- Wu, H. H., Williams, C. V., and McLoon, S. C. (1994). Involvement of nitric oxide in the elimination of a transient retinotectal projection in development. *Science* 265, 1593-1596.
- Yang, Z., Ding, K., Pan, L., Deng, M., and Gan, L. (2003). Math5 determines the competence state of retinal ganglion cell progenitors. *Dev Biol* 264, 240-254.
- Young, R. W. (1984). Cell death during differentiation of the retina in the mouse. *J Comp Neurol* 229, 362-373.
- Young, R. W. (1985). Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat Rec* 212, 199-205.
- Zahir, T., Klassen, H., and Young, M. J. (2005). Effects of ciliary neurotrophic factor on differentiation of late retinal progenitor cells. *Stem Cells* 23, 424-432.
- Zhang, J., Gray, J., Wu, L., Leone, G., Rowan, S., Cepko, C. L., Zhu, X., Craft, C. M., and Dyer, M. A. (2004). Rb regulates proliferation and rod photoreceptor development in the mouse retina. *Nat Genet* 36, 351-360.